



Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud
Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

TESIS:

**“BIORREMEDIACIÓN POR MICROORGANISMOS
DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

AUTOR:

Bachiller SIHUACOLLO FLORES, Diana Pilar

ASESORA:

Blg. MSc. MALLQUI BRITO, Vania

Lima - Perú

2015

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a Dios por darme vida y salud para realizarlo, a mi querida madre Juana por confiar en mí.

AGRADECIMIENTO

Primero, a Dios, por permitirme realizar el presente trabajo y por todas sus bendiciones. A mi querida madre, por haber estado siempre a mi lado y confiar en mí. A Michel un gran amigo gracias a su apoyo incondicional para realizar mis metas. A mi asesora de tesis y asesora de metodología, por su paciencia y dedicación en fin de lograr los objetivos.

RESUMEN

El problema de la contaminación ambiental con petróleo es de vital importancia, por que causan efectos perjudiciales en los ecosistemas (terrestres y acuáticos), y a la salud. Por tal razón la biorremediación por microorganismos ha demostrado ser una tecnología eficaz, económica y muy útil para el tratamiento de la contaminación por petróleo, porque gran parte de los componentes del petróleo y sus derivados son biodegradables. Los microorganismos, han logrado adaptarse a estos contaminantes, siendo para ellos su fuente de supervivencia. En el presente trabajo tuvo por objetivo determinar la capacidad de los microorganismos para degradar hidrocarburos del medio ambiente. Según la revisión e interpretación de diversos autores se determinó que son diversos los microorganismos que tienen capacidad de degradar hidrocarburos. Siendo las bacterias las más utilizadas en el proceso de biorremediación, los géneros más empleados son *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Nocardia*. También se determinó que el género *Aspergillus* (hongo) tiene capacidad para degradar hidrocarburos poli aromáticos (HAP).

Palabras clave: Contaminación, Biorremediación, hidrocarburos

ABSTRACT

The problem of environmental pollution by oil is vital, for that cause adverse effects on ecosystems (terrestrial and aquatic), and health. For this reason bioremediation by microorganisms has proven to be an effective, economical and very useful for the treatment of oil pollution technology, because much of the components of petroleum and petroleum products are biodegradable. Microorganisms have adapted to these pollutants, being for them their source of livelihood. In the present work aimed to determine the ability of microorganisms to degrade hydrocarbon environment. According to the review and interpretation of various authors found that there are various microorganisms having ability to degrade hydrocarbons. Being the most bacteria used in bioremediation process, employees are more gender *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Nocardia*. It was also determined that the genus *Aspergillus* (fungus) has the ability to degrade poly aromatic hydrocarbons (PAHs).

Keywords: Pollution, Bioremediation, hydrocarbons

ÍNDICE

CARÁTULA.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
INTRODUCCIÓN.....	xi
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	12
1.2 Formulación del Problema.....	13
1.2.1 Problema principal.....	13
1.2.2 Problemas específicos.....	13
1.3 Objetivos de la Investigación.....	13
1.3.1 Objetivo General.....	13
1.3.2 Objetivo Específico.....	14
1.4 Hipótesis de la Investigación.....	14
1.4.1 Hipótesis General.....	14
1.4.2 Hipótesis Secundarias.....	14
1.5 Justificación e Importancia de la Investigación.....	14
1.5.1 Justificación de la investigación.....	14
1.5.2 Importancia de la investigación.....	16
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	17
2.1 Antecedentes de la Investigación.....	17

2.2 Bases Teóricas.....	21
2.2.1 Hidrocarburos.....	21
2.2.1.1 Composición general del petróleo.....	22
A). Composición por familia de hidrocarburo.....	24
2.2.1.2 Efecto toxico de alcanos y aromáticos.....	27
A). Efecto toxico de alcanos.....	27
B). Efectos toxico de los aromáticos.....	28
2.2.1.3 Hidrocarburos y la contaminación.....	30
A). Formas de contaminación por la operación petrolera.....	31
2.2.1.4 Efecto de los hidrocarburos en los seres vivos.....	33
A). Efectos de la contaminación por hidrocarburos en el ser humano.....	33
B). Daños a la fauna y flora.....	36
2.2.1.5 Microorganismos degradadores de hidrocarburos.....	37
A). Propiedades de algunos microorganismos hidrocarbonoclastas.....	39
2.2.2 Biorremediación.....	41
2.2.2.1 Antecedentes históricos de la biorremediación.....	42
2.2.2.2 Factores que condicionan la biorremediación.....	43
A). Factores ambientales.....	43
B). Factores físicos.....	48
C). Factores químicos.....	50
D). Factores microbiológicos.....	51
2.2.2.3 Degradación de los hidrocarburos.....	52

2.2.2.4 Ventajas y desventajas de la biorremediación.....	57
A). Ventajas	57
B). Desventajas... ..	58
2.3 Definición de términos básicos.....	58
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	61
3.1 Tipo de Investigación.....	61
3.1.1 Método.....	61
3.1.2 Técnica.....	61
3.1.3 Diseño.....	61
3.2 Población y Muestreo de la Investigación.....	62
3.2.1 Población.....	62
3.2.2 Muestra.....	62
3.3 Variables e indicadores.....	62
3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	62
3.4.1 Técnicas.....	62
3.4.2 Instrumentos.....	62
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE	
RESULTADOS.....	63
4.1 Resultados.....	63
DISCUSIONES.....	70
CONCLUSIONES.....	72
RECOMENDACIONES.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N° 1: Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo.....	23
TABLA N° 2: Afectaciones a la salud.....	35
TABLA N° 3: Géneros más comunes de hongos y bacterias con capacidad degradativa en petróleo.....	38
TABLA N° 4: Variables e indicadores.....	62
TABLA N° 5: Capacidad de biodegradación de ciertos microorganismos.....	64
TABLA N° 6: Crecimiento de las cepas fungicidas en los sustratos de prueba.....	65
TABLA N° 7: Porcentaje de degradación de los n - alcanos probados..	68
TABLA N° 8: Cultivos de bacterias degradadas de hidrocarburos en presencia de Kerosén, gasoil y tolueno.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N° 1: Estructura químicas de diferentes compuestos del petróleo.....	27
FIGURA N° 2: Degradación aeróbica de n - alcanos.....	54
FIGURA N° 3: Hidrocarburos monoaromáticos más comunes.....	55
FIGURA N° 4: Degradación aerobia del benceno a través del catecol como intermediario.....	56
FIGURA N° 5: Capacidad de biodegradación de ciertos microorganismos.....	63
FIGURA N° 6: Análisis de componentes principales de los microorganismos identificados y las diferentes fuentes de carbono donde fueron aislados.....	66
FIGURA N° 7: Velocidad específica del crecimiento de <i>Pseudomona</i> <i>aeruginosa</i> MGP-1 en cada uno de los n - alcanos utilizados.....	67

INTRODUCCIÓN

La industria petrolera es una actividad económica significativa; sin embargo la explotación brusca del petróleo y el mal manejo de esta industria, genera un gran riesgo al medio ambiente y a la salud, siendo uno de los problemas más importantes de la actualidad a nivel nacional e internacional. El vertimiento del petróleo provoca un efecto negativo a corto, mediano y largo plazo, ocasionando un gran desequilibrio en el ecosistema que impacta de manera negativa al entorno económico, social y ambiental.

La biorremediación como una técnica efectiva en la descontaminación, es una de las más económicas, debido a la utilización de microorganismos y su potencial degradador para eliminar los hidrocarburos presentes en el medio ambiente. Los microorganismos que habitan en diferentes ambientes acuáticos y terrestres, según el clima y región geográfica son diversos y capaces de utilizar cualquier sustrato orgánico que se encuentre en su medio. Por consiguiente tienen la capacidad de usar hidrocarburos, metabolizándolos hasta compuestos orgánicos, dióxido de carbono y agua.

Por lo tanto la descomposición del petróleo por la vía microbiana es un mecanismo ágil, seguro y económico para eliminar la contaminación del medio ambiente, en consecuencia es importante estudiar las formas de degradación de los microorganismos degradadores de compuestos de petróleo.

El presente trabajo tiene por objetivo determinar cómo actúan los microorganismos en el proceso de biorremediación de hidrocarburos en el medio ambiente.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

Uno de los problemas ambientales más importantes de la actualidad a nivel nacional e internacional, es la contaminación de ecosistemas terrestres y acuáticos por derrames de hidrocarburos. Se estima que 3 mil 800 millones de litros entran cada año a los océanos como resultado de las actividades humanas, de estos, solo 8% se debe a fuentes naturales; el 22% a descargas operacionales intencionales de los barcos; 12% por derrames de buques y otro 36 % por las descargas de aguas residuales (1).

A nivel mundial los accidentes de los derrames de petróleo se han dado de manera constante y son una de las principales fuentes de contaminación de suelos y aguas ocasionando grandes perturbaciones en el ecosistema al afectar su estructura y bioprocesos, por tal motivo la magnitud del problema es tal, que el ambiente se torne improductivo durante largos periodos debido a que erosiona y produce efectos tóxicos sobre los organismos (2).

Debido a la contaminación del medio ambiente por petróleo, se genera una amenaza real a la salud pública, así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales, es imprescindible el desarrollo de nuevas tecnologías que disminuyan la concentración y/o toxicidad de los contaminantes producidos por la industria y que al mismo tiempo no generen

altos costos de inversión y mantenimiento con fines de disminuir la contaminación de suelos y aguas.

Por tal motivo para solucionar esta problemática se requiere obligadamente la remediación de los ambientes afectados a fin de ser aptos y menos tóxicos para el medio ambiente, por lo cual la propuesta de biorremediación utilizando una variedad de técnicas, principalmente microorganismos como bacterias y hongos, para degradar, transformar o remover compuestos de hidrocarburos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos, en consecuencia los microorganismos juegan un papel importante en el proceso de biorremediación de ambientes contaminados con petróleo .

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema principal

¿Cómo actúan los microorganismos en el proceso de biorremediación de hidrocarburos en el medio ambiente?

1.2.2 Problemas específicos

¿Cuáles son los microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos en el medio ambiente?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivos general

Determinar cómo actúan los microorganismos en el proceso de biorremediación de hidrocarburos en el medio ambiente

1.3.2 Objetivos específicos

Determinar los microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos en el medio ambiente.

1.4 Hipótesis de la investigación

1.4.1 Hipótesis general

Los microorganismos degradadores de hidrocarburos actuarían oxidando o rompiendo el enlace del anillo aromático del hidrocarburo presente en el medio ambiente.

1.4.2 Hipótesis secundarias

Los microorganismos que tendrían la capacidad de degradar hidrocarburos en el medio ambiente serían bacterias y hongos.

1.5 Justificación e importancia de la investigación

1.5.1 Justificación de la investigación

Cada vez son más frecuentes los reportes de accidentes ecológicos por derrames de crudo de petróleo y dicha situación se va convirtiendo en un tema de interés nacional e internacional y un reto a superar por los regidores o gobernantes de turno y las empresas dedicadas a este rubro. Uno de los mayores problemas de las refinerías de petróleo es la eliminación segura de los lodos generados durante el procesamiento del crudo. Una eliminación impropia de los mismos lleva a la contaminación ambiental, particularmente del suelo, y plantea una gran amenaza para las aguas subterráneas (1).

En el caso de los suelos, la contaminación por hidrocarburos, produce dificultades en el intercambio gaseoso con la atmósfera y como consecuencia genera alteraciones en los procesos físicos - químicos que traen consigo un impacto directo sobre los organismos de tierra y actividades económicas como la agricultura. En el agua, la acumulación de hidrocarburos en la superficie, impide el ingreso de rayos solares y dificulta el intercambio gaseoso, trayendo consigo daños a diferentes poblaciones acuáticas (3).

El presente trabajo de investigación pretende informar, el beneficio que brinda el tratamiento de biorremediación por microorganismos de ambientes contaminados, debido a que son una propuesta ecológica y económica, muchos de los constituyentes del petróleo son carcinogénicos y potentes inmunotóxicos que afectan al ecosistema donde son liberados por tal motivo la utilización de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos son una excelente alternativa para eliminar o contrarrestar los contaminantes del medio afectado (aguas, suelos) y por ende contribuir en la solución a esta problemática.

1.5.2 Importancia de la investigación

Este trabajo es importante porque permite conocer sobre los métodos de tratamiento de suelos, aguas y la recuperación de ambientes contaminados con hidrocarburos; llevando consigo una propuesta ecológica y viable de solución al problema que atraviesan nuestros ecosistemas y poblaciones aledañas cuando se producen accidentes por derrames de crudo de petróleo.

