UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y CIENCIAS AMBIENTALES
ESCUELA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

AISLAMIENTO DE BACTERIAS BIODEGRADADORAS DE HIDROCARBUROS DESDE AGUAS EMPETROLADAS PROCEDENTES DE ENAP MAGALLANES

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL.

TESISTA: LORENA TRONCOSO OYARZÚN.
PROFESOR GUÍA: DRA. MARCELA ZAHR.

VALPARAÍSO, DICIEMBRE 2007

A Dios por darme la fuerza necesaria día a día para sacar este proyecto adelante.

A mis padres, por su apoyo incondicional, la confianza depositada en estos años y toda mi vida. Esto va dedicado a ustedes, como cada uno de mis logros.

A mis hermanos por el ánimo entregado durante la realización de este trabajo y toda la carrera. Por el hacerme creer en mis capacidades, y celebrar mis logros.

Amigos, fueron mi familia estos años Universitarios, gracias por los momentos de alegría y la compañía. Han sido un gran apoyo para mi.

A ENAP Magallanes, gracias por confiar y financiar esta propuesta, por abrirme sus puertas cada vez que lo necesite.

Profe Marcela, Marisol y Ociel, por sus críticas y consejos, gracias a eso este trabajo pudo terminar. Por la confianza entregada y su apoyo no solamente en la realización de la tesis , sino durante toda la carrera.

INDICE.

Resumen.....vii
1 INTRODUCCIÓN.....1
2 PROBLEMA.....3
3 ANTECEDENTES GENERALES. 5
3.1 Bioremediación: definición y tipos.....6
3.2 Utilización de bioremediación para descontaminar.....8
3.3 Bioremediación de hidrocarburos del petróleo.....10
3.3.1 Composición química del petróleo.....12
3.3.2 Microorganismos que degradan petróleo. 18
4 HIPOTESIS 24
5 OBJETIVOS.....24
5.1 Objetivo General.....24
5.2 Objetivos específicos.....24
6 MATERIALES Y MÉTODOS 25
6.1 Metodología Analítica 25
6.1.1 Medios de cultivo 25
6.1.2 Material de vidrio 25
6.1.3 Reactivos 25
6.1.4 Equipos 26
6.1.5 Tinción Gram.....26
6.1.6 Preparación de la galería API 20 NE (Biomerieux). 27
6.1.7 Utilización de microplato GN2 (Biolog). 28
6.2 Metodología Experimental 29
6.2.1 Toma de muestra. 29
6.2.2 Caracterización física y química del agua. 30
6.2.3 Crudo de Petróleo. 30
6.2.4 Aislamiento, Recuento y Caracterización de microorganismos. 31
6.2.5 Selección de bacterias degradadoras. 33
6.2.6 Ensayo de biodegradación y crecimiento bacteriano. 33
7 RESULTADOS Y DISCUSIONES 36
7.1 Caracterización fisicoquímica del agua. 36
7.2 Aislamiento, Recuento y Caracterización de microorganismos del agua. 41
7.3 Aislamiento y Caracterización de microorganismos del Crudo de Petróleo. 46
7.4 Selección de bacterias degradadoras. 47
7.5 Ensayo de biodegradación del crudo. 50
7.6 Crecimiento Bacteriano. 54

8 CONCLUSION.....58
9 SUGERENCIAS.....60
10 BIBLIOGRAFÍA.....61

Índice de Tablas y Figuras

Tabla Nº	Página
1: Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo	14
2: Isoprenoides componentes del crudo de petróleo de interés geoquímica	15
3. Clasificación del crudo de acuerdo a su densidad API.	19
4: Límites establecidos en el Decreto 90 dentro de la zona de protección litoral y los detectados en la Fosa Daniel 2.	40
5: Limites establecidos en el Decreto 90 fuera de la zona de protección litoral y los detectados en la Fosa Daniel 2.	41
6: Caracterización de cepas heterótrofas aisladas del agua empetrolada.	46
7: Caracterización microorganismos aislados del crudo de petróleo	48
8: Caracterización de cepas que crecieron en M.M M9 con el crudo como fuente de carbono.	49
9: Test Biolog GN2 y API 20 NE	50
10: Ensayo de biodegradación	51
11: Medición del Crecimiento Bacteriano por Espectrofotometría	55

Figura Nº	
1. Estructuras químicas de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo.	16
2. Región de Magallanes, comuna de San Gregorio	30
3: Esquema Fosa Daniel 2	30
4: Composición de la fosa	31
5. Parámetros evaluados en el D.S. 90 dentro de la ZPL para la fosa Daniel 2.	38
6. Parámetros evaluados en el D.S. 90 fuera de la ZPL para la fosa Daniel 2.	38
7. Distribución morfológica de las cepas aisladas heterótrofas del agua.	43

8. Cepas heterótrofas aisladas desde al agua. 43
9. Identificación preliminar con el test API 20 NE de las cepas heterótrofas aisladas del agua 44
10. Distribución de los Microorganismos aislados del crudo. 47
11: Siembra de las cepas aisladas del agua en Medio Mínimo M9, con crudo como fuente de carbono. 50
12. Ensayo de biodegradación cepa LT7A. 51
13: Ensayo de biodegradación cepa LT8A. 52
14. Ensayo de biodegradación cepa LT11D 52
15. Ensayo de biodegradación cepa LT12A. 53
16. Ensayo de biodegradación. 54
17: Curva de Crecimiento Bacteriano cepa LT7A 56
18: Curva de Crecimiento Bacteriano cepa LT8A 56
19: Crecimiento Bacteriano cepa LT11D 57
20: Crecimiento Bacteriano cepa LT12A 57

Resumen.

Las prácticas de bioremediación para combatir derrames de hidrocarburos en suelo, están siendo utilizadas cada vez con mayor frecuencia, ya que se ha comprobado que es una técnica que entrega resultados óptimos, incluso mejores que el tratamiento con productos químicos.

ENAP Magallanes producto de antiguas practicas de extracción, construyó fosas al lado de los yacimientos donde se vertía el hidrocarburo extraído cuando se realizaba la perforación. El suelo de las fosas, que contienen agua y petróleo, está siendo recuperado, para ello, se retira el petróleo sobrenadante, y el agua es almacenada en tanques, esperando para ser tratadas.

En el presente trabajo se hace un estudio de los microorganismos autóctonos que sean capaces de degradar los hidrocarburos derivados del petróleo contaminantes de esas aguas.

Para ello se realizó experimentalmente un aislamiento y caracterización de los microorganismos presentes, para posteriormente identificarlos preliminarmente por pruebas bioquímicas. Finalmente se hace un ensayo de biodegradación de los hidrocarburos paralelamente a una medición del crecimiento microbiano.

Se encontró que un 35.7% de las cepas heterótrofas aisladas tienen capacidad de degradar crudo de petróleo, siendo identificadas como *Pseudomonas sp.* las 4 cepas con las que se realizó el ensayo de biodegradación, las que además presentaron un comportamiento similar en los 21 días que duró la prueba.

Se logró demostrar que las cepas aisladas de aguas empetroladas poseen la capacidad de degradar el crudo de petróleo, siendo estos resultados de vital importancia para futuras nuevas investigaciones en esta área y llegar a dar una posible solución a estos pasivos ambientales.

1 INTRODUCCIÓN.

La minería es una actividad económica que se desarrolla en Latinoamérica desde siglos atrás explotando metales diversos que ineludiblemente generan residuos. Las viejas prácticas mineras y el manejo inadecuado de estos residuos como también la inexistencia de normas precisas que regulen el cierre de minas ha devenido en la acumulación de pasivos ambientales mineros a lo largo de extensas áreas y provocando contaminación de recursos naturales cuyo uso puede poner el riesgo la salud pública. En especial, es amplia la gama de impactos asociados a las presas de escombreras o relaves de operaciones pasadas construidas sin seguir especificaciones técnicas de seguridad y en donde los residuos depositados pueden provocar efectos nocivos que limitan el uso de los suelos, afectan la calidad de las aguas superficiales y subterráneas, degradan la flora y fauna, y restringen los derechos de las poblaciones locales de usar tales recursos sin correr el riesgo de afectar su salud.

En este contexto, las imprecisiones y carencias de marcos legales que orienten el accionar frente a los pasivos y la consiguiente identificación global de estos, la priorización en cuanto a la necesidad de atención inmediata, la imputación de responsabilidades, así como los costos del saneamiento de los parajes y recursos naturales, han postergado y retrasado acciones por parte de todos los agentes involucrados en el tema, esto es la industria, gobierno y comunidades, muy a pesar de que los problemas en torno a las antiguas operaciones mineras es conocido y aceptado en la mayoría de los países en los cuales además se reconoce que los pasivos generan actitudes negativas por parte de la población y condiciona la aceptación social de la minería.

La denominación de pasivos ambientales mineros hace referencia a los impactos negativos generados por las operaciones mineras abandonadas con o sin dueño u operador identificables y en donde no se haya realizado un cierre de minas regulado y certificado por la autoridad correspondiente. La referencia es extensiva a aquellos impactos que pueden causar los residuos (sólidos, líquidos y gaseosos) generados en el curso de las diferentes fases del proceso minero, y que han sido depositados en presas de escombreras u otra forma de almacenamiento, sin un manejo ambiental apropiado.

En los países del Sur es común que los pasivos ambientales más graves sean producidos por empresas transnacionales del Norte, que imponen unas condiciones laborales y ambientales inaceptables, aprovechando que en la mayoría de los países del Sur la legislación ambiental es menos estricta y la fuerza política de las poblaciones locales y de los gobiernos es menor.

Los daños producidos por estas empresas constituyen una parte de la Deuda Ecológica adquirida por los países del Norte con los países del Sur. En este caso, no obstante, se trata de una deuda privada, a diferencia, por ejemplo, de la deuda de carbono.

El cálculo monetario del pasivo ambiental o, lo que es lo mismo, la valoración monetaria de los daños ambientales, es muy discutible y arbitraria por dos razones. Primero porque los ecosistemas y su interacción con la sociedad humana se caracterizan por un alto nivel de complejidad y una incertidumbre alta, y los seres humanos son muy difíciles de predecir. Por lo que queda claro es que estas interacciones pueden alterar notablemente el equilibrio del ecosistema y conducir a cambios irreversibles en las pautas de desarrollo.
La segunda razón es que la expresión de los daños ambientales en términos monetarios tiene límites estructurales inevitables si se acepta la idea de inconmensurabilidad de valores, o sea la "ausencia de una unidad común de medida aplicable a valores plurales: ¿Cuál es el valor monetario de una vida humana? ¿Cuál es el valor de la degradación de un paisaje, de la reducción de biodiversidad, de la pérdida de la identidad cultural propia de la emigración forzada o de las enfermedades sufridas? La inconmensurabilidad obliga a replantearse el concepto de compensación desde su fundamento. Nos podemos preguntar si ante los daños que se producen en la salud, en la destrucción de un contexto cultural o en la degradación irreversible del medio ambiente, es adecuada, pertinente y útil una compensación monetaria.

El concepto de pasivo ambiental, expresado como el conjunto de daños provocados a lo largo de la historia de una empresa, no existe en la legislación de ningún país, como tal, aunque los daños ambientales pueden ser perseguidos bajo la legislación penal, civil y, en algunos países, ambiental. Sin embargo son ya varias las empresas que se están haciendo responsables de sus pasivos ambientales, como por ejemplo en Chile ENAP Magallanes.

2 PROBLEMA.

En 1943, el Supremo Gobierno encomendó a la Corporación de Fomento de la Producción (CORFO), exploraciones de hidrocarburos en la provincia de Magallanes.
El 19 de junio de 1950 se crea la Empresa Nacional del Petróleo (ENAP) con la misión de asumir los derechos del estado en los yacimientos de hidrocarburos en la búsqueda de otros y en la refinación y venta primaria del petróleo crudo y sus derivados.

Los procedimientos utilizados en los primeros años de explotación petrolera y la normativa legal del pasado, no consideraban los aspectos sobre el cuidado del medio ambiente, según la importancia de sustentabilidad para el negocio que hoy se le asigna. En ese entonces no existía gestión ambiental alguna, por lo tanto esta realidad, fue causa importante del deterioro común relacionado a toda actividad industrial.
Esta es una historia común y bien conocida en la Patagonia, donde el desarrollo económico en toda su historia se ha relacionado a la explotación de sus recursos naturales.