Debido a que existe una relación directa entre los accidentes ecológicos por derrames de hidrocarburos y la afección de las poblaciones colindantes. La salud de cientos de personas se ven amenazadas por el agua de mar contaminada, las partículas en suspensión en el aire cargado de humo en los hogares, la productividad de los recursos naturales se pierde debido a la contaminación de aguas y suelos afectando el ambiente social, económico (4).

Por este motivo es de suma importancia presentar alternativas de solución que beneficiarían de manera directa a las comunidades o zonas de explotación y de manera indirecta al resto de población que es beneficiada por la actividad petrolera en nuestro país.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación :

- Echeverri Jaramillo Gustavo Eugenio, Manjarrez Paba Ganiveth y Cabrera Ospina Melody, en su investigación **“Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena” (2011)**. Aislaron bacterias de 4 hábitats en el ecosistema marino aledaño a una industria petroquímica en la Bahía de Cartagena. En el proceso, las muestras se sometieron a pre - enriquecimiento por una semana, a enriquecimiento por tres semanas y aun proceso de selección de cepas competitivas, donde se evidenciaron cambios marcados en las propiedades del crudo de petróleo, como en turbidez y agregados blandos por crecimiento bacteriano. Se aislaron diferentes morfotipos que al caracterizar bioquímicamente fueron identificados como *Pseudomona aeruginosa* en todas las muestras, corroborando su gran capacidad de adaptación en ambientes contaminados de este tipo. Estos resultados permitirán la realización de pruebas de biodegradación con esta bacteria y desarrollar ensayos a nivel microcosmos para uso potencial en procesos de biorremediación de aguas contaminadas con petróleo (4).

□ Llenque Díaz y Luis A., en su investigación “**Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas de suelos contaminados con petróleo provenientes de oleocentros de la ciudad de Trujillo**” (2011). Procedieron al aislamiento de cultivos bacterianos de suelos de Oleocentros de la ciudad de Trujillo, Perú; las muestras de suelo recolectadas de aproximadamente 20cm de profundidad fueron sometidas a incubación de pre - enriquecimiento por 5 días con petróleo al 0.5% e incubados a temperatura ambiente. Luego se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-2} y fueron sembradas 0.1 ml de las dos últimas diluciones en agar nutritivo por el método de superficie con asa de Drigalsky. La población heterótrofa aislada se caracterizó por formar colonias blancas, planas, algo extendidas, bordes aserrados y con un brillo metálico; estos hallazgos preliminares permitieron continuar con los ensayos correspondientes a una selección secundaria en cultivo sumergido que se hizo en tubo con caldo de soya triptica, sales biliares y petróleo al 1%, seleccionándose los cultivos que mostraron crecimiento expresado en turbidez del medio a 37°C por 48 horas, siendo subcultivados en medio fresco e incubados en las mismas condiciones, finalmente se sembraron en caldo mínimo de sales más petróleo 1% y solo 5 cultivos tuvieron crecimiento. Al evaluar su comportamiento bioquímico mediante las pruebas indican una identificación preliminar que son bacilos pequeños, aerobios, gran negativos, catalasa y citrato positivo y crecimiento en caldo nutritivo a 42°C; características que corresponden al género *Pseudomonas* en cada una de las muestras analizadas, resaltando su capacidad de crecer en el ambientes contaminados con petróleo en las condiciones ensayadas; por consiguiente se destaca la viabilidad de la

bacteria en las muestras recolectadas así como después de evaluar su crecimiento con petróleo en medio sumergido, proponiendo su evaluación posterior en biorreactores agitados (5).

- Según Acuña Adrián, Pucci Graciela, Morales María José y Pucci Oscar, en su investigación **“Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de Patagonia Argentina” (2010)**. Caracterizó una muestra de suelo proveniente de un sistema de biorremediación en actividad y determinando la capacidad de la comunidad bacteriana para biodegradar petróleo y sus derivados, e identificar los principales microorganismos involucrados en el proceso. Para esto se tomó una muestra de suelo por la técnica de *Lanfarminh* y se caracterizaron sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas; así como el tipo de hidrocarburos que contenía por extracción con soxhlet y cromatografía en columna de silica gel. A partir de la muestra se extrajo la comunidad bacteriana, y se determinó su potencial para biodegradar petróleo. Se utilizaron métodos indirectos de mediación del crecimiento bacteriano por conteo de microorganismo y medición de densidad óptima. Los principales resultados indicaron que la comunidad bacteriana del suelo posee la capacidad de biodegradar los hidrocarburos existentes en el mismo, principalmente la fracción alifática, así como los destilados gasoil, kerosén y aceites lubricante, siendo la fracción aromática, la polar y el destilado nafta no degradados. Esta comunidad está constituida principalmente por *Rhodococcus erythropolis*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Brevundimonas*

diminuta, mostrando la mayor biodiversidad cuando los hidrocarburos utilizados como fuente de carbono pertenecen al grupo de los alifáticos.

Las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo indicaron que es factible que se realice una biorremediación eficiente de los hidrocarburos presentes (6).

- Salgado Brito Rosa, Pineda Flores Gabriel, Mesta Howard Ana María y Díaz Cedillo Francisco, en su investigación “**Degradación de n - alcanos por *Pseudomona aeruginosa MGP-1***” (2008). Manifiestan que los alcanos son el mayor componente de cualquier petróleo crudo; bacterias, animales y plantas producen también estos compuestos. Cuando los n - alcanos sólidos, también llamados parafinas, son derramados al ambiente, forman una densa capa en la superficie que impide el transporte de oxígeno y nutrientes, afectando la calidad y funcionalidad del suelo. Los informes de bacterias que degradan parafinas son escasos; por tanto, resulta de interés el hecho de que la *Pseudomona aeruginosa MGP-1* pueda degradar queroseno, diesel y otros compuestos con alto contenido de alcanos. Determinando que *Pseudomona aeruginosa MGP-1* utiliza y degrada n - alcanos entre 11 y 40 átomos de carbono. La rapidez para degradar dichos compuestos disminuye conforme la cadena hidrocarbonada aumenta o disminuye alrededor de C20. En este estudio también se desarrolló un método fácil y confiable de cromatografía de gases para cuantificar los n - alcanos (7).

□ En el 2006, Benavides López de Mesa Joaquín, Quintero Gladis, Guevara Vizcaino André Liliana, Jaimes Cáceres Diana Carolina, Gutiérrez Riaño Sandra Milena, y Miranda García Johanna en su trabajo “**Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo**”. Manifiestan que el manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado a escala mundial, un problema de contaminación de suelos, aire y agua. Entre las más severas se destaca las que se produjeron y todavía se producen a causa de la extracción y manejo del petróleo, en todos los países productores de hidrocarburos. En el suelo los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmosfera, iniciando una serie de procesos físico - químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad, además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultado su tratamiento. En esta revisión se analiza la biorremediación como una alternativa saludable frente al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente por el derramamiento de crudo (8).

2.2 Bases teóricas:

2.2.1 Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos formados por átomos de carbono e hidrogeno, de gran abundancia en la naturaleza, presentes principalmente en el petróleo. Se consideran como una mezcla compleja de gases, líquidos y sólidos, existiendo cantidades combinadas de

nitrógeno, oxígeno y azufre, además de contener compuestos de hierro, níquel, vanadio u otros metales. El petróleo tiene una proporción de 76 a 86% de carbono y de 10 a 14% de hidrogeno.

2.2.1.1 Composición general del petróleo

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que contiene principalmente carbono e hidrógeno en cantidades que varían entre 86% y 14% respectivamente, en la mezcla que lo constituye, los hidrocarburos coexisten en fase sólida, líquida y gaseosa, la composición elemental está condicionada por predominancia de los compuesto: 84 - 87% de carbono, 11 - 14% de hidrógeno, 0,8% de azufre y de 0,4% de oxígeno y nitrógeno, metales como níquel y el vanadio entre otros metales.

Los hidrocarburos componen la familia predominante de compuesto (50 – 98% de la composición), por lo que constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimientos ambientales. La gran mayoría son alcanos de cadena lineal (n - alcanos o parafinas), alcanos ramificados (menor cantidad), cicloalcanos (naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos.

Los hidrocarburos del petróleo pueden dividirse en cuatro categorías: en la fracción saturada (n - alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y cicloparafinas); fracción

aromática (monoaromáticos, diaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)); fracción de resinas y fracción de asfaltenos que son menos abundantes y consisten en compuesto más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular (9).

Tabla N°1: Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo

Fracción	Composición
Saturados	<i>n</i> -alcanos, alcanos de cadena ramificados e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

Fuente: Quiroga Flores Roxana. (2011)

Cada una de las categorías agrupa compuestos con características de solubilidad, volatilidad y toxicidad propias. Desde un punto de vista de biodegradabilidad, los hidrocarburos pueden ordenarse de mayor a menor degradabilidad en: alcanos lineales > alcanos ramificados > aromáticos ligeros > alcanos cíclicos > aromáticos pesados > compuesto polares.

A). Composición por familia de hidrocarburos

Los hidrocarburos de un crudo de petróleo agrupan los compuestos en las siguientes familias:

Parafinas volátiles: Representa hasta un 30% del crudo de petróleo. Son n - alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C1 a C10. Es la fracción, más volátil del crudo y por lo tanto la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización. La fracción gas natural contiene, principalmente C1 a C5. Los isoprenoides volátiles, están representados principalmente por el isobutano e isopentano. Los isoprenoides volátiles también pueden llegar hasta C10 (2,6 - dimetiloctano).

Parafinas no volátiles: Se definen como aquellos n - alcanos e isoprenoides entre C11 y C40. Los n - alcanos oscilan entre C11 y C40, aunque se han descrito cadenas más largas y pueden constituir entre el 15 y 20% de crudo no degradado, mientras que los isoprenoides varían de C12 a C22 y constituyen entre 1 - 2 % del crudo, llegando a 15% en crudos degradados. Los componentes entre C11 y C15 son de volatilidad intermedia.

Naftenos: Esta familia está compuesta por las cicloparafinas o cicloalcanos. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31% de crudo.

Los compuestos mono y di cíclicos corresponden entre el 50 - 55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%.

Olefinas: son alquenos, los cuales están poco presentes en el crudo de petróleo, adquieren importancia en los productos resultantes del refinado, ya que se generan durante el proceso de *cracking*, existiendo hasta un 30% en gasolinas y un 1% en fueles.

Aromáticos: El crudo de petróleo contiene una mezcla muy compleja de hidrocarburos aromáticos. Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Así se encuentran hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos).

✓ *Hidrocarburos monoaromáticos*. Se encuentran el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad. El benceno, tolueno, etilbenceno y los tres isómeros de xileno, son de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad, y por su abundancia en los compuestos fósiles.

✓ *Hidrocarburos poliaromáticos*: Entre los hidrocarburos diaromaticos, encontramos el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetrametilnaftalenos). Constituyen la gran mayoría de la familia de hidrocarburos aromáticos presentes en un crudo.

Entre los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos, encontramos el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados. El fenantreno y los metilfenantrenos, representan los componentes mayoritarios de los triaromaticos. Los hidrocarburos poliaromáticos de más de tres anillos, encontramos el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencénico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), pireno y benzo(a)pireno (5 anillos aromáticos) y coroneno (un HAP pericondensado con 6 anillos).

Resinas y asfáltenos: son compuestos de alto peso molecular, las estructuras son mezclas complejas, integradas por núcleos policiclicos o naftenoaromáticos. Contiene cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre (componentes NOS del petróleo) y a veces están asociadas con pequeñas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel. Constituyen entre un 10% en crudos poco degradados o ligeros, hasta un 60% en crudos muy degradados. Es la fracción que presenta una mayor recalitrancia de un crudo de petróleo. Se trata de agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenoles, sulfóxidos,

amidas, HAP sulfuros, ácidos naftenicos, ácidos grasos, metaloporfirinas y fenoles polihidratados. (9)

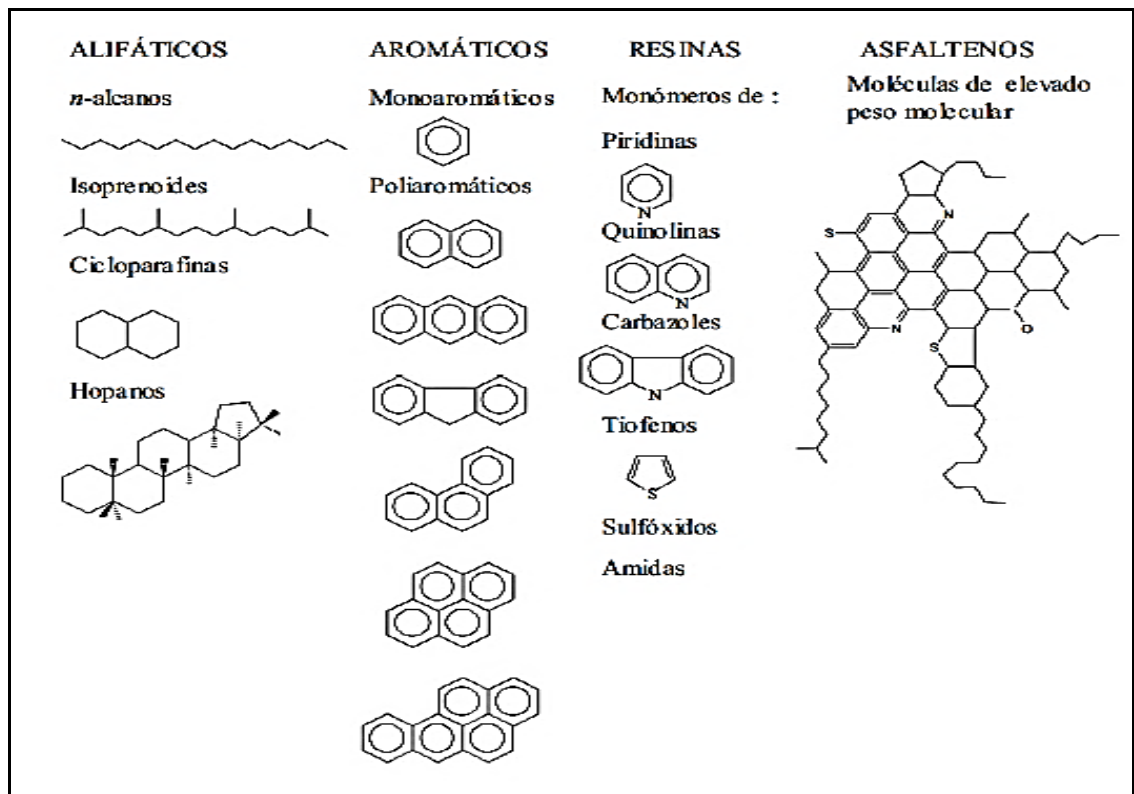


Figura N° 1: Estructura químicas de diferentes compuestos del petróleo
Fuente: Torres Delgado Katerine. (2009)

2.2.1.2 Efecto toxico de alcanos y aromáticos

A). Efecto toxico de alcanos

En el caso de los alcanos, como casi todos los disolventes orgánicos deprimen el SNC y causan mareos e incoordinación motora. Se caracterizan por una volatilidad intermedia y una baja viscosidad. En general tiene un bajo poder toxico y se necesitan altas concentraciones en el ambiente para que produzcan depresión central. A medida

que aumenta el número de carbonos en su estructura, disminuye la concentración necesaria para producir el efecto depresor del SNC.

Dentro de las consecuencias, se tiene. Irritación de la piel, mucosas y ojos. La polineuropatía es el tóxico primario del n - hexano, disolvente de uso común en la industria del cuero y del calzado. Esto se observó por primera vez en 1973 en Japón, donde se afectaron 93 trabajadores dedicados a la fabricación de sandalias, por el uso de una cola que contenía al menos un 60% de n - hexano. Los síntomas clínicos comprenden disfunción sensorial simétrica de las partes distales de las extremidades, que llega a la debilidad muscular de los dedos de las manos y pies y la pérdida de los reflejos sensitivos profundos. En general, el pronóstico de recuperación es favorable, aun cuando el trastorno se puede intensificar durante algunos meses. La causa de la neuropatía periférica relacionada con la exposición a este disolvente parece ser la biotransformación por medio del citocromo P- 450 del n - hexano a 2,5 - hexadiona (9).

B). Efectos toxico de los aromáticos

El fenantreno es un hidrocarburo aromático polinuclear con anillos condensados que forma fenantreno quinona cuando se oxida, y 9,10-dihidrodiol cuando se reduce. Los efectos tóxicos del antraceno son similares a los del alquitrán e hulla

y sus productos de destilación y dependen de la proporción de fracciones pesadas que contenga. El fenantreno es fotosensibilizante produce dermatitis aguda y crónica con síntomas de quemazón, picor y edema, que son más pronunciados en las regiones de la piel expuesta. Las lesiones cutáneas se asocian a irritación de la conjuntiva y de las aéreas superiores. Otros síntomas son lagrimeo, fotofobia, edema de los párpados e hiperemia conjuntival. Los síntomas agudos desaparecen varios días de cesar el contacto. La exposición prolongada causa pigmentación de las zonas de piel expuesta. El efecto fotodinámico del fenantreno industrial es más pronunciado que el del fenantreno puro, lo que evidentemente se debe al uso de mezclas de acridina, carbazol, fenantreno y otros hidrocarburos pesados, los efectos sistémicos se manifiestan en cefalea, náuseas, inapetencia, reacciones lentas y adinamia. Las exposiciones prolongadas pueden causar inflamación del tracto gastrointestinal. No se ha demostrado que el fenantreno puro sea cancerígeno, pero algunos de sus derivados y el fenantreno industrial (que contiene impureza) si lo son.

La toxicidad de los compuestos aromáticos se fundamenta en su elevada hidrofobicidad y su facilidad de intercalarse en las membranas biológicas, desorganizándolas. Algunos compuesto aromáticos, además son carcinogénicas, porque

son incorporadas al ADN de forma errónea por la maquinaria enzimática de duplicación de los ácidos nucleídos (9).

2.2.1.3 Hidrocarburos y la contaminación

Las características determinantes de los hidrocarburos en el ambiente son las siguientes: densidad, presión de vapor, coeficiente de partición de suelo, polaridad, electronegatividad, hidrofobicidad y solubilidad en agua.

Desde el inicio de la actividad petrolera, el entorno en el que se desarrolla, se ve afectado por numerosas intervenciones que dañan severamente el medio ambiente. Las huellas más evidentes que se encuentran en todo el planeta donde se ha dado extracción de petróleo, frecuentemente han sido ocasionadas por accidentes en tanques de almacenamiento o en oleoductos. Sin embargo los accidentes que son los acontecimientos más notorios no son las únicas fuentes de contaminación o degradación del medio, ni siquiera las más importantes.

Todas las actividades que están envueltas en la exploración y explotación del petróleo provocan impactos potencialmente negativos sobre el medio ambiente y sobre las personas que lo usan o que están en contacto con él.

Gran parte de los ecosistemas afectados por la exploración y explotación de hidrocarburos cuentan con formas de vida muy diversas y complejas (10).

A). Formas de contaminación por la operación petrolera

La operación sísmica. Es una de las más utilizadas en la etapa de exploración y consiste en la medición de las ondas de resonancia que produce la detonación de cargas dinamita. Esto significa que la zona explorada queda completamente llena de agujeros dinamitados, al encontrarse el lugar donde probablemente se puede dar la explotación del mineral, se procede a abrir los pozos exploratorios.

✓ *La fase exploración.* Durante este proceso son utilizados lodos químicos, los cuales son altamente contaminantes, para la mayor penetración en el terreno de los taladros que deben ser enfriados constantemente con agua. También se construyen piscinas para depositar las aguas acidas y los lodos contaminados que salen junto con el petróleo. Esta fase altera el equilibrio natural, ya que requiere de grandes cantidades de agua del lugar y aumenta los niveles de contaminación. También en las perforaciones se producen lodos con metales pesados y tóxicos como cadmio, cobre, arsénico, mercurio y plomo.

✓ *La fase de extracción.* Comienza cuando algunos de los pozos exploratorios toca un yacimiento. En tierra o en mar las operaciones a realizarse en esta etapa alteran el ambiente natural y lo contaminan. Esta etapa presenta riesgos adicionales de accidentes, relacionados con gases tóxicos, aguas acidas y los depósitos de crudo.

✓ *El transporte.* Se da después de la extracción del crudo. El transporte del crudo es una de las etapas más riesgosas y costosas en términos de destrucción ambiental. Desde que se transporta el crudo masivamente, son millones de barriles que se han derramado en zonas selváticas, ríos, lagos y mares. Las consecuencias de tales derrames continúan afectando estos ecosistemas muchos años después.

Dentro de las etapas de exploración y explotación también se da una compactación de los suelos por la maquinaria pesada donde por la pérdida de vegetación, se produce una erosión y contaminación de los suelos de la zona. Los microorganismos del suelo son alterados por la contaminación con hidrocarburos, desapareciendo o disminuyendo las especies menos resistentes sin dejar atrás las altas tasas de mutaciones. Las alteraciones al suelo producen cambios en el pH de este y del agua, que pueden causar un deterioro crónico de los ecosistemas. Por lo tanto un manejo

inadecuado de dichas fuente energética puede causar problemas de gran envergadura socio - ambiental (10).

2.2.1.4 Efecto de los hidrocarburos en los seres vivos

Debido a la variedad de la composición de los hidrocarburos, los efectos en los seres vivos son muy diversos, y dependen de factores como el tipo de compuesto químico, la cantidad vertida y el tiempo de exposición. Según el tipo de hidrocarburo se puede estimar la intensidad de los daños y efectos, así combustibles ligeros como la gasolina y el queroseno resultan más tóxicos que los medianos y pesados como el Diesel o Fuel Oil, debido a que contiene grandes cantidades de hidrocarburos saturados y bajo contenido de compuestos polares (11).

A). Efectos de la contaminación por hidrocarburos en el ser humano

Las vías de ingreso de los hidrocarburos al cuerpo de las personas pueden ser, por vía respiratoria cuando se inhala y cuando se ingiere con los alimentos, por contacto directo. Cuando ingresan por vía dérmica los contaminantes son absorbidos más lentamente que cuando son inhalados o ingeridos.

Luego de ingresar estos son ampliamente distribuidos por la sangre y se transforman rápidamente en compuestos químicos, pudiendo resultar más dañinos así como menos

peligroso, esto en función de factores como el tipo de composición y la cantidad expuesta de hidrocarburos; la mayoría de los hidrocarburos abandonan el cuerpo a través de la orina o con el aire exhalado.

Los constituyentes de los hidrocarburos de bajo peso molecular (benceno, tolueno, xileno) afectan el sistema nervioso central, causan irritación de la piel, dolores de cabeza, náuseas, hormigueos en manos y pies, cuando la exposición es alta pueden provocar la muerte.

Los principales peligros provenientes de elevadas concentraciones de hidrocarburos en general, están relacionados a los hidrocarburos aromáticos (HAPs) principalmente por sus efectos cancerígenos. Se ha demostrado que el benceno es responsable de causar cáncer (leucemia) en los seres humanos, además la gasolina y benzopirenos son considerados como cancerígenos para humanos. El n - hexano afecta el sistema nervioso central de una forma diferente, causando un desorden nervioso llamado “neuropatía periférica” caracterizada por el entumecimiento de las extremidades y en casos graves, parálisis.

Cuando se ingiere gasolina y keroseno, se produce irritación en la garganta y estómago, depresión del sistema central, dificultad para respirar y neumonía. Compuestos como el antraceno, pireno, fenantreno, benzopirenos, causan la

irritación de la piel, cáncer de piel, testículos y pulmones, siendo los alcanos presentes en la gasolina depresores del sistema nervioso central.

Según algunos estudios realizados en las poblaciones a instalaciones petroleras, zonas aledañas a instalaciones petroleras y zonas contaminadas por hidrocarburos; se afirma que existe una relación directa entre la exposición a los hidrocarburos con una mayor prevalencia de enfermedades, las mismas que se pueden manifestar a corto y largo plazo en la población (11).

Tabla N° 2: Afectaciones a la salud

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (PPM)	TIEMPO (HORAS)	SINTOMATOLOGÍA	OBSERVACIONES
Benceno	100	>3	Fatiga Dolor de cabeza nauseas adormecimiento	Cuando la exposición cesa, los síntomas desaparecen
n – hexano	500 - 2500	>24	Afectación al sistema nervioso central “neuropatía periférica” característico por pérdida de la sensación en los pies piernas.	En casos graves produce parálisis. Exposición al compuesto en el aire.
Gasolina, Diesel, Kerosén			Irritación a la garganta y estómago. Depresión del sistema nervioso. Dificultad al respirar. Neumonía.	Debido a la ingestión.