En las últimas décadas, el tema Medio Ambiental adquirió una importancia significativa dentro de la sociedad. Hoy es de sentido común hablar del derecho a vivir en un medio ambiente limpio, pero no se puede olvidar que sólo hace doce años se promulgo en Chile la Ley de Bases del Medio Ambiente, que demoró todavía unos años más en hacerse operativa mediante los reglamentos correspondientes.

En la actualidad, pese a que la Ley de Bases del Medio Ambiente, no exige a ninguna empresa hacerse cargo del daño ambiental del pasado, la Empresa Nacional del Petróleo asumió responsablemente una conducta de saneamiento y recuperación ambiental.

Es por este motivo que ENAP no quiso quedar ajena a esta nueva realidad adoptando voluntariamente un compromiso ambiental, con el fin de ser un ejemplo para las demás empresas y por sobre todo para la comunidad. Esta doctrina involucra una innovación en la región con una rigurosidad que ha superado incluso a la propia legislación.

Es por esto el año 2005 se activa con carácter de urgencia y prioridad un plan de saneamiento de pasivos ambientales, que consiste en eliminar todo rastro de contaminación en una época anterior a la actual conciencia y practicas ambientales.

El plazo que se definió para el cumplimiento total del proyecto es el 2008 y para esto se constituyó un equipo de trabajo encabezado por un directorio; para el cual se definieron cuatro sub-proyectos. Uno de ellos es la Limpieza de fosas, proyecto ambiental más significativo y relevante del grupo, debido a la generación del impacto ambiental positivo. Esto implica la limpieza del pasivo más extendido y complejo de Magallanes. El 2008 todas las fosas de la región estarán completamente saneadas. Los trabajos comenzaron con un proyecto piloto en una de las fosas de petróleo más grande que existe, tratando el suelo empetrolado utilizando la técnica de bioremediación, dando excelentes resultados. Actualmente se está terminando con la recuperación del suelo, y la etapa que sigue es el saneamiento de las aguas, que aun no se define la técnica a emplear para que sean tratadas.

3 ANTECEDENTES GENERALES.

El ciclo natural del agua tiene una gran capacidad de autodepuración, que se ve alterada por el exceso de contaminantes producidos por las diversas actividades industriales que, junto con el aumento de la población, han elevado la presencia de contaminantes tanto sólidos como líquidos. (Echarri, L. 1998)

Todo compuesto natural puede ser degradado si se dan las condiciones ambientales adecuadas, esto es probado dado que no existen acumulaciones a gran escala de sustancias orgánicas naturales. Una gran cantidad de compuestos sintéticos son suficientemente parecidos a algún compuesto natural, de modo que pueden ser degradados por el metabolismo microbiano (Atlas, R. & Bartha, R. 2001). Otros son xenobióticos[1], con estructuras moleculares y secuencias de enlaces químicos no reconocibles por las enzimas degradadoras existentes. Estos compuestos resisten a la biodegradación o son metabolizados incompletamente, con el resultado de que algunos se acumulan en el ambiente.

La industria química produce gran cantidad de compuestos xenobióticos para distintos fines, cuya estructura química difiere de los compuestos orgánicos naturales. Algunos de estos contienen grupos halógenos y nitrogenados que los hacen resistentes a la biodegradación. (Atlas, R. & Bartha, R. 2001)

El desarrollo de la ciencia ha logrado utilizar la biodegradación natural para fines específicos de descontaminación estudiando los microorganismos apropiados que aceleren este proceso natural y definiendo las condiciones en que ellos se desarrollan.

La bioremediación utiliza la capacidad de los microorganismos para degradar compuestos orgánicos. Esta tecnología está basada en el uso de organismos naturales o mejorados genéticamente para recuperar sitios contaminados y proteger el ambiente. (Torres D. 2003)

[1] Los xenobióticos son compuestos químicos sintéticos que no han existido nunca de manera natural.

3.1 Bioremediación: definición y tipos

La bioremediación es el proceso utilizado por el hombre para descontaminar en los diferentes ambientes – mares, estuarios, lagos, ríos y suelos – y consiste principalmente en el uso de diferentes organismos (plantas, levaduras, hongos, bacterias, etc.) del medio para neutralizar sustancias toxicas, ya sea transformándolas en sustancias de carácter menos tóxico o bien convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana. Una de las medidas biocorrectoras más empleada es la utilización de microorganismos para la descontaminación de suelos. Estos sistemas de descontaminación se basan en la absorción de las sustancias orgánicas por parte de dichos microorganismos, los cuales las utilizan como la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y funciones metabólicas (Torres D. 2003).

Esta técnica es utilizada para disminuir la contaminación por los hidrocarburos de petróleo y sus derivados, metales pesados e insecticidas; además se usa para el tratamiento de aguas domésticas e industriales, aguas procesadas y de consumo humano, aire y gases de desecho.

La biotecnología ha permitido el desarrollo de diversas estrategias que pueden ser utilizadas con el fin de restaurar la calidad ambiental, de acuerdo con las necesidades y dimensiones del problema a solucionar, por ejemplo: (Vargas, P. et. al. 2004)

1) Bioestimulación: como su nombre lo indica, consiste en estimular los microorganismos nativos del sitio adicionando nutrientes como nitrógeno o fósforo.

2) Bioaireación: es una forma de estimulación realizada con gases, como por ejemplo oxígeno y metano, estos son adicionados de forma pasiva en el lugar a tratar para estimular la actividad microbiana.

3) Bioaumentación: es la inoculación de una alta concentración de microorganismos en el lugar contaminado para facilitar la biodegradación. Como se va a inocular, estos microorganismos deben ser seleccionados del lugar que se desea tratar.

El proceso de bioremediación puede clasificarse, de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico, en los siguientes tipos (Torres Dulio. 2003):

1) Fitoremediación. Consiste en el uso de plantas verdes para contener, remover o neutralizar compuestos orgánicos, metales pesados o radionucleidos. Un ejemplo de la fitoremediación la constituye el uso de la especie *Thlaspi caurulencens* en suelos contaminados con zinc y cadmio.

2) Bioremediación animal. Existen animales que actúan como agentes descontaminantes, ya que pueden desarrollarse en medios con fuerte toxicidad y poseen en su interior microorganismos capaces de retener metales pesados.

3) Bioremediación microbiana. Existe la posibilidad del uso de bacterias con la propiedad de acumular o metabolizar metales pesados. La utilización de microorganismos que transforman diferentes compuestos nocivos en otros de menor impacto ambiental ha experimentado un gran desarrollo reciente. Aunque las bacterias son las más empleadas en el proceso de bioremediación, también se han empleado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes para la degradación de compuestos tóxicos en el suelo.

3.2 Utilización de bioremediación para descontaminar.

Los microorganismos se han utilizado ampliamente en los tratamientos biológicos de depuración de aguas, y principalmente en la recuperación de suelos contaminados.

1) Degradación de aguas residuales.

En el caso de las aguas residuales domésticas, el principal objetivo es la reducción de la materia orgánica presente y, en muchos casos, la eliminación de nutrientes como nitrógeno y fósforo. En el caso de las aguas de retorno de usos agrícolas, el principal objetivo es la eliminación de los nutrientes que puedan favorecer el crecimiento de plantas acuáticas, como el nitrógeno y el fósforo. En el caso de aguas residuales industriales, el principal objetivo es la reducción de la concentración de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. La eliminación de la DBO carbonosa, la coagulación de los sólidos coloidales no sedimentables, y la estabilización de la materia orgánica se consiguen, biológicamente, gracias a la acción de una variedad de microorganismos, principalmente bacterias. Los microorganismos se utilizan para convertir la materia orgánica carbonosa coloidal y disuelta en diferentes gases y tejido celular. (Metcalf & Eddy. 1995).

2) Degradación de suelos contaminados.

En el caso de bioremediación de suelos, el tratamiento se puede hacer de dos formas. El primero, *ex situ* (fuera del lugar), se refiere a la excavación del lugar y el tratamiento de la tierra en un área apartada donde se agregan nutrientes minerales y microorganismos externos (si es el caso), seguido de una buena mezcla para asegurar la distribución a través de toda la tierra. La mezcla periódica y la adición de más nutrientes (y/o organismos) permite asegurar homogeneidad mientras se airea la tierra. Esta práctica se conoce a menudo como cultivo de la tierra (land farming), en orden de que los microorganismos son susceptibles de ser “cultivados”, o “labranza” para facilitar la degradación de material contaminado. El segundo método de tratamiento de suelos, *in situ* (en el lugar), se refiere a tratar el suelo contaminado “como esta”, esto es, sin removerlo (excavarlo). Esta es a menudo la única alternativa cuando la contaminación ha migrado por debajo de construcciones o vías. En este caso los minerales, nutrientes y a menudo los organismos son agregados dentro del piso a través de pozos, galerías de infiltración u otras formas, que facilitan que el proceso de degradación se realice en el sitio donde está la contaminación. (Byodyne, 2006)

3) Degradación de plaguicidas.

Uno de los compuestos tóxicos más usados son los plaguicidas, los cuales en muchos casos resultan ser muy dañinos para el ser humano y el medioambiente. Estos compuestos químicos constituyen una adecuada fuente de carbono y donadores de electrones para ciertos microorganismos, entre los cuales se pueden mencionar los siguientes.

Las *Pseudomonas* son las bacterias más eficientes en la degradación de compuestos tóxicos. La capacidad de estas bacterias para degradar estos compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica. (Torres, Dulio. 2003)

3.3 Bioremediación de hidrocarburos del petróleo.

La firme demanda de energía en el mundo moderno ha determinado el uso intensivo del petróleo, y sus derivados, como fuente de energía. Muchos de sus componentes son empleados como materias primas básicas en las industrias químicas y petroquímicas (Lopolito et al. 2003). Las operaciones que se realizan dentro de la industria petrolera son muy variadas y algunas pueden constituir una fuente potencial de contaminación del aire, agua, y suelo por lo que existen programas prioritarios para estudiar el impacto de sus desechos; como es el caso de suelos afectados por el derrame de crudo o sus derivados donde se han implementado técnicas para su restauración, como la bioremediación en el cual, los hidrocarburos en un suelo afectado son tratados mediante la aplicación y dosificación de bacterias , nutrientes, oxigeno y por métodos mecánicos. Este método de remediación biológica por lo general es óptima para hidrocarburos de bajo peso molecular. (Zeyer et al. 1986).

Cuando ocurre un derrame de petróleo en el ambiente, los compuestos de bajo peso molecular generalmente se pierden por volatilización, mientras que los hidrocarburos poliaromáticos y heterocíclicos permanecen como remanente, haciéndose de esta manera persistentes en el ambiente. Los hidrocarburos poliaromáticos con dos o más anillos, heterocíclicos y sus homólogos alquil sustituidos, que son liberados en los ecosistemas, constituyen un grave problema porque contaminan fuentes de agua y suelos, ocasionando un gran impacto ecológico, en virtud de los efectos recalcitrantes y tóxicos que ejercen sobre los seres vivos (Tissot B. & Welte D. 1984). Es por ello que estos hidrocarburos deben ser removidos o su concentración debe ser sustancialmente reducida del ambiente. Con este propósito, frecuentemente son utilizados procesos de degradación industrial tanto químicos como físicos, que pese haber demostrado su potencial para la recuperación de cientos de lugares contaminados, resultan relativamente inadecuados para la remoción de hidrocarburos complejos y además el costo de su aplicación resulta elevado (Parales et. al. 2001).

Durante los últimos años, ha sido objeto de intensa investigación, el desarrollo de biotecnologías que complementen los procesos fisicoquímicos ya existentes, basadas en la utilización de microorganismos para la recuperación de los ambientes contaminados con petróleo y otros combustibles, en virtud de la capacidad que poseen estos

organismos de oxidar los compuestos hidrocarbonados del petróleo degradándolos hasta metabolitos que pueden ser fácilmente removidos o dispersados del ambiente (Monticello, 1994).