Fuente: Moreira Isofía Belén Estrella et. al. (2011)

B). Daños a la fauna y flora

La contaminación por hidrocarburos afecta a los animales desde los mamíferos, aves, peces, almejas, moluscos e insectos, cuando los derrames de petróleo son sobre cursos de agua afectan de manera especial a la avifauna acuática, impidiéndoles nadar, alimentarse y con frecuencia volar. Numerosos estudios realizados en animales de laboratorio y animales libres, demuestran que la exposición al petróleo causa lesiones en distintos órganos, cáncer, efecto en la reproducción e incluso su muerte. En los estudios realizados a los animales se presentan los siguientes efectos:

- ✓ En las aves ha presentado efectos negativos sobre la capacidad reproductiva.
- ✓ En estudios realizados en patos que han ingerido crudo se ha observado anemia hemolítica.
- ✓ Algunos estudios en ratas han confirmado la presencia de tumores en la piel, por la exposición al crudo, además se han presentado cambios funcionales en las células hepáticas de las ratas.

También se produce destrucción de los hábitats, de especies endémicas, pérdida de la diversidad de las comunidades faunísticas que habitan cerca de lugares contaminados con hidrocarburos. En cuando a la afección a la flora se producen los siguientes daños:

- ✓ Efectos negativos en la reproducción y propagación de la flora.
- ✓ Destrucción de las fuentes alimentarias de las especies superiores.
- ✓ Incorporación de carcinógenos en la cadena alimentaria.
- ✓ Pérdida de parajes con valor natural, recreativo o vacacional (11).

2.2.1.5 Microorganismos degradadores de hidrocarburos

Los microorganismos son fundamentales en los procesos de biorremediación, en gran parte, las bacterias casi siempre son los degradadores primarios, aunque en algunas ocasiones los hongos juegan un papel importante.

En la degradación de los hidrocarburos del petróleo, se encuentran consorcios de microorganismos, incluyendo procariontes y eucariontes. Las bacterias y hongos son los organismos dominantes en la degradación de compuestos del petróleo en ecosistemas acuáticos y terrestres.

Se han aislado numerosas cepas bacterianas que pueden degradar alcanos y utilizarlos como fuentes de carbono y energía. La mayoría de estas bacterias pertenecen a Alfa – beta y gamma proteobacteria, dentro de las gran positivas, destaca el grupo *Actinobacteria*. Las bacterias del suelo capaces de degradar hidrocarburos del petróleo más comunes pertenecen al género

Pseudomonas otros degradadores de alcanos son de los géneros *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Paracoccus*, *Serratia*, *Actinetobacter*, *Alcaligenes*, *Ochrobactrum*, *Stenotrophomonas*, *Yersinia*, *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Dietzia*, *Gordonia* y *Microbacterium*. Los géneros más comunes de hongos son: *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula*, *Cándida* y *Sporobolomyces* (12).

Tabla N° 3: Géneros más comunes de hongos y bacterias con capacidad degradativa en petróleo.

Géneros de Bacterias		Género de Hongos	
<i>Chomobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Gliocladium</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Asperigillus</i>	<i>Graphium</i>
<i>Cytophaga</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Humicola</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Proteus</i>	<i>Beauveria</i>	<i>Monilia</i>
<i>Achromobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Mortierela</i>
<i>Enwinia</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Candida</i>	<i>Paecilomyces</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Chryso sporium</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Spirillum</i>	<i>Cladosprium</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Saccharomyces</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Cochlobolus</i>	<i>Spicardia</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Tolypocladium</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Beneckea</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Thrichoderma</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Coryneforms</i>	<i>Fusarium</i>	<i>Verticillium</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Geotrichum</i>	
<i>Lactobacillus</i>	<i>Leumthrix</i>		
<i>Moraxella</i>	<i>Peptococcus</i>		
<i>Spherotilus</i>			

Fuente: Cando Rodríguez Miguel Ángel. (2011)

A). Propiedades de algunos microorganismos hidrocarbonoclastas.

Uno de los géneros bacterianos más explotados en bioprocesos no convencionales es *Rhodococcus*, un grupo único consistente en microorganismos que presentan una gran diversidad metabólica, capaz de transformar, biodegradar y utilizar como única fuente de carbono compuestos hidrófobos. Los *Rhodococcus* poseen una gran variedad de vías metabólicas para la degradación y modificación de compuestos aromáticos, incluyendo las actividades de Di - oxigenasa y mono - oxigenasa sobre anillos, así como la actividad de ruptura de catecol. Algunas cepas presentan también la vía del 3 - oxodipato. Lo anterior sumando a su capacidad de crecimiento en medios con escasos nutrientes, la carencia de un sistema de represión catabólica y su persistencia ambiental las hacen excelentes candidatas para los tratamientos de biorremediación.

Dentro de las aplicaciones industriales y ambientales, se incluyen la producción de ácido acrílico y acrilamida, conversión de esteroides, biorremediación de hidrocarburos clorados y fenoles, a lo que se añade su gran capacidad de degradar hidrocarburos alifáticos halogenados y numerosos compuestos aromáticos, como los HAPs.

Nuevas especies de *Rhodococcus* que presentan una nueva mutación tienen la capacidad de degradar compuestos alifáticos con enlaces dobles principalmente en el noveno carbono del grupo metilo terminal (alquenos).

Las bacterias del género *Pseudomonas* poseen la habilidad para utilizar diversos sustratos, incluyendo aquellos creados por el petróleo. Las *Pseudomonas* son bacterias Gram positivas y productoras de biosurfactantes. Algunos microorganismos productores de biosurfactantes extracelulares solubilizan y facilitan la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular hidrolítica; contiene además enzimas degradadoras de hidrocarburos en la membrana citoplasmática.

La *Pseudomona aeruginosa*, es otro de los microorganismos más usado y estudiado en biorremediación. Estudios con relación al desempeño metabólico de esta *Pseudomona* ha permitido identificarla como degradadora de gran cantidad de sustratos con el n - hexadecano, mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaeróbicos y degradadora de hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos.

La *Pseudomona putida* es un saprófito del suelo oportunista, cosmopolita, metabólicamente versátil, por poseer una

dioxigenasa inicial, una tolueno dioxigenasa, aunque no presenta la dioxigenasa específica para los HAPs por lo cual es una buena candidata para las aplicaciones biotecnológicas, tales como agricultura, biorremediación, biocontrol en protección de las plantas y producción de bioplásticos.

El *Acinetobacter sp.* Es un bacilo Gram negativo, es productor de ácido a partir de la glucosa, se desarrolla a 41 y 44°C, produce a - xilosa y utiliza el malato. Dentro las especies de importancia ambiental se destacan, *A. baumannii*, *Acinetobacter calcoaceti*us carente de ácido metílico. Las cepas de *Acinetobacter baumannii* son eficientes en la degradación de fracciones de alcanos (8).

2.2.2 BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es una tecnología basada en la biodegradación transformación microbiana de contaminantes para eliminarlos o transformarlos en otros productos menos peligrosos para el medio ambiente y la salud humana. Idealmente los productos son convertidos en CO₂, agua sales inorgánicas y/o biomasa, pero a menudo una parte del contaminante se puede acumular como producto de transformación parcial.

La degradación es un proceso que se produce de forma natural en el medio ambiente y la biorremediación intenta potenciarlo. Se trata de una

tecnología económica, aplicable en suelos, aguas y que no requiere grandes infraestructuras.

En el sentido más amplio, la biorremediación incluye el uso de enzimas, estimulantes del crecimiento, bacterias, hongos o levaduras para degradar, transformar, secuestrar o movilizar contaminantes orgánicos, inorgánicos, o metales en el suelo, agua o aire.

Los tratamientos biológicos han sido utilizando por muchos años y son importantes para el tratamiento de aguas residuales, tanto industriales como urbanas, pero ha sido en los últimos tiempos cuando han empezado a implementarse de forma habitual en tratamiento de aguas subterráneas y suelos (12).

2.2.2.1 Antecedentes históricos de la biorremediación

A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes. Este uso intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación. Las primeras técnicas que se aplicaron fueron similares al *“Landfarming”* (labranza) y fueron desarrolladas por compañías petrolíferas.

Las primeras patentes, fundamentalmente para remediación de vertidos de gasolina, aparecen en los años 70. En los años 80 se generalizó el uso del aire de peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas mejorando la eficiencia de los procesos

degradativos. Durante los años 90 el desarrollo de las técnicas de “*air sparging*” (burbujeo de oxígeno) hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático. Al mismo tiempo, la implementación en la práctica de aproximaciones experimentales en el laboratorio permitió el tratamiento de hidrocarburos clorados, los primeros intentos con metales pesados, el trabajo en ambientes anaeróbicos. Paralelamente, se desarrollaron métodos de ingeniería que mejoraron los rendimientos de las técnicas más populares para suelos contaminados (“*landfarming*”, “*composting*”).

En la actualidad, la biorremediación enfrenta un nuevo reto. El de convencer a las compañías y a los organismos oficiales de su alto potencial. En algunos países, la biorremediación fue una técnica poco reconocida y marginada, hoy en día se ha convertido en una verdadera industria (10).

2.2.2.2 Factores que condicionan la biorremediación

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores, los cuales pueden clasificarse en cuatro grupos: medio ambientales, físicos, químicos y microbiológicos.

A). Factores ambientales

Los factores medio ambientales son aquellos necesarios a la hora de proporcionar las condiciones óptimas para el

crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la recuperación. Los microorganismos son muy sensibles a los cambios de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes, oxígeno y humedad.

✓ *El pH.* Afecta significativamente la actividad microbiana.

En consecuencia, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos existentes, potencialmente mayor será el rango de tolerancia. No existen condiciones establecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales el crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es dentro de un intervalo de pH entre 6 y 8. En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6 - 8), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4 - 5). El pH óptimo establecido para procesos de biodegradación es neutro (pH 7,4 - 7,8).

Así mismo el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo. La acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando azufre o compuestos del azufre.

✓ *Temperatura.* Es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de degradación.

Generalmente, las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre 20 y 30°C (condiciones mesófilas), decreciendo la degradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40°C e inhibiéndose a inferiores a 0°C. Sin embargo, también se ha dado la biodegradación de hidrocarburos a temperaturas extremas: 10°C en suelos subárticos y subalpinos; 5°C en suelos árticos; 60°C por una cepa termófila de *Bacillus stearothermophilus* aislada de suelos contaminados con crudo de petróleo de desierto Kuwaití.

- ✓ *Humedad.* Los microorganismos requieren condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte de protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo. Por esta razón, la humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. No obstante el nivel óptimo de humedad depende de las

propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica.

✓ *El oxígeno.* Es el aceptador final de electrones generalmente empleado en procesos biológicos y también es necesario en determinados tipos de reacciones de oxidación – reducción catalizada por enzimas. Los microorganismos, oxidan compuestos orgánicos o inorgánicos, obteniendo así la energía necesaria para su crecimiento. El proceso de oxidación da lugar a electrones que intervienen una cadena de reacciones en el interior de la célula y, al final, deben ser vertidos en el entorno. El aceptador final de electrones es el receptor de los mismos y en el caso de un metabolismo aerobio, O_2 es aceptador y H_2O es el producto.

La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica (O_2 como aceptador final de electrones), ya que en ausencia de O_2 y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Mn^{4+} y Fe^{3+}) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas.

✓ Necesidad de nutrientes inorgánicos. El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y estos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y sintetización. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno , por tanto, las concentraciones asimilables de dichos elementos presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y SO_4^{2-} ya están presentes en cantidades suficientes.

La adición de fuentes de nitrógeno y fósforo inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados. Las proporciones molares de C: N: P, descritas en la bibliografía, respecto al contenido de carbono a degradar son muy distintas; el rango normal de C: N: P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1.

Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de nitrógeno y fósforo al suelo es beneficioso para los procesos de biodegradación, de igual manera, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación. Para evitar el exceso de nutrientes, así como la pérdida de los mismos por lixiviación, también se han utilizado fertilizantes inorgánicos oleofílicos de liberación lenta para la biodegradación de suelos contaminados. Además es importante destacar que la adición de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo. (El amonio se puede unir a las arcillas por intercambio y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio).

B). Factores físicos

Los factores físicos de mayor importancia en la biorremediación son la biodisponibilidad, la presencia de agua y la provisión de un aceptor de electrones adecuado, por ejemplo el oxígeno. (Ya descrito anteriormente)

- ✓ *Biodisponibilidad.* La tasa de degradación depende tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo microbiano, como de la transferencia de masas del compuesto. La relación entre estos factores se conoce

como biodisponibilidad. En los suelos uno de los factores limitantes para la biodegradación es la transferencia de masas, ya que los microorganismos de los suelos contaminados, suelen tener amplias capacidades biodegradativas al estar expuestos a una gran variedad de compuestos orgánicos diferentes. Por lo tanto la absorción, la adsorción, desadsorción, disolución y la difusión son fenómenos, propios de la transferencia de masas, que condicionan la biodisponibilidad de los contaminantes. Un fenómeno que afecta envejecimiento que se define como la pérdida de la biodegradabilidad de los compuesto a lo largo del tiempo en el suelo (aunque la población microbiana mantenga intacto su potencial catabólico), el cual es más importante en suelos con elevado contenido en materia orgánica.

- ✓ *Presencia de agua.* Esta es necesaria, como se ha visto con anterioridad, los microorganismos toman el carbono orgánico, los nutrientes inorgánicos y los aceptores de electrones, necesarios para el crecimiento microbiano, de la fase líquida. Por lo tanto, el agua debe estar en contacto con los contaminantes estar presente en cantidades que permitan el desarrollo de las comunidades microbianas. Sin embargo, el agua puede

llegar a inhibir el flujo de aire y reducir el oxígeno necesario para la respiración microbiana. Existen valores de humedad óptima para biorremediación de terrenos no saturados, que habitualmente están entre 150 y 250 grados de agua por Kg de terreno seco.

C). Factores químicos

El factor químico más importante en la biorremediación es la estructura molecular del contaminante, como esta afecta a sus propiedades químicas y físicas y su capacidad para ser biodegradado. La capacidad para ser biodegradado está relacionada con factores tales como la solubilidad, el grado de ramificación, el grado de saturación y la naturaleza y el efecto de los sustituyentes.

✓ *Estructura química.* La inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular. Siendo los parámetros que más van a afectar a la estructura química son la halogenación, la existencia de ramificaciones, la baja solubilidad en el agua y la diferente carga atómica.

De las distintas familias de hidrocarburos del petróleo, los n - alcanos y los alcanos ramificados (isoprenoides) de cadena intermedia (C10 – C20) son los sustratos más

fácilmente degradables por los microorganismos del suelo y por lo tanto tienden a ser eficazmente biodegradados. Sin embargo los alcanos de cadena larga (>C 20) son más difíciles de degradar debido a su (elevado peso molecular) y su baja solubilidad en agua. Los cicloalcanos, por norma general, se degradan más lentamente que los n - alcanos y alcanos ramificados. De igual forma, los HAPs que contienen de 2 a 3 anillos aromáticos pueden ser biodegradados eficazmente en el suelo en condiciones ambientales óptimas, mientras que los HAP de 4 anillos, y especialmente, los de 5 o más anillos bencénicos presentan una mayor recalcitrancia inherente y una baja solubilidad. Las fracciones de resinas y asfáltenos son las que presentan una menor degradabilidad debido a las complejas estructuras químicas y al elevado peso molecular de sus moléculas.

D). Factores microbiológicos

El factor microbiológico más importante en la biorremediación es la transformación biológica de compuestos orgánicos, catalizada por acción de las enzimas. La biodegradación de un compuesto específico es frecuentemente un proceso que se realiza paso a paso en el cual se involucran muchas enzimas y muchos organismos. Las enzimas son específicas en términos de los compuestos que atacan y las reacciones que catalizan. Más de una enzima es normalmente requerida

para romper una sustancia orgánica. Frecuentemente, los organismos que tienen las enzimas para degradar están presentes en el suelo (10).

2.2.2.3 Degradación de los hidrocarburos

Gracias a estudios se pudo identificar el orden en el que se biodegradan los hidrocarburos del petróleo, siendo este el siguiente: alifáticos de cadena lineal, alifáticos de cadena ramificada, compuestos monoaromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) compuestos con dos o más anillos, los compuestos poliaromáticos.

La mayoría de los microorganismos que oxidan hidrocarburos llevan a cabo por vía aerobia las reacciones de óxido - reducción, teniendo como último aceptor de electrones al oxígeno, aunque también se encuentran microorganismos que requieren condiciones anaerobias para la oxidación de estos compuestos. Sin embargo, para la mayoría de los compuestos, la degradación más rápida y compleja ocurre en condiciones aerobias.

Tanto la vía aerobia como la anaerobia producen subproductos derivados de la oxidación incompleta del hidrocarburo, tales como alcoholes, dioles y cetonas. También pueden producirse ácidos orgánicos, como piruvico, cítrico y oxálico. La degradación microbiana de los compuestos orgánicos no siempre conduce a la mineralización sino a una biotransformación y los compuestos

que se producen pueden ser, en algunos casos, más tóxicos que el original.

La oxidación de hidrocarburos alifáticos, tanto por bacterias como por hongos, consiste en convertir la cadena hidrocarbonada del alcano en el ácido graso correspondiente mediante la oxidación del grupo metilo terminal. En presencia de oxígeno la cadena del alcano puede ser atacada por monoxigenasas o dioxigenasas, las cuales introducen uno o dos átomos de oxígeno en la molécula, formándose así un alcohol. Posteriormente, el alcohol es oxidado a un aldehído y después al ácido graso correspondiente. Una vez que el hidrocarburo se encuentra en forma de ácido graso, es utilizado en la ruta catabólica de la β -oxidación, donde se remueven unidades de dos carbonos para la formación de acetil-CoA, este es llevado hasta CO_2 y H_2O por el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, la oxidación de $\text{NADH}^+ \text{H}^+$ y FADH_2 generados por la oxidación de nutrientes se lleva a cabo en cadena respiratoria y como subproducto se produce ATP.

Los compuestos alifáticos insaturados (alquenos alquinos) son oxidados por vía aerobia por mecanismos similares a los utilizados para los alcanos. Sin embargo, los enlaces dobles o triples son más reactivos químicamente y pueden experimentar otro tipo de reacciones tales como oxidación e hidratación. Existen un sin número de rutas catabólicas de los hidrocarburos

que generalmente pueden llegar a intermediarios menos tóxicos para el ambiente (13).

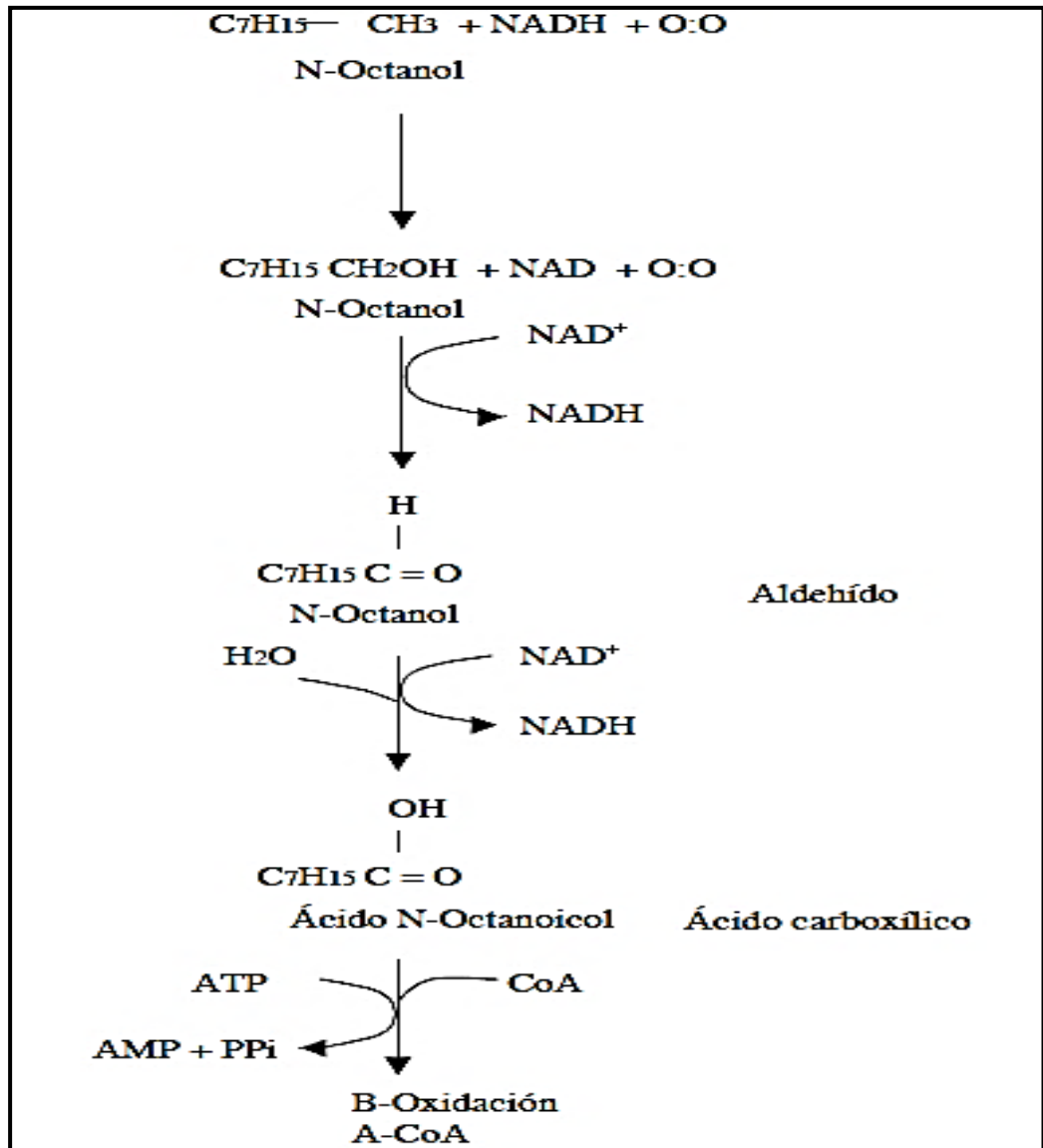


Figura N° 2: Degradación aeróbica de n - alcanos

Fuente: Lozano P. Nelly Patricia. (2005)

Los compuesto polares como las resinas y los asfaltenos, poseen estructuras químicas muy complejas que los convierten en compuestos recalcitrantes a la biodegradación, debido a su insolubilidad y a que presentan grupos funcionales que se

encuentran protegidos del ataque microbiano, además de estar constituidos por un gran número de anillos aromáticos. Sin embargo, algunos estudios han reportado la degradación de asfaltenos por cometabolismo, en presencia de alcanos alifáticos de 12 a 18 átomos de carbono.

Los compuestos aromáticos que poseen como estructura primaria la molécula de benceno, denominados BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), se encuentran como contaminantes frecuentes y constituyen un porcentaje elevado de la composición del petróleo.

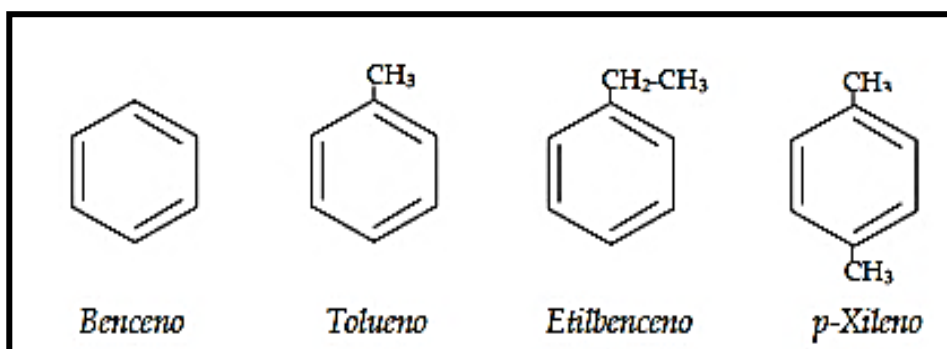


Figura Nº 3: Hidrocarburos monoaromáticos más comunes

Fuente: Díaz Ramírez Ildelfonso Jesús. (2000)

Su degradación se lleva a cabo mediante dos vías oxidativas: la activación del anillo, esto es, una dihidroxilación del núcleo aromático. Esta activación se lleva a cabo también por la acción de las enzimas mono o dioxigenasas. En la segunda fase, los dihidrodioles sufren una oxidación para formar derivados dihidroxilados, como el catecol, los cuales son precursores de la

ruptura del anillo por oxidación vía meta u orto, produciendo el semialdehído 2 - hidroximucónico y el ácido mucónico, respectivamente. Posteriormente, estos compuestos son oxidados para formar ácidos grasos que pueden ser utilizados por los microorganismos para la síntesis celular y la producción de energía.