La biodegradación de hidrocarburos del petróleo (HP) por las poblaciones microbianas nativas representan uno de los principales mecanismos por el cual el petróleo y sus derivados puede disminuir su presencia en el ambiente, teniendo identificado los principales factores para el suelo: fisicoquímicos y biológicos. La contaminación de acuíferos con HP es un problema ambiental de grandes proporciones que ha permitido el desarrollo de diversas tecnologías. (Cardona, 2002)

Para el manejo de contaminaciones por petróleo, se está utilizando la aceleración de los procesos naturales de biodegradación del crudo. El sistema está basado en la inoculación de los derrames de petróleo con cultivos de bacterias mutantes de baja selectividad, capaces de metabolizar el amplio rango de hidrocarburos presentes en el petróleo. Estos microorganismos transforman el petróleo contaminante en productos ecológicamente aceptables como agua, anhídrido carbónico y biomasa bacteriana que a su vez puede incorporarse en la cadena trófica del ecosistema. (Didyk & Costa. 1977)

En la naturaleza existen microorganismos (bacterias y hongos, principalmente) cuya fuente de carbono y energía son los hidrocarburos y los transforman en otras sustancias químicas no contaminantes. Este proceso natural se puede acelerar aportando nutrientes y oxígeno que facilitan la multiplicación de las bacterias. (Atlas & Bartha, 2001)

Factores necesarios para la degradación de hidrocarburos

1) El número de bacterias, estas influyen en los periodos de biodegradación por ejemplo: el estado físico del aceite en el ecosistema, temperatura ambiental, disponibilidad de oxígeno, y concentraciones de nutrientes, especialmente oxigeno y fósforo, y hierro. (Dible & Bartha, 1976); (Gibbs & Andrews, 1975).

2) El crecimiento de un microorganismo o el tamaño y productividad de una comunidad están limitados por estos factores biológicos y ambientales. Teniendo condiciones

apropiadas los microorganismos se multiplican y compiten por el espacio. La cantidad total de espacio en el suelo disponible por lo general no están limitadas, pero hay un numero limitado de micro hábitat apropiados que contienen nutrientes, oxigeno, etc. en estas condiciones es posible que haya mas competencia por espacio utilizable que por espacio total. (Campbell, 1987). Entonces si la proporción del área superficial y el volumen del suelo son los adecuados hay mas área disponible para la colonización y por ende, el ataque por enzimas degradadoras de petróleo es mayor y se descompone aceleradamente.

3) Por otra parte la disponibilidad de oxigeno molecular es considerado como un factor limitante para la degradación del petróleo, por ejemplo en los casos de grandes acumulaciones de aceite en los suelos de regiones de intensa descomposición o en cuerpos de agua. El desarrollo de las condiciones anóxicas puede limitar severamente la biodegradación de hidrocarburos. (Atlas, 1987; King et. al. 1992).

4) También es importante mencionar que el petróleo crudo aporta carbono que sirve como nutriente orgánico y energía a los microorganismos degradadores, pero es deficiencia en nutrientes como: nitrógeno, fósforo, y hierro las cuales son necesarias para el soporte del crecimiento microbiano. En la degradación del petróleo los microorganismos deben obtener sus nutrientes minerales esenciales del ambiente. Muchos ecosistemas están limitados en nutrientes y minerales y no soportan una biodegradación rápida y extensa de hidrocarburo (Atlas & Bartha 1972).

3.3.1 Composición química del petróleo.

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Rosini, 1960). Los hidrocarburos componen la familia predominante de compuestos (un 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 compartimentos ambientales (Casellas et. al. 1995). Mayoritariamente son alcanos de cadena lineal (n-alcanos o n-parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos. (Fernández et. al. 1992). La

composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84-87% de C, 11-14% de H, de 0-8% de S, y de 0-4% de O y N y metales como el níquel y el vanadio (Clark & Brown 1977; Howe-Grant 1996). Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones (Tabla Nº 1): i) fracción saturada (n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las cicloparafinas), ii) fracción aromática (monoaromáticos, diaromáticos y hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), iii) fracción de resinas y iv) fracción de asfaltenos que son menos abundantes y consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular (Speight, 1991).

Tabla Nº 1. Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo

Fracción	Composición
Saturados	n-alcanos, alcanos de cadena ramificada 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.

3.3.1.1 Composición por familias de hidrocarburos

El estudio más detallado de los hidrocarburos de un crudo de petróleo agrupa estos compuestos en las siguientes familias: parafinas volátiles (alcanos no ramificados y ramificados, hasta C_{10}), parafinas no volátiles (alcanos lineales y ramificados entre C_{10} - C_{40}), naftenos (cicloalcanos o cicloparafinas), oleofinas (alquenos) y aromáticos (monoaromáticos y poliaromáticos). En un grupo aparte residirían los componentes de las resinas y los asfaltenos.

3.3.1.1.1 Parafinas volátiles (n-alcanos e isoprenoides volátiles):

Representan hasta un 30% del crudo de petróleo. Son n-alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C_1-C_{10} (de 1 a 10 átomos de carbono). Es la fracción más volátil del crudo y por lo tanto la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización. La fracción gas natural contiene, principlamente C_1-C_5. Los isoprenoides volátiles, están representados principalmente por el isobutano e isopentano. Los homólogos de mayor peso molecular disminuyen su presencia en el crudo con el incremento de peso molecular. Los isoprenoides volátiles también pueden llegar hasta C_{10} (2,6 dimetil octano) (Howe-Grant, 1996).

3.3.1.1.2 Parafinas no volátiles (n-alcanos e isoprenoides)

Se definen como aquellos n-alcanos e isoprenoides entre C_{11} -C_{40}. Los componentes entre C_{11}-C_{15} son de volatilidad intermedia. Los n-alcanos oscilan entre C_{11} -C_{40}, aunque se han descrito cadenas más largas y pueden constituir entre el 15-20% de crudos no degradados. Los isoprenoides varían de C_{12}-C_{22} y constituyen entre 1-2% del crudo, llegando a 15% en crudos degradados. En la tabla Nº 2 pueden verse los isoprenoides presentes en un crudo con interés en el campo de la geoquímica y la biorremediación.

Tabla Nº 2. Isoprenoides componentes del crudo de petróleo de interés geoquímico

Isoprenioide	Atomos de C	Nomenclatura
Pristano	19	2,6,10,14-tetrametilpentadecano
Gitano	20	2,6,10,14- tetrametilhexadecano
Farnesano	15	2,6,10-trimetildodecano
Norpristano	18	2,6,10-.trimetilpentaecano
I21	21	2,6,10,14-tetrametilheptadecano

El pristano y fitano se han utilizado como marcadores internos del grado de biodegradación de un crudo, pero actualmente no deberían utilizarse, ya que se han descrito tanto su biodegradación como sus vías catabólicas (Watkinson & Morgan, 1990). Actualmente se utilizan los hopanos tales como el 17 (H) 21 (H)-hopano (Prince et al. 1994).

3.3.1.1.3 Naftenos (cicloalcanos)

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% del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos corresponden al 50-55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%. Esta familia engloba a los hopanos, antes mencionados.

3.3.1.1.4 Oleofinas (alquenos)

Los alquenos están poco presentes en el crudo de petróleo, encontrándose en concentraciones traza. 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.

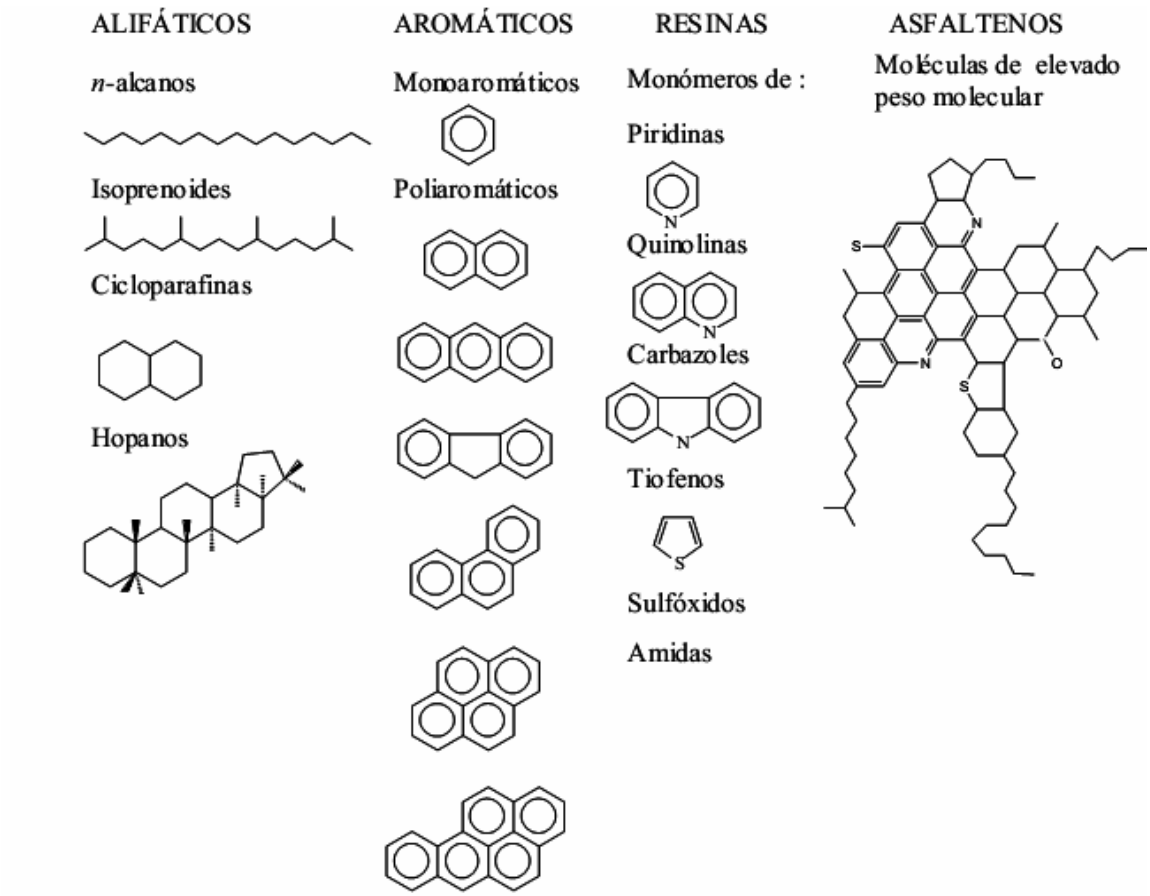

Figura 1. Estructuras químicas de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo.

3.1.1.1.5 Hidrocarburos 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 encontramos hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos).

3.3.1.1.5.1 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.

3.3.1.1.5.2 Hidrocarburos polimaromáticos

Entre los hidrocarburos diaromáticos, encontramos el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetrametilnaftalenos). Constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en un crudo (fig. 1).

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 triaromáticos (fig. 1).

Entre los hidrocarburos poiaromáticos de más de tres anillos, encontramos el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencenico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), pireno y benzo(a)pireno (5 anillos aromáticos) y coroneno (un HAP pericondensado con 6 anillos) (fig. 1).

También se pueden incluir compuestos muy relacionados con los hidrocaburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre (tiofenos, dibenzotiofenos) o nitrógeno (carbazoles).

3.3.1.1.6 Resinas y asfaltenos

Se trata de mezclas complejas, integradas por núcleos policíclicos o naftenoaromáticos. Contienen 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 recalcitrancia de un crudo de petróleo. Se trata de agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos, amidas, HAP, sulfuros, ácidos nafténicos, ácidos grasos, metaloporfirinas y fenoles polihidratados. (Howe-Grant, 1996).

3.3.1.2 Composición del crudo según el origen

La composición de un crudo varía según su localización (Müller, 1987). Habitualmente, todos los crudos de petróleo (no degradados) contienen alcanos (de cadena lineal y ramificada, de C_1 a C_{40} aproximadamente, cicloalcanos o naftenos e hidrocarburos aromáticos. Las fracciones de punto de ebullición menor, están formadas por alcanos en todos los casos, mientras que la composición de las fracciones superiores varía según la fuente del petróleo. Se denomina crudo parafínico o ligero cuando el crudo contiene una elevada proporción de parafinas (n-alcanos y alcanos ramificados), y asfáltico o pesado si predominan naftenos (cicloalcanos), alcanos de cadena larga (C_{30}-C_{45}) y HAPs (Howe-Grant, 1996).

Dependiendo del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran el petróleo, se tienen diferentes propiedades que los caracterizan y determinan su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o solventes. (IMP. 2006)

Las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno, constituyen las parafinas; cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas; al presentarse dobles uniones entre los átomos de carbono se forman las olefinas; las moléculas en las que se forman ciclos de carbono son los naftenos, y cuando estos ciclos presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos. (IMP. 2006)

Además hay hidrocarburos con presencia de azufre, nitrógeno y oxígeno formando familias bien caracterizadas, y un contenido menor de otros elementos. Al aumentar el peso molecular de los hidrocarburos las estructuras se hacen verdaderamente complejas y difíciles de identificar químicamente con precisión. Cada tipo de crudo tiene varios

cientos de componentes diferentes; la composición, a demás, varía según la procedencia del petróleo. (Atlas & Bartha 2001)

Los análisis de petróleo crudo magallánico solicitados por ENAP a empresas particulares, indican que las características son: bajo en contenido de azufre (dulce) y de acuerdo a su densidad API es ligero o súper ligero, parafínico de cadena larga (Alcanos) (Solis, L. 2005). En la Tabla Nº 3, se indica la clasificación del crudo de acuerdo a su densidad API (parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo, que diferencia las calidades del crudo).

Tabla Nº 3. Clasificación del crudo de acuerdo a su densidad API.

Aceite Crudo	**Densidad (g/cm^3)**	**Densidad grados API**
Pesado	1,0 - 0,92	10,0 - 22,3
Mediano	0,92 - 0,87	22,3 - 31,1
Ligero	0,87 - 0,83	31,1 – 39
Superligero	<0,83	>39

Fuente: Instituto Mexicano del Petróleo. http://www.imp.mx/petroleo/tipos.htm (visita: abril 2006)

3.3.2 Microorganismos que degradan petróleo.

El petróleo es un producto natural, que se origina por la transformación anaeróbica de la biomasa en condiciones de temperatura y presión elevadas. La mayoría de los componentes del petróleo son biodegradables, pero su biodegradación es relativamente lenta. (Atlas & Bartha, 2001)

La descomposición microbiana del petróleo y de sus derivados es de considerable importancia económica y ambiental. El petróleo es una rica fuente de materia orgánica, y

los hidrocarburos que contiene son fácilmente atacables por diferentes microorganismos en condiciones aeróbicas. (Madigan et. al. 2004)
Las bacterias que utilizan petróleo como fuente de energía, pueden aislarse de todos los suelos de cultivo, bosques o praderas, además, esa capacidad no esta limitada a unos pocos microorganismos, si no que esta presente en numerosos hongos y bacterias. Estos resultados, están en concordancia con los nuevos datos analíticos acerca de la composición de bacterias, plantas y animales. Muchos microorganismos contienen hidrocarburos que son sintetizados continuamente por bacterias y plantas, éstos pertenecen a las sustancias céreas, que cubren las hojas de las plantas. No hay que ver a los hidrocarburos tan solo como reliquias fósiles de la producción primaria de los vegetales en tiempos remotos, si no que forman parte de los metabolitos secundarios que aún hoy día se sintetizan en cantidades considerables por plantas verdes. (Hangs G. 1972).

La susceptibilidad a la biodegradación varía con el tipo y el tamaño de la molécula de hidrocarburo. La mayoría de los n-alcanos de longitud de cadena intermedia (C_{10} - C_{24}) se degradan rápidamente. Los alcanos de cadena corta son tóxicos para la mayoría de los organismos, pero generalmente se evaporan de la capa de petróleo rápidamente. Los alcanos de cadena larga son más resistentes a la biodegradación a medida que la longitud de su cadena aumenta. En general, la presencia de ramificaciones reduce la tasa de biodegradación porque los átomos de carbono terciario y cuaternarios interfieren con los mecanismos de degradación o la bloquean totalmente. Los compuestos aromáticos se degradan más lentamente que los alcanos.

El ataque inicial de los alcanos lo realizan enzimas que tiene una necesitad estricta de oxigeno molecular, esto es, son monooxigenasas o dioxigenasas. Frecuentemente este ataque se realiza sobre un grupo metilo terminal, formando un alcohol primario que, a su vez, se oxida posteriormente a un aldehído y un ácido graso. (Atlas, R. & Bartha, R. 2001)

Las bacterias y hongos oxidadores de hidrocarburos son los principales agentes de la descomposición del petróleo y de sus derivados. Se ha demostrado una gran variedad de bacterias (incluyendo cianobacterias), varios mohos y levaduras, así como determinadas algas verdes pueden oxidar dichas sustancias. El metano, el hidrocarburo más sencillo, es degradado por un grupo especializado de bacterias, las metanotróficas, pero estos

microorganismos no oxidan hidrocarburos de mayor número de átomos de carbono. (Madigan et. al. 2004)

Para que se produzca una oxidación significativa de los hidrocarburos es necesaria la presencia de O_2. En ambientes óxicos, los microorganismos oxidadores de hidrocarburos pueden actuar sólo si otras condiciones ambientales, como temperatura, pH y concentración de nutrientes inorgánicos, son las adecuadas. Dado que el petróleo es insoluble en agua y menos denso, flota y forma manchas en su superficie. Las bacterias oxidadoras de hidrocarburo pueden atacar las gotículas insolubles de petróleo y a menudo pueden verse en grandes cantidades. La acción de dichas bacterias lleva a la descomposición del petróleo y a la dispersión de las gotículas. (Madigan et. al. 2004)

3.3.2.1 Biodegradación de crudo de petróleo mediante cepas aisladas

La elevada complejidad de la composición del crudo de petróleo y derivados, implica la existencia de una amplia capacidad enzimática si se quiere conseguir una degradación significativa del crudo. La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas individuales o con la combinación de diferentes cepas aisladas (Bayona et al., 1986; Palittapongarnpim et al., 1998; Solanas et al., 1984). En la mayoría de los casos, son degradadoras de alcanos, debido a que los alcanos son los componentes más abundantes del crudo de petróleo. No obstante en algunos casos, estas cepas tienen la capacidad de oxidar selectivamente las cadenas alquílicas de ciertos HAPs alquilados, compuestos abundantes en el crudo (Davis & Raymond, 1961). Resultados obtenidos por un grupo de investigadores del Departamento de Microbiología, de la Universidad de Barcelona, utilizando la cepa Pseudomonas sp. F21, aislada en medio mineral con un crudo ligero de Arabia corrobora la anterior afirmación; la cepa F21, la cual degrada todos los n-alcanos y los alcanos ramificados de bajo peso molecular (isoprenoides ligeros), también es capaz de degradar selectivamente las formas metiladas del naftaleno, fenantreno, pireno y criseno (Bayona et al., 1986; Solanas et al., 1984). Sin embargo, la cepa F21 es incapaz de utilizar los HAPs no substituidos (parentales), y por lo tanto la disminución de los alquil-HAPs se debe probablemente a la oxidación de las cadenas alquílicas, tal y como ya se ha descrito en otros degradadores de alcanos (Davis & Raymond, 1961). Recientemente, se han descrito algunas cepas con la capacidad de degradar tanto HAPs de elevado peso molecular como alcanos (Churchill et al., 1999),

pero ésta, no parece que sea una norma general. De hecho los degradadores de alcanos citados habitualmente en la bibliografía generalmente no son capaces de romper el anillo aromático de los HAPs, mientras que los degradadores de HAPs generalmente no crecen con alcanos (Foght et al., 1990)

3.3.2.2 Biodegradación de crudo de petróleo por cultivos mixtos

La alternativa a la utilización de cepas individuales es la obtención y utilización de cultivos mixtos, los cuales pueden ser consorcios definidos y consorcios no definidos. Los consorcios definidos se caracterizan por ser una combinación de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre sí. (Komukai-Nakamura et al., 1996; Casellas et al., 1998; Foght et al., 1998; 1999). Los consorcios no definidos se caracterizan por ser el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminación (Venkateswaran et al., 1995; Sugiura et al., 1997; Budzinski et al., 1998) y por lo tanto no son el resultado de una combinación de cepas previamente aisladas.

3.3.2.2.1 Consorcios definidos

Los consorcios definidos están bien caracterizados y son repetitivos pero tienen ciertas desventajas. En primer lugar, se necesitaría un gran número de cepas distintas para conseguir una degradación extensa del crudo de petróleo, debido a la gran cantidad de componentes presentes y al espectro metabólico limitado de una cepa bacteriana (Leahy et al. 1990). De hecho, tal y como se ha descrito anteriormente, muchos degradadores de alcanos no utilizan HAPs parentales, y entre los degradadores de HAPs, se ha descrito que, o bien degradan hidrocarburos monoaromáticos, o bien degradan HAPs de 2 a 3 anillos o de 3 a 4 anillos (Gibson y Subramanian, 1984; Van Hamme et al., 2003). Existe poca información acerca de cepas que crezcan en los HAPs alquilados de 3 o más anillos aromáticos (Gilewicz et al., 1997; Sabaté et al., 1999), muy abundantes en los crudos de petróleo. Además, habitualmente no se describe una degradación significativa de la parte no resuelta por cromatografía (UCM), constituida por componentes aún no identificados. Otra desventaja que podemos encontrar en los consorcios definidos es la posible formación de metabolitos intermediarios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo (Casellas et al., 1998; Kazunga y Aitken, 2000; Kazunga et

al., 2001). De hecho, se ha descrito que durante la degradación de mezclas de hidrocarburos se pueden formar intermediarios de persistencia y toxicidad desconocidas, por fenómenos de cometabolismo (Grifoll et al., 1995).

3.3.2.2.2 Consorcios no definidos

Los consorcios no definidos, especializados en la degradación de hidrocarburos, se obtienen a partir de enriquecimientos de muestras ambientales donde hayan existido episodios previos y recurrentes de contaminación por hidrocarburos. El resultado es una población microbiana seleccionada de forma natural por su cooperación metabólica en la degradación de la mezcla en cuestión, la cual potencialmente dispone de una mayor eficiencia en la degradación de compuestos conocidos y desconocidos que un consorcio definido. Por lo tanto, es más probable que en un consorcio no definido se hayan seleccionado degradadores de productos finales (dead-end products) que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (Grifoll et al., 1995).

3.3.2.3 Utilización de tensioactivos en estudios de biodegradación

Los tensioactivos llamados también surfactantes o agentes de superficie activa, son especies químicas con una naturaleza o estructura polar - no polar, con tendencia a localizarse en la interfase formando una capa monomolecular adsorbida en la interfase que cambia el valor de la tensión superficial.

Las soluciones de tensioactivos resultan ser activas al colocarse en forma de capa monomolecular adsorbida en la superficie entre las fases hidrofílicas e hidrofóbicas. Esta ubicación "impide" el tráfico de moléculas que van de la superficie al interior de líquido en busca de un estado de menor energía, disminuyendo así el fenómeno de tensión superficial.

Aunque una parte significativa de los hidrocarburos presentes en el medio ambiente es biodegradable, las tasas de biodegradación de los hidrocarburos en el medio ambiente están limitadas por su hidrofobicidad y baja solubilidad en agua (Alexander, 1999). En consecuencia, para mejorar el proceso de biodegradación, se han desarrollado estrategias con el objetivo de incrementar la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos mediante la adición de tensioactivos y por lo tanto aumentar la biodisponibilidad de los

mismos (Van Hamme et al., 2003). Los tensioactivos incrementan la dispersión/solubilización acuosa de los compuestos de baja solubilidad en varios órdenes de magnitud, disminuyen la tensión superficial del medio acuoso y además cambian la afinidad célula-hidrocarburo, al aumentar la hidrofobicidad de la superficie celular (Zhang & Miller, 1994; Kanga et al., 1997; Barkay et al., 1999). No obstante, la biodegradación de ciertos compuestos con relativa baja solubilidad puede estar inhibida por el uso de tensioactivos como resultado de: i) toxicidad a concentraciones elevadas de tensioactivo o hidrocarburos solubilizados; ii) biodegradación del tensioactivo y no de la matriz contaminante; iii) interferencias con el proceso de transporte de hidrocarburos a nivel de la membrana celular y iv) reducción de la biodisponibilidad por exceso de micelización del contaminante (Efroymson & Alexander, 1991; Rouse et al., 1994; Mulligan et al., 2001).