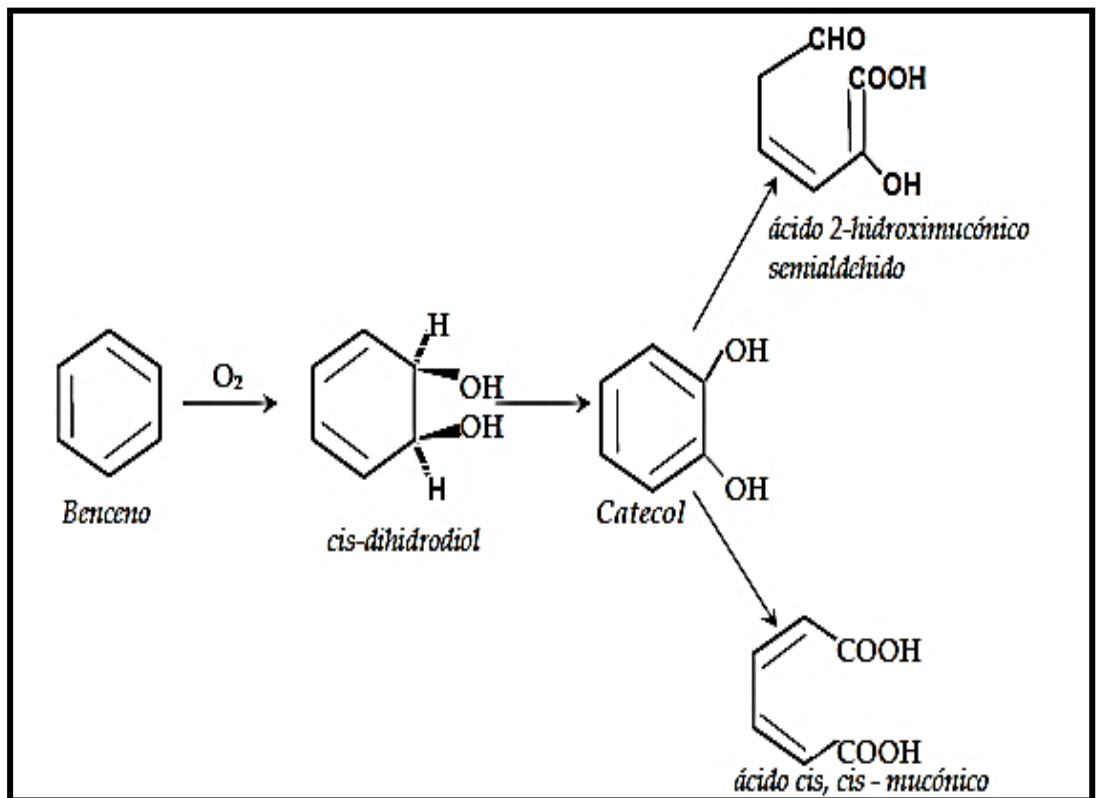


Figura N°4: Degradación aerobia del benceno a través del catecol como intermediario.

Fuente: Díaz Ramírez Ildelfonso Jesús. (2000)

Se sabe que los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son degradados, un anillo a la vez, por mecanismos similares a los de la degradación de los hidrocarburos aromáticos. Sin embargo, la biodegradación de los HAP tiende a disminuir conforme se incrementa el número de anillos que los constituyen y conforme

se incrementa el número de radicales alquilo que poseen. El metabolismo microbiano del naftaleno, fenantreno y antraceno ha sido estudiado ampliamente. La solubilidad que presentan en compuestos. Al utilizar cepas puras pueden formarse intermediarios tóxicos, pero el uso de cultivos mixtos o consorcios microbianos permite degradar estos intermediarios, favoreciendo la mineralización completa de los contaminantes. El sinergismo entre bacterias, hongos y levaduras provoca un incremento en la velocidad de oxidación de los hidrocarburos (13).

2.2.2.4 Ventajas y desventajas de la biorremediación

A). Ventajas

- ✓ Mientras que los tratamientos físicos y buena parte de los químicos están basados en transferir la contaminación entre medios gaseoso, líquido y sólido, en la biorremediación se transfiere poca contaminación de un medio a otro.

- ✓ Es una tecnología poco invasiva y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos que signifiquen una amenaza para el medio.

- ✓ Comparativamente, es económica viable y al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública.

B). Desventajas

- ✓ La biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos inaceptables, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto de partida y algunos compuestos contaminantes son tan resistentes que pueden incluso inhibir a biorremediación.

- ✓ Es difícil el tiempo requerido para un proceso adecuado y el seguimiento y control de la velocidad y/o extensión del proceso es dispendioso (10).

2.3 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS:

- ❑ **Abiótico:** Que carece de vida. Se dice que los factores no vivos que conforman un ecosistema, tales como el clima, el suelo, etc.

- ❑ **Ambiente:** Conjunto de elementos bióticos y abióticos y fenómenos físicos, químicos y biológicos que condicionan la vida, el crecimiento y la actividad de los organismos vivos.

- ❑ **Biodegradación:** Es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos.

- ❑ **Biodegradable:** Propiedad de toda materia de tipo orgánico de poder ser metabolizado por medios biológicos.

- ❑ **Biorremediación:** Es el proceso en el que se emplean organismos biológicos para resolver problemas específicos medio ambientales, como la contaminación.

- ❑ **Biótica:** propio de los seres vivos.

- ❑ **Cracking:** Desintegración del petróleo que consiste en la ruptura o descomposición de hidrocarburos de elevado peso molecular, como los contenidos en las fracciones de alto punto de ebullición del petróleo crudo, en compuestos de menor peso molecular, punto de ebullición más bajo.

- ❑ **Derrame de hidrocarburos:** Escape de hidrocarburos producidos por causas operacionales imprevistos o por causas naturales hacia los diversos cuerpos de agua y suelos.

❑ **Remediación ambiental.** Conjunto de acciones y técnicas con el objetivo de restaurar condiciones ambientales originales o mejoradas, sustancialmente en sitios contaminados y/o degradados como consecuencia de actividades humanas.

Sinónimos: rehabilitación ambiental, reparación ambiental, restauración ambiental.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1 Tipo de investigación

3.1.1 Método

- ✓ **Transversal:** Debido a que la recolección de datos se hizo desde setiembre a noviembre 2014.
- ✓ **Analítico:** Porque se han analizado las fuentes de selección con el fin de elaborar las conclusiones finales.
- ✓ **Científico:** Porque se han seguido todos los pasos que exige dicho método.

3.1.2 Técnica

- ✓ **Descriptivo:** Porque en este estudio se describe los pasos que se efectuaron en diferentes investigaciones que se seleccionaron sobre microorganismos degradadores de hidrocarburos.
- ✓ **Documental:** Esta investigación se basó en 15 artículos previamente seleccionados y relacionados directamente con el tema de diferentes orígenes tanto nacionales e internacionales.

3.1.3 Diseño

- ✓ **No experimental:** Porque solo es una investigación de carácter documental.

3.2 POBLACION Y MUESTRA DE LA INVESTIGACION

3.2.1 POBLACION

El presente trabajo consta de diecinueve artículos relacionados con el tema sobre microorganismos degradadores de hidrocarburos.

3.2.2 MUESTRA

Se trabajó con cuatro muestras seleccionadas sobre microorganismos degradadores de hidrocarburos.

3.3 VARIABLES E INDICADORES

Tabla N°4. Variables e indicadores

VARIABLE	INDICADOR
Microorganismos degradadores de hidrocarburos	Actividad biorremediadora

Fuente: Elaboración propia

3.4 TECNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE DATOS

3.4.1 TECNICAS

Se ha realizado revisión, análisis e interpretación de artículos, y publicaciones, donde se ha recopilado información relevante relacionada con el tema.

3.4.2 INSTRUMENTOS

Artículos de revistas científicas, tesis, libros y temas relacionados al trabajo de microorganismos degradadores de hidrocarburos. Elaboración de ficha de registro de datos.

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACION DE DATOS

4.1 RESULTADOS

Los análisis de datos se registraron en base a la metodología aplicada.

En la figura N° 5, se muestra los ensayos realizados en los países de Argentina, México y Venezuela, entre los años de 2004 - 2013 con muestras de suelo y agua. Donde se demostró la capacidad de ciertos microorganismos para degradar hidrocarburos, y así poder biorremediar el medio ambiente.

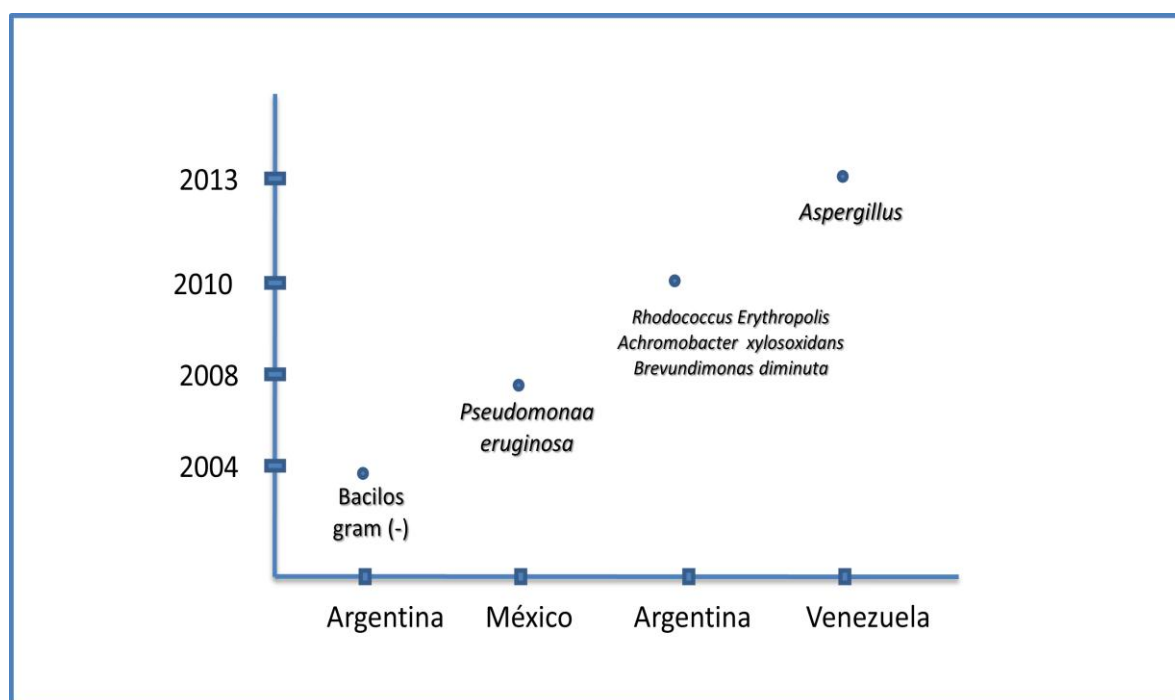


Figura N° 5. Capacidad de biodegradación de ciertos microorganismos

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla Nº 5, se muestra los ensayos realizados en los países de Argentina, México y Venezuela con muestras de suelo y agua. Por tal razón se analizó e interpretó los estudios realizados, por lo que se demostró la actividad biorremediadora.

Tabla Nº 5. Capacidad de biodegradación de ciertos microorganismos

ENSAYO	PAÍS	AÑO	MUESTRA	ANÁLISIS	INTERPRETACIÓN
1	Venezuela	2013	Agua	Capacidad de cepas fungicidas para biodegradar hidrocarburos (antraceno, fluorantero y pireno).	El género <i>Aspergillus</i> , es el que mayor potencial tiene para degradar hidrocarburos poliaromáticos (HPA).
2	Argentina	2010	Suelo	Sistema de biorremediación en actividad para determinar la capacidad de la comunidad bacteriana de biodegradar hidrocarburos (petróleo y destilados).	Capacidad de biodegradar los hidrocarburos son <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Achromobacter xylosoxidans</i> y <i>Brevundimonas diminuta</i> , fueron las bacterias que se encontraron con mayor frecuencia.
3	México	2008	Suelo	Capacidad de la <i>Pseudomona aeruginosa</i> MGP-1 para biodegradar hidrocarburos (n – alcanos).	El porcentaje más alto de degradación se obtuvo cuando la <i>Pseudomona aeruginosa</i> MGP-1 utilizó el C ₂₀ como fuente de carbono y energía.
4	Argentina	2004	Agua	Capacidad de las bacterias y su capacidad para biodegradar hidrocarburos.	Las bacterias degradadoras de hidrocarburos en la gran mayoría fueron bacilos Gram negativos.