Teniendo en cuenta el uso potencial de los tensioactivos en las tecnologías de biorremediación (Ron & Rosenberg, 2001), la utilización de los biotensioactivos parece tener más potencial que los tensioactivos de síntesis (químicos), debido a la mayor diversidad estructural, biodegradabilidad y biocompatibilidad de los biotensioactivos (Desai et al., 1997). Los biotensioactivos más estudiados han sido los emulsanos de *Acinetobacter sp.* (Foght et al., 1989; Barkay et al., 1999) y el grupo de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* (Van Dyke et al., 1993; Zhang & Miller 1994).

La mayor parte de estudios sobre la influencia de los biotensioactivos en la degradación microbiana de hidrocarburos se han llevado a cabo con compuestos individuales como el octadecano. (Zhang & Miller, 1992), fenantreno (Barkay et al., 1999; Zhang et al., 1997) o fluoranteno (Willumsen et al., 1998). Estudios realizados con mezclas complejas, como es el caso del crudo de petróleo, son escasos (Foght et al. 1989), aunque la influencia de los biotensioactivos en la biodegradación de mezclas complejas supone una situación más cercana a la realidad.

Tomando en cuenta estas afirmaciones se lleva acabo este trabajo con la finalidad de aislar y evaluar el comportamiento de los microorganismos que son capaces de ayudar a la descontaminación de agua con hidrocarburos en la degradación de los mismos para que de esta manera poder llevar acabo una mejor bioremediación, y así poder apuntar información confiable que pueda utilizarse posteriormente para un mejor manejo de la técnica de remediación de las aguas.

4 HIPOTESIS

Sobre la base de los antecedentes recopilados sobre degradación de hidrocarburos, se espera encontrar bacterias degradadoras de crudo de petróleo dentro de las heterótrofas aisladas de las aguas empetroladas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General.

Aislar microorganismos desde aguas empetroladas de ENAP Magallanes y evaluar su capacidad biodegradativa.

5.2 Objetivos específicos.

5.2.1.- Describir la composición fisicoquímica del agua contaminada del área de estudio.
5.2.2.- Caracterizar bioquímica y morfológicamente los microorganismos presentes en el agua estudiada.
5.2.3.- Seleccionar el o los microorganismos apropiados para los ensayos de biodegradación.
5.2.4.- Realizar un ensayo de biodegradación del crudo de petróleo con los microorganismos seleccionados.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Metodología Analítica

6.1.1 Medios de cultivo

- Solución salina al 0.85%
- Caldo nutritivo (Difco)
- Agar nutritivo (Difco)
- Medio Mineral Mínimo M9:

$Na_2HPO_4*7H_2O$	12.8 g/L
KH_2PO_4	3.0 g/L
NaCl	0.5 g/L
NH_4CL	1.0 g/L

- Medio Mineral Mínimo M9 enriquecido con 0.1% de peptona y 0.2% de extracto de levadura.
- Agua empetrolada procedente de las instalaciones de ENAP Magallanes
- Petróleo crudo procedente de las instalaciones de ENAP Magallanes

6.1.2 Material de vidrio

- Tubos de ensayo
- Matraces erlenmeyer
- Pipetas
- Placas Petri
- Portaobjetos

6.1.3 Reactivos

- Alcohol
- Hexano
- Cristal Violeta

- Lugol
- Safranina
- Agua destilada

6.1.4 Equipos

- Autoclave
- Horno de esterilización Labtech
- Estufa de cultivo Labtech
- Agitador orbital Labtech
- Espectrofluorímetro
- Espectrofotómetro
- pHmetro de Campo Hanna Instruments
- Micropipetas
- Cubetas para Espectrofotómetro

6.1.5 Tinción Gram

Tinción Gram es la técnica de uso más común en microbiología, y permite dividir las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo a las propiedades físicas de la pared celular. (Seeley H, et. al., 1995)

Técnica:

- Realizar el frotis y fijación de la muestra.
- Aplicar cristal violeta durante un minuto.
- Lavar con agua.
- Mordiente: aplicar solución de yodo (lugol) durante un minuto.
- Agente decolorante: lavar con alcohol durante 30 segundos.
- Aplicar safranina por 30 segundos.
- Lavar con agua y secar al aire
- Examinar al microscopio.

6.1.6 Preparación de la galería API 20 NE (Biomerieux).

Se depositó aproximadamente 5 mL, de agua destilada en los alvéolos de la cámara, para proporcionar una atmósfera húmeda a la cámara de incubación. Se rotuló la cámara con la clave de la cepa respectiva. Luego, la galería de la bolsa hermética estéril fue incubada.

Preparación del inóculo.

En un tubo conteniendo 3 mL de cloruro de sodio al 0.85%, se realizó una suspensión bacteriana, la turbidez debía ser igual al patrón 0.5 de la Escala Mc. Farland.

Las colonias fueron obtenidas del cultivo puro en agar nutritivo.

Inoculación de la Galería

Se llenaron los microtubos, (no las cúpulas) de las pruebas Nitrato de Potasio o NO_3 a P-nitro-fenil-BD galactopiranosido o PNPG, con la suspensión bacteriana utilizando una pipeta Pasteur, evitando que se formen burbujas. Luego se transfirió 200µL de la suspensión bacteriana a una ampolla de medio Auxiliar (AUX Medium). Se homogenizó con la pipeta evitando la formación de burbujas. Después se llenaron los microtubos y las cúpulas de las pruebas Glucosa (GLU) a Fenil-acetato (PAC), de tal manera que el nivel del líquido quedaba horizontal o ligeramente convexo en la cúpula, nunca cóncavo.

Se llenó luego con aceite de parafina estéril las cúpulas de las tres pruebas subrayadas (GLU; Arginina (ADH); Urea (URE), de tal manera que se formó un menisco convexo. Luego se cubrió la cámara y se incubó a 30 ºC durante veinticuatro horas.

Lectura de la Galería

Después de veinticuatro horas de incubación, la lectura se llevó a cabo utilizando la tabla de lectura del API 20 NE. Se anotaron todas las reacciones espontáneas: GLU, ADH, URE, Esculina (ESC), Gelatina (GEL), PNPG y se registraron en las

fichas respectivas según el catálogo analítico. Las pruebas de NO_3 y Triptófano (TRP) se realizaron protegiéndolas de la contaminación.

Prueba de reducción de Nitratos a Nitritos

Se añadió una gota del reactivo Nitrato uno NIT1 y Nitrato dos NIT2 en la cúpula de NO_3. El viraje al color rojo, después de cinco minutos, indicó una reacción positiva.

Prueba de producción de indol. (TRP).

Se añadió una gota del reactivo para Indol. La presencia de un color rosa en la cúpula indicaba una reacción positiva.

Prueba de asimilación.

Se observó el crecimiento bacteriano, el cual se evidencia por la turbidez de la cúpula. En algunos casos, fue necesario una reincubación por veinticuatro horas más, excepto las pruebas de NO_3, TRP, y GLU que debían ser leídas únicamente a las veinticuatro horas.

6.1.7 Utilización de microplato GN2 (Biolog).

El procedimiento del test es rápido y simple, comprende solo 5 pasos, y se requieren solo 2 a 3 minutos en la realización del test.

1) El cultivo de bacterias puro que se quiere identificar se siembra en agar nutritivo hasta que crezca.
2) La bacteria es tomada desde la placa con agar y se suspende en la solución del test Biolog GN2 a una densidad comparada con la escala Nº 2 de Mc Farland.
3) Se toman 150 µl de la solución bacteriana y se pipetean a cada microplato del GN2.
4) La placa GN2 es incubada a 25º C durante 24 horas en medio húmedo.
5) La placa GN2 es leída de manera visual, y enviada a el laboratorio de Biolog para determinar los resultados. Los microplatos que presentas un color violeta son considerados como positivos.

6.2 Metodología Experimental

6.2.1 Toma de muestra.

- **Locación Geográfica**: el lugar donde fue tomada la muestra se denomina “Daniel”, en la comuna de San Gregorio, Provincia de Magallanes, XIIª Región de Magallanes y Antártica Chilena. (fig. 2)



Figura 2. Región de Magallanes, comuna de San Gregorio

- **Datos físicos**: el clima que predomina en la comuna de San Gregorio es el de Estepa Frío (BSk’c). Este se caracteriza por presentar una amplitud térmica mas acentuada y una pluviometría relativamente baja. Los montos anuales de esta última pueden alcanzar a los 400 mm/año en su límite occidental, mientras que hacia el interior, con dirección este y norte, estos no superan los 200 mm/año. En áreas del interior las temperaturas medias de los meses de invierno no superan los 0ºC y las extremas pueden alcanzar entre los -25ºC a los -30ºC. En verano también pueden registrarse temperaturas extremas de hasta -11ºC y durante el día esta puede ser de 30ºC.

- **Área de estudio (Fosa “Daniel 2”)**
Según el estudio realizado por Fundación Chile para ENAP Magallanes en Diciembre del 2005 llamado, “Caracterización Ambiental de Fosas” una de las fosas que requiere mayor atención, clasificada como crítica, de acuerdo a los criterios que ellos utilizaron es la fosa Daniel 2, junto con otras 3 fosas de las 20 que fueron estudiadas. Presenta grandes dimensiones y abarca una extensa zona. Está conformada por

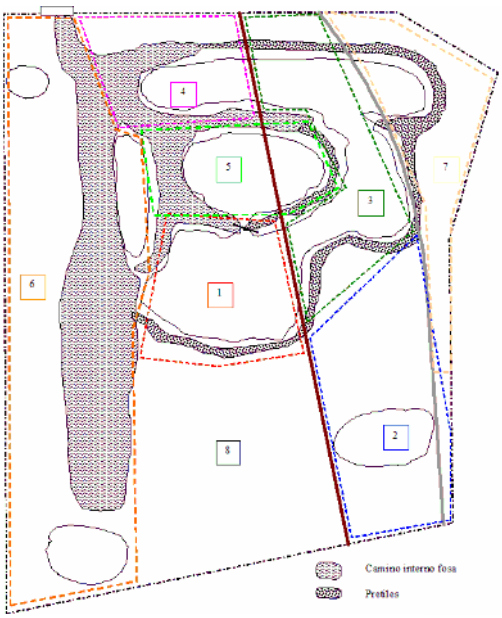

Figura 3: Esquema Fosa Daniel 2

ocho sub-fosas (Fig. 3) y en la zona además han habido en el pasado, derrames de hidrocarburos por rupturas de cañerías. Las dimensiones estimadas de la fosa son de 100 x 150 metros y las coordenadas exactas 4206192N, 517542E. La fosa contiene agua y petróleo líquido a lo largo de toda su superficie. El petril está en buen estado y también se encuentra cercada para evitar el acceso de animales a la fosa.

- Se elige esta fosa para el estudio por su composición de agua y crudo, (fig. 4), es de fácil acceso para el muestreo debido a su gran tamaño (es la mas extensa de todas las fosas que se caracterizaron), y dentro de las clasificadas como críticas es la que se encuentra más próxima al campamento de ENAP Posesión, donde las muestras pueden ser refrigeradas lo antes posible para su traslado hasta el laboratorio en el que serán analizadas.

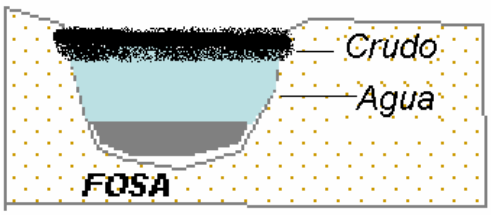

Figura 4: Composición de la fosa

6.2.2 Caracterización física y química del agua.

En el lugar de muestreo se midió directamente de la temperatura y pH con el instrumento de Hanna Instruments.

Una vez trasladada la muestra al Laboratorio de Microbiología del Departamento de Biología y Ciencias Ambientales de la Universidad de Valparaíso, se envió una parte al Laboratorio de Química Ambiental de la misma Universidad para analizar los parámetros del Decreto Supremo Nº 90, según la metodología que éste exige.

6.2.3 Crudo de Petróleo.

- El crudo de petróleo utilizado fue obtenido de la misma fosa en estudio, el cual estaba sobrenadante en el agua.

  Sus principales características son:

  - Densidad API 15º C: 21,4
  - Contenido de S: 0.15%
  - Sales: 4.47 [lb/1000 bb]

- Densidad relativa: 0.9194 [g/cm^3]

- Para su utilización se esterilizó con calor húmedo en el autoclave a 120º C y a 1 atmósfera de presión extra por 20 minutos.

6.2.4 Aislamiento, Recuento y Caracterización de microorganismos.

6.2.4.1 Aislamiento de microorganismos desde el agua

- De cada una de las muestras de agua se tomaron 500 µL y se sembró en tubos con Caldo Nutritivo. Se incubó a 25º C por 48 horas. Luego se sembró en placas de Agar Nutritivo por agotamiento por estría. Se incuba a 25º C por 48 horas, y se aíslan todas las colonias que se ven.

- Paralelamente la muestra se sembró directo en placa de Agar Nutritivo por la técnica de dilución y plaqueo, para realizar recuento de microorganismos. Se toma 1 mL de la muestra original y se agrega a un tubo de ensayo que contiene 9 mL de Solución Salina al 0.85%, se homogeniza, de ese tubo se toma 1 mL y se agrega a otro tubo que también contiene 9 mL de Solución Salina al 0.85%, así sucesivamente hasta encontrar una dilución adecuada para el recuento. De las ultimas diluciones se toma un inoculo y se siembra de manera homogénea en placas con agar nutritivo. Se incubó a 25ºC por 48 horas. El cálculo se realiza a través de la siguiente fórmula: $\frac{N^o cel}{mL} = \frac{N^o colonias}{dilución \cdot inóculo}$

- De la muestra se sembró directo en placa con Agar Nutritivo por agotamiento en estría. Se incuba a 25º C. Luego de la incubación se aíslan todas las colonias posibles, se siembran en otra placa de Agar Nutritivo. y se incuba a 25º C, este procedimiento se realiza hasta que la cepa se encuentre pura.

6.2.3.2 Aislamiento de microorganismos del crudo de petróleo.

- De la muestra se sembró en forma homogénea, y por estría, en placa de Agar Nutritivo y se incubaron a 25º C por dos días. Luego de observar crecimiento se aislaron y se caracterizaron las cepas heterótrofas encontradas.

- Todas las cepas aisladas desde al agua y del crudo, se describen según morfología. Para esto se realizó Tinción Gram a todas las cepas y se caracterizaron según parámetros como:

    - Forma: puntiforme, circular, rizoide, irregular, filamentosa.
    - Borde: liso, ondulado, lobulado, irregular.
    - Elevación: plana, elevada, cóncava, convexa, umbilicada.
    - Opacidad: translúcida, opaca, brillante.
    - Cromogénesis: color de la colonia
    - Superficie: suave, rugosa

- Una vez que se tuvo caracterizada morfológicamente y se comprobó la pureza de cada cepa, se sembró en tubo Agar Nutritivo inclinado y se incubó a 25ºC.

- Se realizó el test API 20 NE, para la caracterización bioquímica de cada cepa, el cual es un sistema estandarizado que combina ocho pruebas bioquímicas y doce pruebas de asimilación, además de la prueba de oxidasa. Este sistema se aplica a cepas bacterianas que no pertenecen a la Familia de las Enterobacterias. La galería API 20 NE está compuesta de veinte microtubos que contienen medios y/o substratos en forma deshidratada. Este test da una clasificación preliminar de la especie de la cepa.

6.2.5 Selección de bacterias degradadoras.

- Una vez identificadas las bacterias heterótrofas del agua y del crudo, se sembró cada cepa aislada del agua en tubos con 5 mL de M9 enriquecido con peptona y extracto de levadura, y se incubó a 25º C por 3 días.

- Paralelo a esto se hace una prueba con el medio mínimo elegido, se siembra las cepas aisladas del agua en placas con M9 y 2% de agar-agar, y se incuban a 25º C por 3 días, comprobando que no existe crecimiento de la cepa.

- Luego de los 3 días de incubación de los tubos y notando un crecimiento de la cepa se siembra en placa con M9 y se le agrega como única fuente de carbono petróleo crudo sin esterilizar en forma homogénea, se incuba a 25º C por 1 semana.

- Se aislaron todas las colonias que se observaron se sembraron en tubos de 5 mL de M9 enriquecido y se siembran por 2 días a 25º C, y luego se siembran por agotamiento por estría en placas de Agar Nutritivo, se incuba a 25º C por 3 días.

- A las colonias que se observan se le realizó una identificación a través de tinción Gram y el test API 20 NE, estos resultados se compararon con los realizados a las cepas aisladas del agua, para comprobar que se trataba de la misma cepa. Los resultados que coincidían fueron las cepas elegidas para realizar el ensayo de biodegradación.

6.2.6 Ensayo de biodegradación y crecimiento bacteriano.

- Las cepas que fueron seleccionadas para el ensayo fueron resembradas en Agar Nutritivo comprobando una vez más su pureza, a través de tinción Gram, y se le realizó un test GN2 de Biolog (Anexo 3) para una identificación taxonómica más precisa, ya que este test posee un mayor número de pruebas que el API 20 NE.

- Se tomaron 0.2080 gr de crudo estéril y añadiéndole hexano se pasó por un embudo conectado a una bomba de vacío, que contenía una frita para retener la

tierra que pudiera contener el crudo, y agregándole sulfato de sodio (Na_2SO_4) como agente desecante para retirar el exceso de agua que contenga, y se afora a 50 mL con hexano.

- Se esterilizaron matraces de agitación de 100 mL, y de manera estéril se le agregó 150 µL de crudo diluido en 50 mL de hexano, se dejan bajo campana hasta que el hexano se evapora y luego se le agrega 25 mL del medio de cultivo mínimo M9 estéril. Para inocular la cepa es necesario realizar una suspensión bacteriana en un tubo que contiene 10 mL de M9, hasta alcanzar una turbidez igual al patrón 2 de la Escala Mc. Farland. Se incubaron 5 matraces con 1 mL de la suspensión bacteriana cada uno y se pusieron en el agitador a 120 rpn.

- Las mediciones de hidrocarburo se realizan a través de espectrofluorimetría contra un blanco de hexano, para la calibración del equipo, en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad de Valparaíso.

  Condiciones del equipo para la medición de hidrocarburos:
  - Excitación 310
  - Emisión = 360
  - Escala = 1

  Se preparó una curva de calibrado con la misma dilución del crudo que se inocularon los matraces para la prueba.

  La extracción y medición de hidrocarburo se realizó de la siguiente manera:

  - Se agregó a la muestra a medir 10 mL de hexano y se agitó con un agitador magnético durante 10 minutos.
  - Se dejó reposar durante 1 minuto y se extrajo la capa hexánica utilizando un embudo de separación.
  - Se traspasó la capa hexánica a otro recipiente.
  - Se agitó nuevamente la muestra que contenía los 10 mL de hexano durante 10 minutos.
  - Se dejó reposar y se extrajo la capa de hexano.

- Se trasvasijó la capa hexánica al recipiente.
- Una vez extraído todo el hexano de la muestra, se eliminó la pequeña cantidad de agua existente en el recipiente que contenía la muestra. Para ellos se agregó una punta de espátula de Na_2CO_3.
- La muestra extraída se lleva a un volumen de 10 mL con hexano y se lee en el instrumento.

Este procedimiento se realizó para cada muestra, y para los blancos de cada cepa, que consistían en el Medio Mineral M9 y la cepa correspondiente.

Las mediciones serian para cada cepa las siguientes:

Fecha	**Nº matraz**	**Días degradando**	**Tiempo**
30-Jul	0		Blanco
30-Jul	1	0	T_0
06-Ago	2	7	T_1
10-Ago	3	11	T_2
14-Ago	4	15	T_3
20-Ago	5	21	T_4

- Para el crecimiento bacteriano se utilizó espectrofotómetro, midiendo absorbancia a 600 nm. Se tomó un inóculo de cada matraz que estaba en el agitador con una micropipeta para realizar la medición, se calibró el instrumento con un blanco que contenía el medio mínimo M9 y el crudo de petróleo en las mismas concentraciones que el matraz. Esta prueba se realizó por 21 días.

7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Caracterización fisicoquímica del agua.

Se obtuvieron cuatro muestras de la fosa, con botellas de vidrio a una profundidad de 10 cm. aproximadamente. Posteriormente las muestras fueron rotuladas y transportadas al Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Valparaíso, de manera rápida y manteniendo una temperatura de 6º C aproximadamente.

Se midieron los parámetros normados en el Decreto Supremo Nº 90, que establece la norma de emisión para la regulación de contaminantes asociados a las descargas de residuos líquidos a aguas marinas y continentales superficiales.

Se debe considerar que dos de los ítems que se tienen en el decreto ya mencionado, corresponden a medidas echas en terreno, ellas son pH (sin unidades) y Temperatura (º C), los demás compuestos se miden en [mg/L].

El agua en estudio se analizó bajo esta normativa, ya que la única alternativa es su vertido si es que esas aguas no son tratadas y reutilizadas para otro fin. La empresa no cuenta con instalaciones para que sean vertidas dentro de la zona de protección litoral (ZPL) ni fuera de ella, por eso se comparó bajo ambos límites máximos permitidos, si en un futuro quisieran descargar sin previo tratamiento, se tenga en conocimiento en que condiciones se encuentra el agua para dicha acción.

Para los casos en que los valores obtenidos en el análisis, están bajo el límite de detección que proporciona el instrumento, se consideró los valores del límite de detección como el máximo y por lo tanto este valor es el que se grafica.

En los gráficos logarítmicos siguientes (Figura 5 y 6) se diagrama el valor de cada parámetro medido en la Fosa “Daniel 2” comparado con el decreto 90.

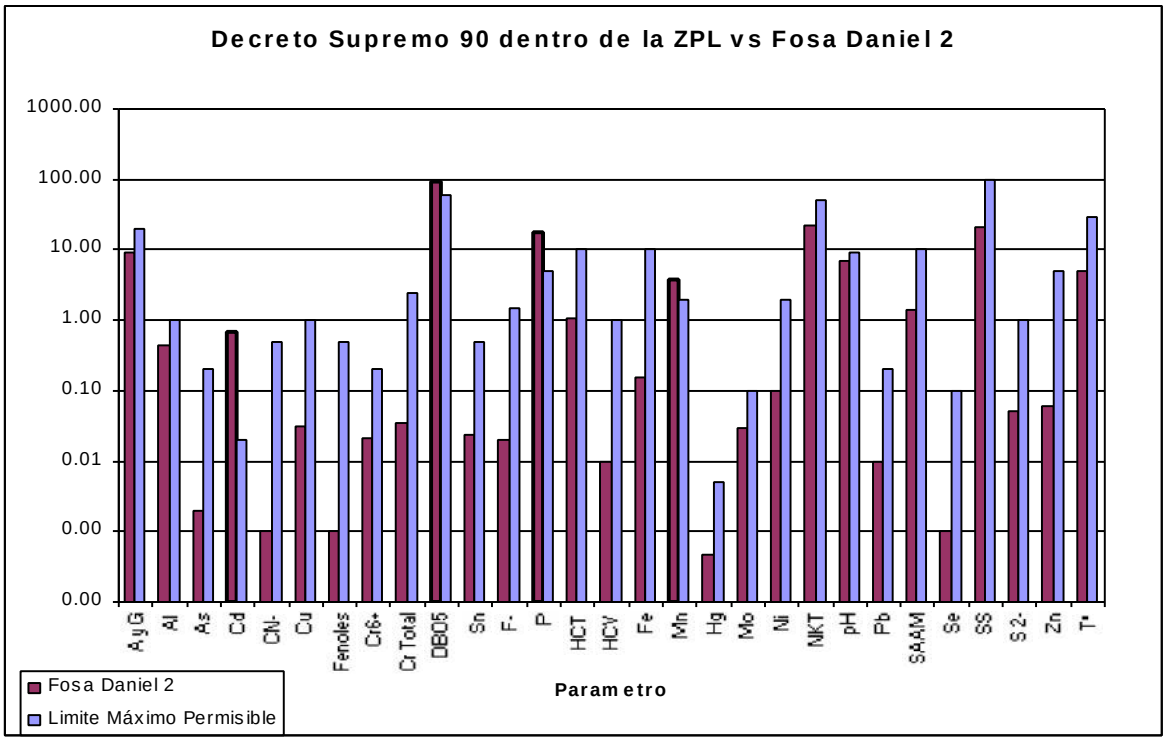

Figura 5. Parámetros evaluados en el D.S. 90 dentro de la ZPL para la fosa Daniel 2.