Fuente: Elaboración propia

Interpretación: Venezuela y Argentina trabajaron con muestras de agua; Venezuela logró identificara *Aspergillus* (hongo), con capacidad potencial para degradar hidrocarburos poliaromáticos (HPA); Argentina logró identificar principalmente Bacilos Gram negativos. Sin embargo Argentina y México trabajaron con muestras de suelo; Argentina logró identificar a bacterias del género *Rhodococcus erythropolis*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Brevundimonas diminuta* con capacidad para degradar hidrocarburos en general; México logró identificar a la bacteria *Pseudomona aeruginosa* quien presentó un alto grado de degradación al utilizar al C₂₀ como fuente de Carbono y energía. Por lo tanto en los estudios de los países en mención se demostró que hay actividad biorremediadora por bacterias y hongos con capacidad para biorremediar el medio ambiente.

Tabla N° 6 Crecimiento de las cepas fungicidas en los sustratos de prueba

CEPA	GENERO	ESPECIE	FUENTE	Medio Czapek Dox complementado con				
				SACAROSA	CONTROL (-)	ANTRACENO	FLUORANTENO	PIRENO
U 2010-2C	<i>Aspergillus</i>	<i>Niger</i>	Agua ¹	++	-	+	+	+
U 2011-2 ^a	<i>Penicilium</i>	<i>Sp</i>	Ambiente ²	++	-	-	-	✓+
U 2010-27 ^a	<i>Aspergillus</i>	<i>Versicolor</i>	Agua ^a	++	-	++	++	++
U 2010-26C	<i>Aspergillus</i>	<i>Oryzae</i>	Madera ³	++	✓+	++	+	+
U 2011-5 ^a	<i>Acremonium</i>	<i>Sp</i>	Madera ^c	++	-	+	-	✓+
U 2010-2E	<i>Trichoderma</i>	<i>Sp</i>	Agua ^a	+	-	+	+	+
U 2010-1A	<i>Aspergillus</i>	<i>Nidulans</i>	Acíbar ⁴	++	-	++	+	++
U 2011-1A	<i>Fusarium</i>	<i>Solana</i>	Ambiente ^b	+	-	-	-	-
U 2010-1B	<i>Paecilomyces</i>	<i>Variotti</i>	Agua ^a	++	-	+	+	+
U 2011-3A	<i>Aspergillus</i>	<i>Flavus</i>	Madera ^c	++	-	+	-	+

Fuente: Petit A. *et. al.*

En el ensayo N° 1, se observa el crecimiento de las cepas en cultivos con HPA muestran que los hongos aislados de ambientes contaminados con petróleo crecieron en todos los HPA de prueba, las cepas del género *Aspergillus* generaron un mayor crecimiento por su capacidad para metabolizar HPA, a comparación de las demás cepas aisladas

¹ Aguas de servicio petrolero, Refinería Amuay;

² Ambientes cerrados, LAQ-UNEFM;

³ Podredumbre blanca de árboles;

⁴ Acíbar de *A. vera*. (++) Buen crecimiento; (+) Moderado crecimiento; (✓+) Escaso crecimiento; (-) No se observó crecimiento

En el ensayo N° 2, se observa, los análisis de los componentes principales de hidrocarburos en función a los microorganismos aislados, donde se determinó que hubo mayor diversidad de microorganismos aislados, donde *Rhodococcus erythropolis* fue característico del sistema con gasoil y *Pantoea agglomerans* del sistema con aceite lubricante. Tanto el sistema con kerosén como con petróleo, se asociaron más a los géneros bacterianos *Nocardia*, *Brevundimonas* y *Sphingobacterium*.

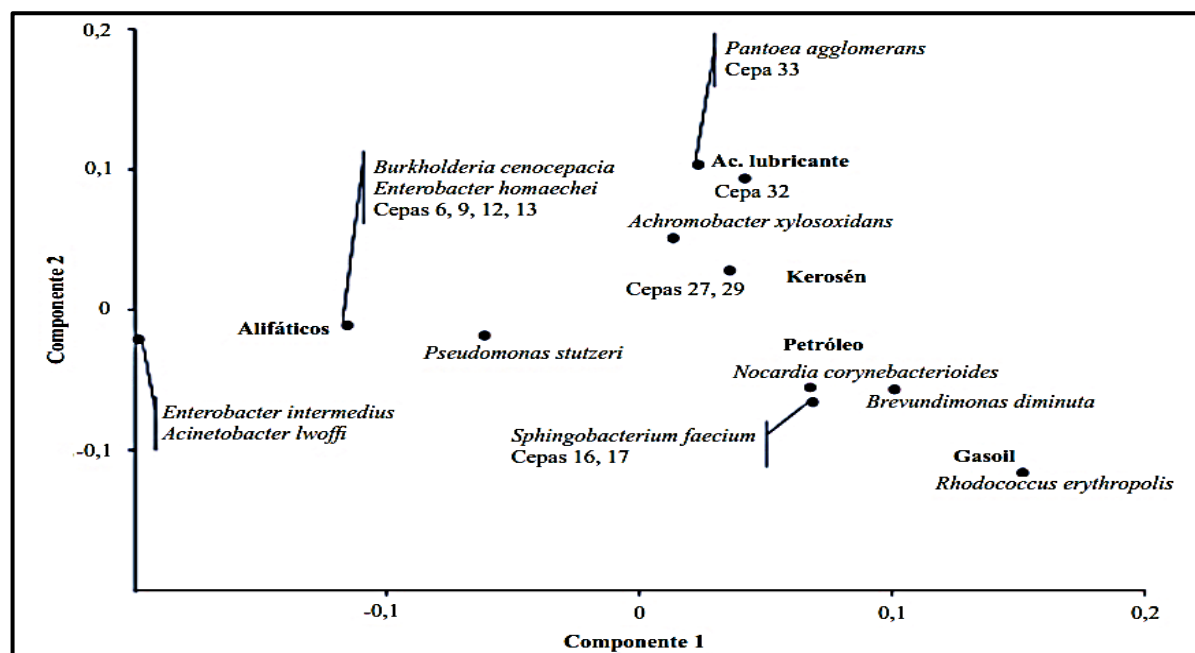


Figura N° 6. Análisis de componentes principales de los microorganismos identificados y las diferentes fuentes de carbono donde fueron aislados.

Autor: Acuña Adrián et. al. (2010)

En el ensayo N° 3, se observa el % más alto de degradación cuando la *Pseudomona aeruginosa* MGP-1 utilizo el C₂₀ como fuente de carbono y energía

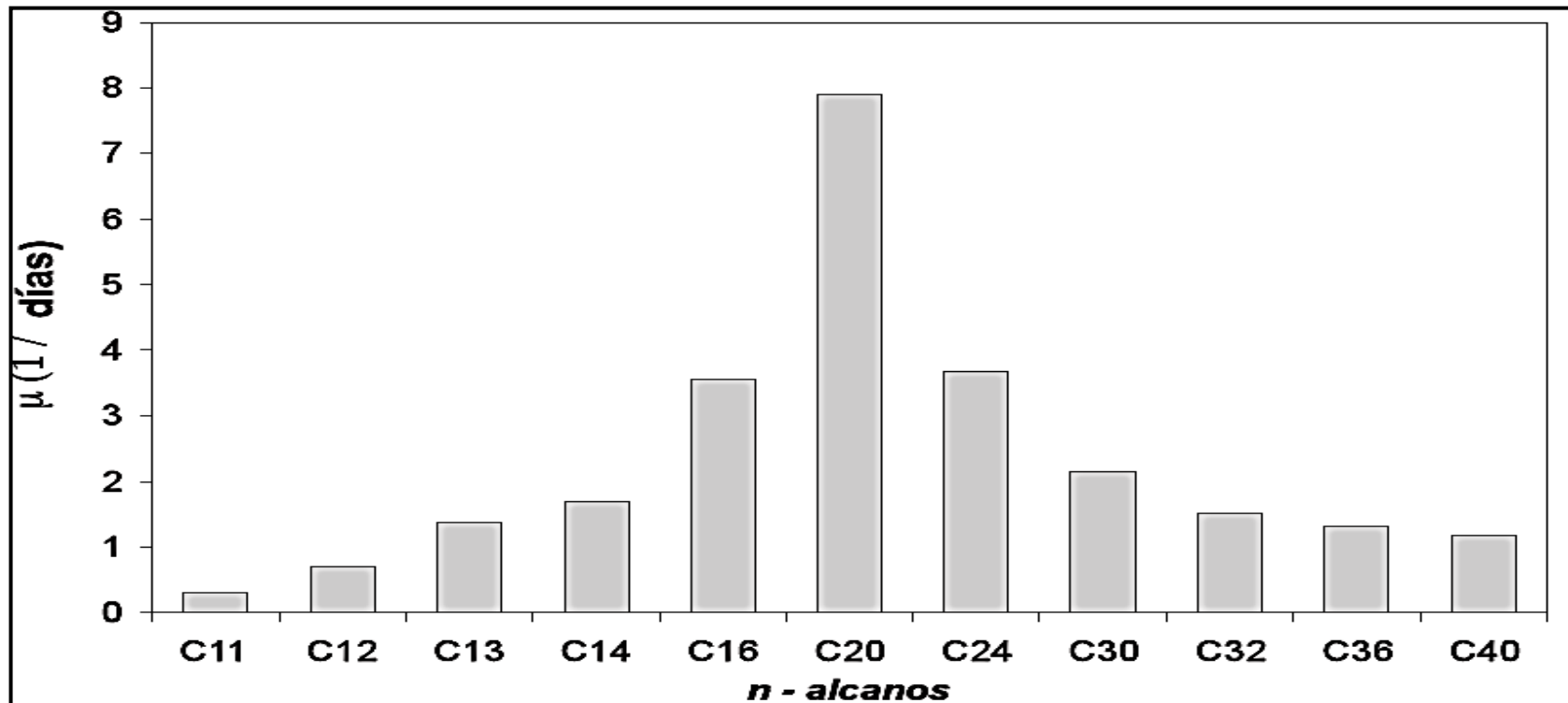


Figura N° 7. Velocidad específica del crecimiento de *Pseudomona aeruginosa* MGP-1 en cada uno de los n - alcanos utilizados
Fuente: Salgado Brito Rosa et. al.

Tabla N° 7. Porcentaje de degradación de los n - alcanos probados

n-alcano	% degradación
Pentano C ₅	0.0
Hexano C ₆	0.0
Heptano C ₇	0.0
Octano C ₈	0.0
Nonano C ₉	0.0
Decano C ₁₀	0.0
Undecano C ₁₁	18.3
Dodecano C ₁₂	21.3
Tridecano C ₁₃	28.4
Tetradecano C ₁₄	32.5
Hexadecano C ₁₆	49.0
Cosano C ₂₀	60.0
Tetracosano C ₂₄	47.0
Triacotano C ₃₀	16.4
Dotriacotano C ₃₂	12.4
Hexatriacotano C ₃₆	13.0
Tetracontano C ₄₀	12.0

Fuente: Salgado Brito Rosa *et.al.*

En el ensayo N° 3. Se observa el porcentaje más alto de degradación (60%) cuando se utilizó C20 como sustrato. Los porcentajes de degradación van disminuyendo conforme disminuye o aumenta la cadena de carbonos.

Tabla Nº 8: Cultivos de bacterias degradadas de hidrocarburos en presencia de kerosén, gasoil y tolueno.