Parámetros que sobrepasan la norma: Cd, DBO_5, P, Mn.

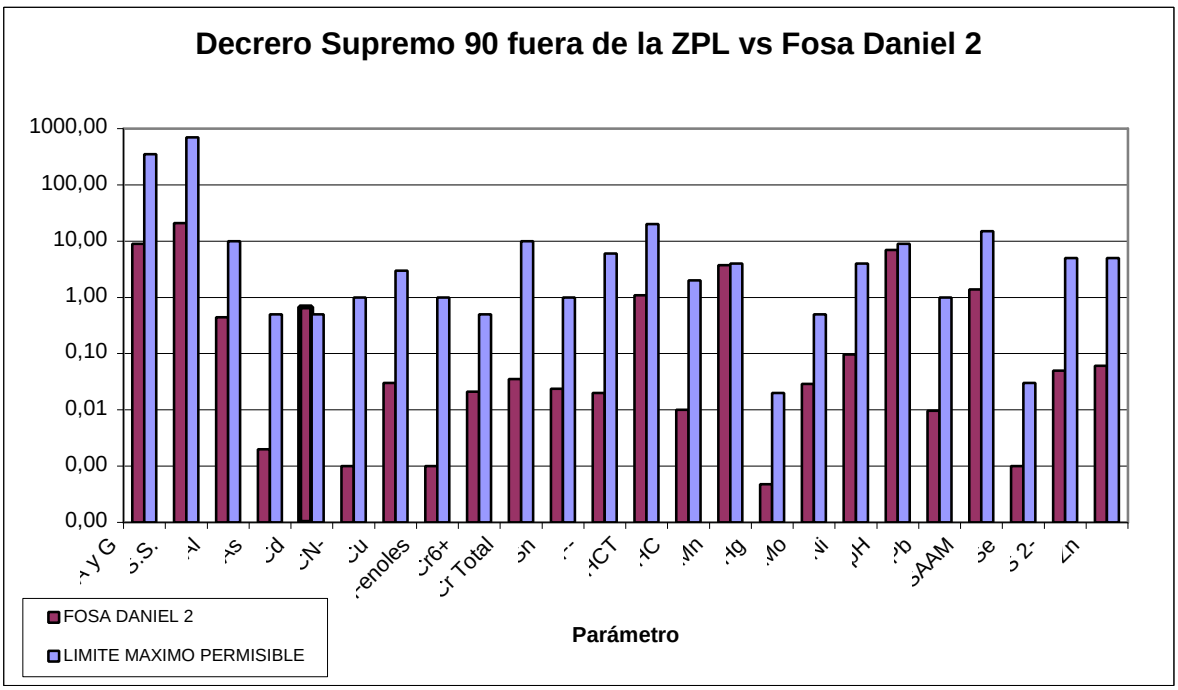

Figura 6. Parámetros evaluados en el D.S. 90 fuera de la ZPL para la fosa Daniel 2.

Parámetros que sobrepasan la norma: Cd.

El cadmio es el parámetro que sobrepasa la normativa dentro y fuera de la ZPL. La fuente más importante de descarga de cadmio al medio ambiente es la quema de combustibles fósiles (como carbón o petróleo) o la incineración de basura doméstica común. En este caso el exceso de cadmio se puede deber también a la descomposición de rocas que se encuentras aledañas al sitio de muestreo. Produce efectos tóxicos en los organismos vivos, aun en concentraciones muy pequeñas.

La DBO_5 mide la eficiencia de depuración del agua, como éstas no poseen ningún tratamiento se encuentra fuera de la normativa para el vertido del agua con esas concentraciones dentro de la ZPL. Se utiliza de manera indirecta para medir la cantidad de carga orgánica biodegradable presente en el agua. La fuente de esta evidente contaminación de origen orgánico puede ser la acumulación de excremento de los animales que circulan por el sector, hay que recordar que la fosa se encuentra en campos donde se cría ganado y existe presencia también de otros animales y aves.

El contenido de Fósforo que sobrepasa la normativa también se puede adjudicar a la cantidad de estiércol que puede caer dentro de la fosa producto de la población bovina que circula por el sector donde fue tomada la muestra. Esto puede causar una eutrofización en el agua.

El manganeso en exceso es tóxico, puede provocar efectos adversos en el sistema nervioso, respiratorio y otros. Se encuentra en forma natural en muchos tipos de roca, y al igual que el cadmio, se descarga al medio ambiente por la quema de combustibles fósiles como carbón o petróleo.

En la Tabla Nº 4 y Nº 5 se muestra para cada uno de los compuestos medidos, su nomenclatura (abreviación), su límite de detección y el valor de la norma (decreto 90) para cada caso, (Tabla 4 y 5 del Decreto 90).

Tabla Nº 4: Límites establecidos en el Decreto 90 dentro de la zona de protección litoral y los detectados en la Fosa Daniel 2.

Contaminante	Unidad	Expresión	Limite Máximo Permisible	Fosa Daniel 2
Aceites y Grasas	mg/L	A y G	20	9.00
Aluminio	mg/L	Al	1	0.445
Arsénico	mg/L	As	0.2	0.002
Cadmio	mg/L	Cd	0.02	0.680
Cianuro	mg/L	CN^-	0.5	0.001
Cobre	mg/L	Cu	1	0.0303
Índice de Fenol	mg/L	Fenoles	0.5	0.001
Cromo Hexavalente	mg/L	Cr^{6+}	0.2	0.021
Cromo Total	mg/L	Cr Total	2.5	0.0354
DBO_5	mg O_2/L	DBO_5	60	95.3
Estaño	mg/L	Sn	0.5	0.0237
Fluoruro	mg/L	F^-	1.5	0.02
Fósforo	mg/L	P	5	17.4
Hidrocarburos Totales	mg/L	HCT	10	1.09
Hidrocarburos Volátiles	mg/L	HCV	1	0.01
Hierro Disuelto	mg/L	Fe	10	0.153
Manganeso	mg/L	Mn	2	3.76
Mercurio	mg/L	Hg	0.005	0.00048
Molibdeno	mg/L	Mo	0.1	0.029
Níquel	mg/L	Ni	2	0.0971
Nitrógeno Total Kjeldahl	mg/L	NKT	50	22.4
pH	Unidad	pH	9	7.00
Plomo	mg/L	Pb	0.2	0.0096
SAAM	mg/L	SAAM	10	1.39
Selenio	mg/L	Se	0.1	0.001
Sólidos Suspendidos Totales	mg/L	SS	100	20.9
Sulfuros	mg/L	S^{2-}	1	0.05
Zinc	mg/L	Zn	5	0.061
Temperatura	ºC	Tº	30	5

Tabla Nº 5: Limites establecidos en el Decreto 90 fuera de la zona de protección litoral y los detectados en la Fosa Daniel 2.

Contaminante	Unidad	Expresión	Limite Máximo Permisible	Fosa Daniel 2
Aluminio	Mg/L	Al	1	0.445
Arsénico	Mg/L	As	0.2	0.002
Cadmio	Mg/L	Cd	0.02	0.680
Cianuro	Mg/L	CN^-	0.5	0.001
Cobre	Mg/L	Cu	1	0.0303
Índice de Fenol	Mg/L	Fenoles	0.5	0.001
Cromo Hexavalente	Mg/L	Cr^{6+}	0.2	0.021
Cromo Total	Mg/L	Cr Total	2.5	0.0354
DBO_5	Mg O_2/L	DBO_5	60	95.3
Estaño	Mg/L	Sn	0.5	0.0237
Fluoruro	Mg/L	F^-	1.5	0.02
Fósforo	Mg/L	P	5	17.4
Hidrocarburos Totales	Mg/L	HCT	10	1.09
Hidrocarburos Volátiles	Mg/L	HCV	1	0.01
Hierro Disuelto	Mg/L	Fe	10	0.153
Manganeso	Mg/L	Mn	2	3.76
Mercurio	Mg/L	Hg	0.005	0.00048
Molibdeno	Mg/L	Mo	0.1	0.029
Níquel	Mg/L	Ni	2	0.0971
Nitrógeno Total Kjeldahl	Mg/L	NKT	50	22.4
pH	Unidad	pH	9	7.00
Plomo	Mg/L	Pb	0.2	0.0096

El las Tablas 4 y 5 se puede observar que los límites permitidos fuera de la ZPL son considerablemente mas bajos que para dentro de la ZPL, además de exigir una cantidad menor de parámetros.

A pesar que la concentración de hidrocarburo presente en el agua en estudio, no excede la normativa vigente dentro ni fuera de la ZPL, el compromiso ambiental que adquirió la empresa lo hace responsable del tratamiento y eliminación del hidrocarburo presente en agua, y existe la posibilidad que en otra fosa, la concentración del crudo no esté bajo la normativa y sea necesario realizar un tratamiento exigido por la ley.

7.2 Aislamiento, Recuento y Caracterización de microorganismos del agua.

Por la técnica de dilución y plaqueo se midió el número de células por mL, heterótrofas que se encuentran en el agua, partiendo de la base que la formación de una colonia es a partir de una célula.

Se diluyó cuatro veces, y se sembró homogéneamente 0,1 mL de la última dilución por duplicado, y se sacó un promedio de las colonias por placa. Aplicando la fórmula, se obtuvo que:

$$\frac{N^o\,cel}{mL} = \frac{17}{10^{-4}\cdot 0{,}1} = 1.7x10^6\,\frac{cel}{mL} \qquad \frac{N^o\,cel}{mL} = \frac{28}{10^{-4}\cdot 0{,}1} = 2.8x10^6\,\frac{cel}{mL}$$

Sacando el promedio entre las dos se obtiene que hay $2.25x10^6\,\frac{cel}{mL}$.

Este resultado está en el orden de 10^6 UFC mL^{-1}, el que coincide con el estudio realizado por Pineda *et. al*. el año 2002 en México, y por Lopolito *et. al.* el 2003, que en el recuento de microorganismos en un medio con hidrocarburos obtuvieron que el crecimiento se estabilizó en $1x10^6$ UFC mL^{-1} con una variación del 10% durante tres semanas de incubación, y entre $1x10^4$ y $1x10^8$ UFC mL^{-1} luego de tres semanas de incubación en un medio con hidrocarburos, respectivamente.

Se aislaron catorce cepas bacterianas a partir de cinco muestras de agua empetrolada procedente de instalaciones de ENAP Magallanes en la localidad de Posesión.

De acuerdo a la tinción Gram se clasificó en Gram Negativo o Positivo resultando el 100% de las cepas Gram Negativa, de las cuales 21.4% fueron bacilos largos y delgados, y el mismo porcentaje se obtuvo para bacilos delgados y bacilos cortos. Un 14.3% fueron bacilos, y un 7.1% coco bacilos, al igual que coco agrupados y forma de coma. La figura 7 muestra la distribución de las distintas morfologías encontradas.