CONDICIÓN	LECTURA 620 nm	LECTURA 620 nm - CONTROLES
Control	0.001	
Gasoil	0.020	
Bacterias + Gasoil	0.062	0.041
Kerosene	0.050	
Bacterias + Kerosene	0.136	0.085
Tolueno	0.002	
Bacterias + Tolueno	0.012	0.009

Fuente: Fuente: De Miguel *et. al* (2004)

En el ensayo Nº 4, se observa que las bacterias degradadoras de hidrocarburos si pueden crecer en medios minerales suplementado con gasoil o kerosene (mezclas de hidrocarburos), pero no pueden crecer en presencia de tolueno (hidrocarburos aromático)

DISCUSIONES

En los últimos años, el transporte de petróleo se ha realizado en embarcaciones de gran tamaño para distribuirlo hacia diferentes lugares del mundo. Si bien los accidentes de buques petroleros no son tan frecuentes, cuando ocurren y su contenido es derramado, causan un gran impacto en el medio ambiente, por tal razón se desarrolló el estudio de microorganismos con capacidad para biodegradar. Con base a los resultados del presente trabajo se observó que los microorganismos tienen capacidad para biorremediar; Petit A. Karla *et. al.* Trabajó aislando cepas fungidas “*Aspergillus*” con potencial para degradar antraceno, fluoranteno y pireno. Los ensayos en cultivos líquidos mostraron la efectiva degradación de los HPA en 20 días de incubación, de estos hongos hidrocarbonoclasticos seleccionando a la cepa U201027A. *A versicolor* para ensayos de biorremediación, logrando una disminución en los niveles de los contaminantes, especialmente los de mayor peso molecular, demostrando la capacidad de la cepa para biorremediar los sitios contaminados; Acuña Adrián *et. al.* trabajo con muestras provenientes de un sistema de biorremediación en actividad determinando la capacidad de la comunidad bacteriana de biodegradar petróleo y derivados, e identificando los principales microorganismos indicando que la comunidad bacteriana tiene capacidad de biodegradar los hidrocarburos, principalmente la fracción alifática, encontrando que los microorganismos con mayor frecuencia son: *Rhodococcus erythropolis*, *Achromobacter xylosoxidans* y *Brevundimonas diminuta*; Salgado Brito Rosa *et. al.* Investigó la capacidad de la *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 para degradar n - alcanos sabiendo que es la segunda bacteria Gram negativa que puede degradar parafinas de hasta 40 carbonos, observándose que el porcentaje más alto de degradación se obtuvo

cuando la *Pseudomona aeruginosa* MGP-1 utilizo C20 como fuente de carbono y energía, la degradación disminuye a medida que la cadena de carbono aumenta o disminuye; si bien De Miguel *et. al.* Investigó la presencia y cuantificación de hidrocarburos, cuantificando diferentes tipos de colonias de bacterias, determinando la presencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos en su gran mayoría bacilos Gran negativos, y la capacidad para crecer en mezclas de hidrocarburos con excepción en tolueno. Si bien todos los autores no trabajaron con los mismos microorganismos, todos coincidieron que son diversos los microorganismo que tiene capacidad para biodegradar hidrocarburos.

CONCLUSIONES

- ❑ Podemos concluir que los microorganismos tienen capacidad de crecer en medios hostiles para así degradar hidrocarburos, oxidando o rompiendo el enlace del anillo aromático del hidrocarburo presente en el ambiente, y así biorremediar el medio ambiente.

 - ❑ Según estudios realizados por diversos autores se determinó que hay presencia de actividad biorremediadora por acción de bacterias y hongos, siendo las bacterias las más utilizadas en el proceso de biorremediación, los géneros más empleados son *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Nocardia*. También se determinó que el género *Aspergillus* (*hongo*) degrada hidrocarburos poli aromáticos (HAP).
- Por tal razón la biorremediación por microorganismos, es una técnica fácil, económica y muy útil para bioregenerar nuestro medio ambiente.

RECOMENDACIONES

- ❑ La biorremediación se avizora como una técnica con un excelente futuro, dentro de la biotecnología aplicada al medio ambiente, en los próximos años cobrará mayor importancia, por lo tanto debemos continuar investigando.

- ❑ Se recomienda utilizar nutrientes (nitrógeno y fósforo), para así poder potenciar el efecto en el proceso de biorremediación.

- ❑ Usar el método de fitorremediación (utiliza plantas para reducir, degradar o inmovilizar compuestos orgánicos contaminantes), como una técnica complementaria.

- ❑ Realizar procesos de bioaumentación (Utiliza bacterias altamente especializadas para incrementar y mejorar, la capacidad de digestión total de la población bacteriana natural), complementarios al uso de consorcios bacterianos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Greenpeace, organización ambientalista. **Impacto ambientales del petróleo** [sitio en internet]. disponible en: http://www.greenpeace.org/mexico/global/mexico/report/2012/1/impactos_ambientales_petroleo.pdf. Consultado: 14 de octubre del 2014
2. Lozano p. Nelly patricia. **Biorremediación de ambientes contaminados con petróleo** [sitio en internet]. disponible en: <http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAA&url=http%3A%2F%2Frevistas.udistrital.edu.co%2Fojs%2Findex.php%2Ftecges%2Farticle%2Fdownload%2F4326%2F6056&ei=ZrVAVMHZNteONqukgAM&usg=AFQjCNFBqnAq4DRFxJDSgYJwYE57F320Q&bvm=bv.77648437,d.eXY>. Consultado: 9 de octubre del 2014.
3. Samanez Gibaja Elizabet. **Biorremediación bacteriana por estimulación en suelos contaminados con petróleo crudo**. [Tesis para obtener el grado de magister] Perú, 2008.
4. Echeverri Jaramillo Gustavo Eugenio, Manjarrez Paba Ganiveth, Cabrera Ospina Melody. *et al.* **NPCCB. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia**. [en línea] 2010 junio [fecha de acceso el 6 de octubre del 2014]; ISSN: 1794-2470, disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA13_ARTORIG7.pdf.

5. Llenque Díaz, Luis A. **Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas de suelos contaminados con petróleo provenientes de oleocentros de la ciudad de Trujillo, Perú.** **REBIOL** [en línea] 2011 diciembre [fecha de acceso 1 de octubre del 2014]; 31 (2), disponible en: http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=5&ved=0CDoQFjAE&url=http%3A%2F%2Fwww.facbio.unitru.edu.pe%2Findex.php%3Foption%3Dcom_docman%26task%3Ddoc_download%26gid%3D99%26Itemid%3D149&ei=GLZAVJnEMpDHggSHpIHIDw&usg=AFQjCNFYBmd1mWN7wuJyLRIEwEg8uJP8xA&bvm=bv.77648437,d.eXY.
6. Acuña Adrián, Pucci Graciela, Morales María José, Pucci Oscar. *et al.* **Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de Patagonia Argentina.** **RSVM** [en línea] 2010 [fecha de acceso el 29 de setiembre del 2014]; 30: 29 – 36, disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/rsvm/v30n1/art07.pdf> .
7. Salgado Brito Rosa, Pineda Flores Gabriel, Mesta Howard Ana María, Díaz Cedillo Francisco *et al.* **Degradación de n - alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1** [sitio en internet]. disponible en: <http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBoQFjAA&url=http%3A%2F%2F Dialnet.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F2986556.pdf&ei=TcFAVJCOAcjGggTY5ILABA&usg=AFQjCNE0MaTFFpXOByEtUjMh8wlzmZClwQ>. Consultado: 3 de setiembre del 2014.

8. Benavides López de Mesa Joaquín, Quintero Gladis, Guevara Vizcaíno André Liliana, Jaimes Cáceres Diana Carolina, Gutiérrez Riaño Sandra Milena, Miranda García Johanna *et. al.* **Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo** [en línea] 2006 junio [fecha de acceso 24 de setiembre del 2014]; IssN:1794-2470, disponible en: http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA_16/ARTREVIS1_5.pdf

9. Quiroga Flores Roxana. **Aislamiento y cultivo de microorganismos capaces de degradar hexadecano y fenantreno de pozos abandonados con petróleo mediante procesos aerobios y anaerobios, Sanandita – Tarija – Bolivia.** [Tesis] disponible en: <http://bioquimica.biblio.umsa.bo/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=9726>, Consultado: 1 de diciembre del 2014

10. Torres Delgado Katerine, Zuluaga Montoya Tatiana. **Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos** [Tesis doctoral] disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf. Consultado: 1 de octubre del 2014.

11. Cando Rodríguez Miguel Ángel. **Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos** [Tesis] disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1520/11/UPS-CT002143.pdf>, Consultado: 16 de noviembre del 2014.

12. Izquierdo Romero Andrés Ricardo. **Biodegradación de HAPs durante la biorremediación aeróbica de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Análisis de poblaciones bacterianas y genes funcionales** [Tesis doctoral] disponible en:
http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/132994/ARIR_TESIS.pdf?sequence=1. Consultado: 19 de octubre del 2014.

13. Loya Del Ángel Daniela Itzel. **Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos.** [Tesina]. disponible en:
<http://www.uv.mx/pozarica/egia/files/2012/10/Loya-Del-Angel-Daniela-Itzel.pdf>.
Consultado: 19 de diciembre del 2014

14. Petit A. Karla *et. al.* **Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) por hongos aislados de aguas contaminadas con petróleo, podredumbre blanca, y acíbar de *Aloe vera*** [en línea] 2013 [fecha de acceso el 19 de noviembre del 2014]; disponible en:
<http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v12n3/petit.pdf>

15. De Miguel *et. al.* **Estudio de la contaminación por hidrocarburos en las aguas del puerto de Mar de Plata y una posible solución.** [en línea] 2004 [fecha de acceso el 9 de noviembre del 2014]; disponible en:
http://www.aidisar.org.ar/PREMIO_JUNIOR/trabajos/2004-1-premio_degradadoras-s.a.pdf

16. Díaz Ramírez Ildelfonso Jesús. **Biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de una planta nativa** [Tesis] disponible en: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI10493.pdf> Consultado: 2 de octubre del 2014.
17. Moreira Isofía Belén Estrella *et. al.* **Análisis de hidrocarburos de petróleo en agua mediante cromatografía de gases** [en línea] disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/4655/2/T-ESPE-032766-A.pdf>
18. Maposita M.S, Calle W.O., Fiallos C.M., Burgos F *et al.* **Características microbiológicas en suelos contaminados por hidrocarburos, de tipo *Pseudomonas* en el sector de rio Bonanza, provincia de Pastaza.** [sitio en internet]. disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/17070/1/CARACTERIZACI%C3%93N%20MICROBIOL%C3%93GICA%20EN%20SUELOS%20CONTAMINADOS%20POR%20HIDROCARBUROS,%20DE%20TIPO%20PSEUDOMONAS%20EN%20EL%20SECTOR%20RIO%20BONANZA,%20PROVINCIA%20DE%20PASTAZA.pdf>, Consultado: 13 de setiembre del 2014.
19. Pucci Graciela, Acuña adrian, Tonin Natalia, Tiedemann Maria, Pucci Oscar *et. al.* **Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos. RPB** [en línea] 2010 agosto [fecha de acceso 2 de octubre del 2014]; 17(2): 237 - 244, disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v17n2/a15v17n2.pdf>.

ANEXOS

ANEXO

MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título del proyecto de tesis: Biorremediación por microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Presentado por: Sihuacollo Flores, Diana Pilar

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	MÉTODO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	VARIABLE	POBLACIÓN Y MUESTRA
<p>¿Cómo actúan los microorganismos en el proceso de biorremediación de hidrocarburos en el medio ambiente?</p> <p>PROBLEMA ESPECÍFICOS</p> <p>P.E:1: ¿Cuáles son los microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos en el medio ambiente?</p>	<p>Determinar cómo actúan los microorganismos en el proceso de biorremediación de hidrocarburos en el medio ambiente.</p> <p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <p>O.E.1: Determinar los microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos en el medio ambiente.</p>	<p>Los microorganismos degradadores de hidrocarburos actuarían oxidando o rompiendo el enlace del anillo aromático del hidrocarburo presente en el medio ambiente.</p> <p>HIPÓTESIS ESPECÍFICAS</p> <p>H.E.1: Los microorganismos que tendrían la capacidad de degradar hidrocarburos en el medio ambiente serían bacterias y hongos.</p>	<p>TIPO DE INVESTIGACIÓN:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Descriptiva - Transversal - Documental <p>Nivel de investigación :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Descriptivo 	<p>MÉTODO DE INVESTIGACIÓN</p> <ul style="list-style-type: none"> - Analítico - Científico <p>Diseño de investigación:</p> <ul style="list-style-type: none"> - No experimental 	<p>VARIABLE X:</p> <p>Microorganismos degradadores de hidrocarburos</p> <p>X1: Actividad biorremediadora</p>	<p>POBLACIÓN:</p> <p>Microorganismos</p> <p>Muestra:</p> <p>Microorganismos degradadores de hidrocarburos</p>