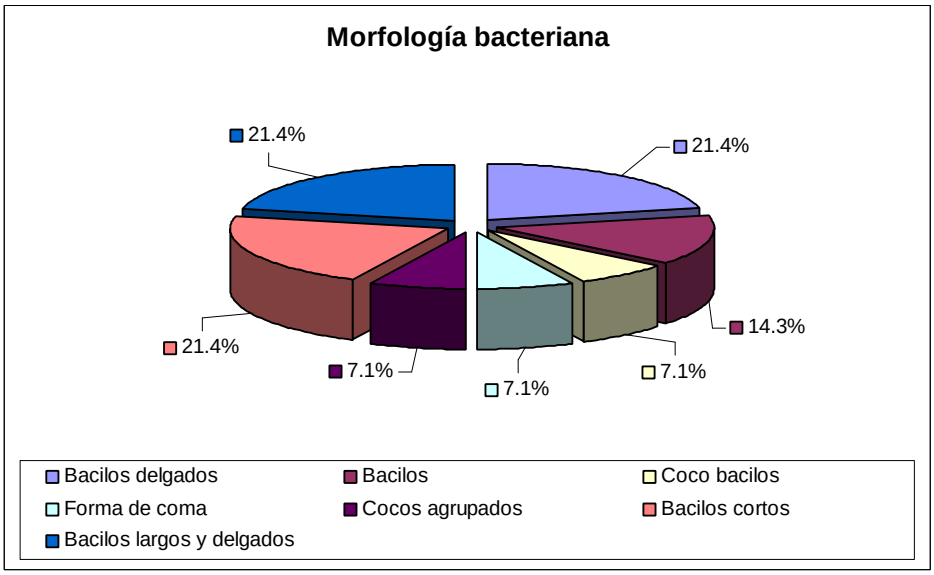

Figura 7. Distribución morfológica de las cepas aisladas heterótrofas del agua.

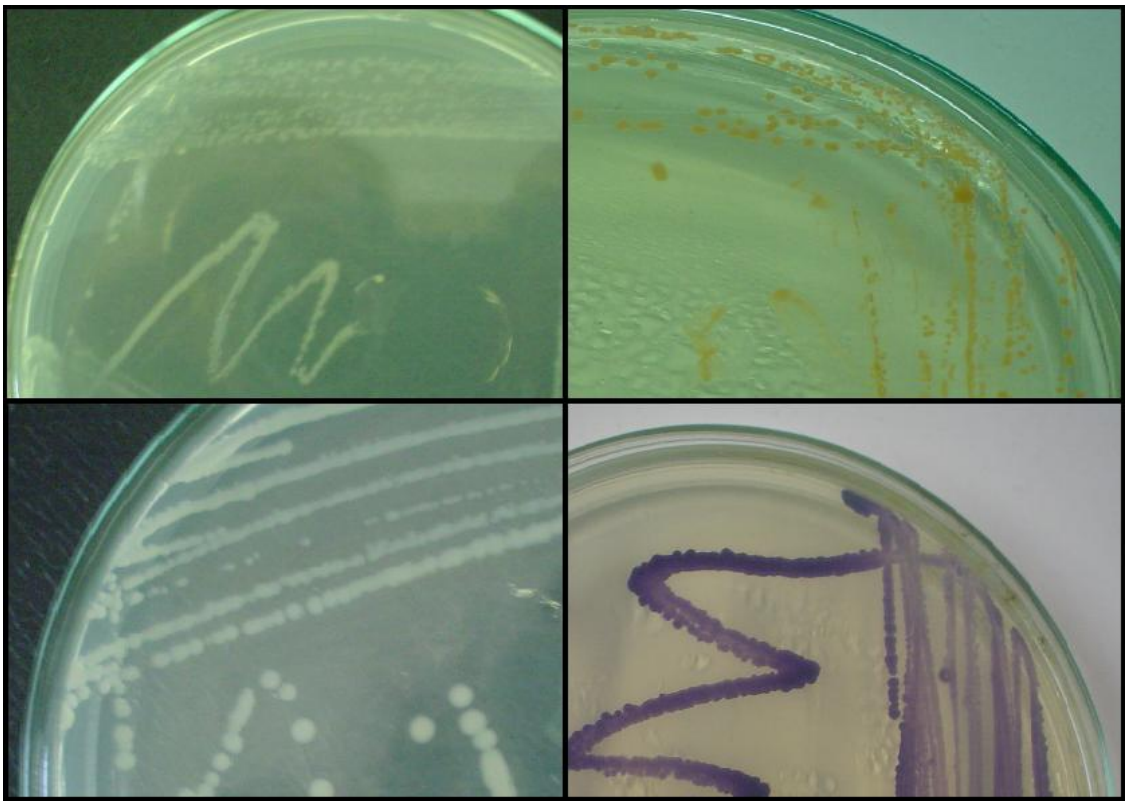

Figura 8. Cepas heterótrofas aisladas desde al agua.

En la Figura 8 se observan cuatro cepas bacterianas aisladas del agua, se pueden distinguir por su cromogénesis y se ve claramente algunas colonias aisladas, que crecieron sobre la placa con Agar Nutritivo.

Para la identificación se realizó el test rápido API 20 NE, para bacterias no entéricas, ya que todas resultaron ser Gram Negativas. Este test es una identificación preliminar ya que no es un sistema de precisión y para una identificación correcta es necesario realizar un análisis genético a cada cepa.

Según los resultados obtenidos por el test, un 35.7% corresponde a *Pseudomonas fluorescens*, un 21.4% a Brevundimonas vesicularis, un 14.3% a *Burkholderia cepacia*, y con 7.1 % *Chryseobacterium meningospectium*, *Chryseomonas luteola, Stenotrophomonas maltophilia* y *Sphingobacterium spiritovorum.*

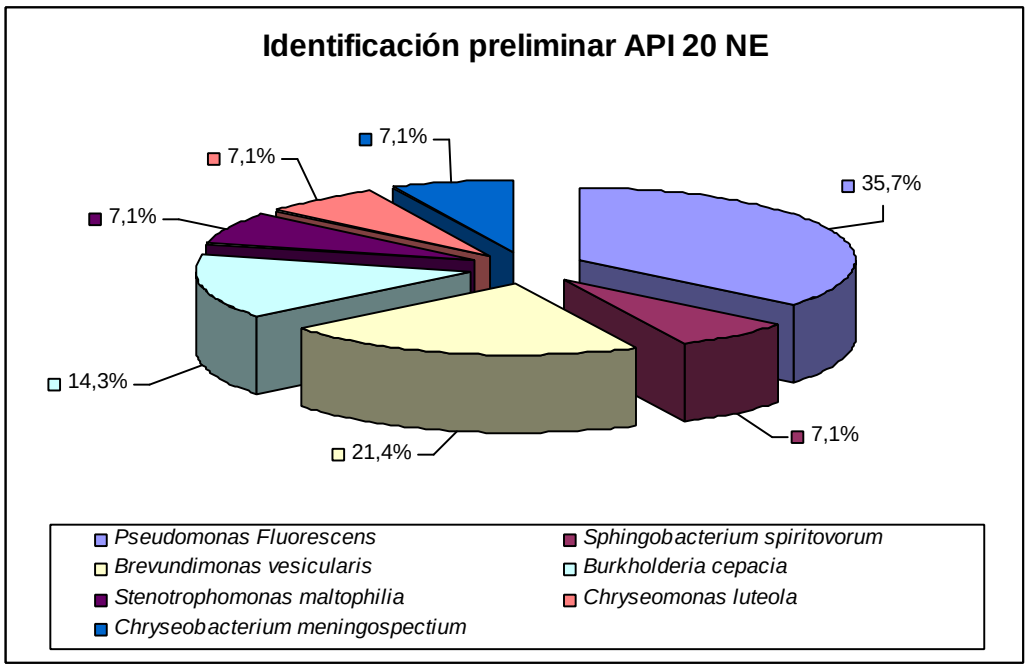

Figura 9. Identificación preliminar con el test API 20 NE de las cepas heterótrofas aisladas del agua

En la Figura 9 se demuestra que el mayor porcentaje encontrado corresponda a la especie *Pseudomonas,* esto da un buen indicio para realizar la biodegradación ya que es sabido que bacterias de esa especie degradan petróleo, como lo han

demostrado varios autores, como por ejemplo el estudio que realizó Brancho *et. al*., el 2004 en Venezuela, quienes evaluaron la capacidad de 14 cepas de *Pseudomonas* para degradar constituyentes de la fracción aromática del petróleo. Ellos encontraron que el 100% de las cepas estudiadas fueron capaces de degradar los hidrocarburos naftaleno y antraceno, y un 71.42% los otros compuestos. Esto demuestra que las cepas aisladas poseen capacidades enzimáticas para degradar estos compuestos.

Así también lo demostró Rojas *et.al.* (2005), quien con su grupo de investigadores estudiaron la degradación de gasoil por un cultivo mixto constituido por una mezcla de tres cepas de *Pseudomonas*, las que fueron aisladas de muestras de emulsiones de petróleo pesado en agua y de cultivos de enriquecimiento preparados con parafina líquida mezclada con dibenzotiofeno como única fuente de azufre, carbono y energía. Ellos determinaron que el cultivo mixto es capaz de degradar compuestos modelo y crecer en un sustrato más complejo como el gasoil formado por una extensa mezcla de hidrocarburos.

Más del 70% de las cepas aisladas presentaron una forma circular, opaca, suave y una cromogénesis de tonos amarillo o anaranjado. Sólo tres cepas presentaron cromogénesis fuerte, dos naranja fuerte una fue identificada como *Brevundimonas vesicularis* y la otra como *Chryseomonas luteola.* Y una de color violeta que fue identificada como *Burkholderia cepacia*. Todas utilizando el test API 20 NE.

En la tabla Nº 6 se muestran todos los parámetros evaluados para la caracterización de las cepas aisladas desde al agua en estudio y la identificación preliminar obtenida a través del test API 20 NE.

Tabla Nº 6: Caracterización de cepas heterótrofas aisladas del agua empetrolada.

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Opacidad	Cromogénesis	Superficie	Gram	API 20 NE
LT1	Circular	dentado	convexa	Opaca	amarillenta	suave	(-) Bacilos delgados	*Pseudomonas fluorescens 99.1%*
LT2	Circular	liso	convexa	Opaca	naranja	suave	(-) Cocobacilos	*Brevundimonas vesicularis 81.3%*
LT3	circular	liso	plana	Opaca	anaranjada	rugosa	(-) Bacilos	*Pseudomonas flourescens 84.4%*
LT4	circular	liso	plana	Opaca	naranja fuerte	suave	(-) Bacilos delgados	*Brevundimonas vesicularis 99.7%*
LT5	circular	liso	convexa	Translúcida	anaranjada	suave	(-) Bacilos largos y delgados	*Brevundimonas vesicularis 91.5%*
LT6	circular	dentado	convexa	Translúcida	naranja	suave	(-) Forma de coma	*Sphingobacterium spiritovorum 98.7%*
LT7	irregular	dentado	plana	translúcida	blanca	rugosa	(-) Bacilos	*Pseudomona fluorescens 92.3%*
LT8	circular	dentado	convexa	translúcida	blanca	suave	(-) Bacilos delgados	*Stenotrophomonas maltophilia 99.7%*
LT9	circular	liso	convexa	Opaca	naranja fuerte	suave	(-) Cocos agrupados	*Chryseomonas luteola 91.8%.*
LT10	irregular	irregular	convexa	Opaca	amarilla	Suave	(-) Bacilos cortos	*Chryseobacterium meningospectium 69.8%*
LT11	circular	liso	plana	opaca	rosada pálida	Rugosa	(-) Bacilos largos delgados	*Pseudomonas flourescens 51.5%*
LT12	irregular	dentado	convexa	opaca	blanca	Suave	(-) bacilos cortos	*Pseudomona fluorescens 90.8%*
LT13	circular	dentado	Plana	opaca	violeta	Rugosa	(-) Bacilos largos delgados	*Burkholderia cepacia 99.9%*
LT14	circular	liso	Convexa	opaca	blanca	Suave	(-) Bacilos cortos	*Burkholderia cepacia 99.0%*

7.3 Aislamiento y Caracterización de microorganismos del Crudo de Petróleo.

De la muestra de crudo obtenida en el lugar de estudio, se aislaron y caracterizaron siete microorganismos, de los cuales un 42.9% corresponde a bacterias Gram positivas, un 28.6% a Gran negativas y el mismo porcentaje para levaduras.

Dentro de las bacterias Gram positivas se encontraron bacilos no esporulados y bacilos esporulados, y las bacterias Gram negativas, bacilos delgados y bacilos cortos.

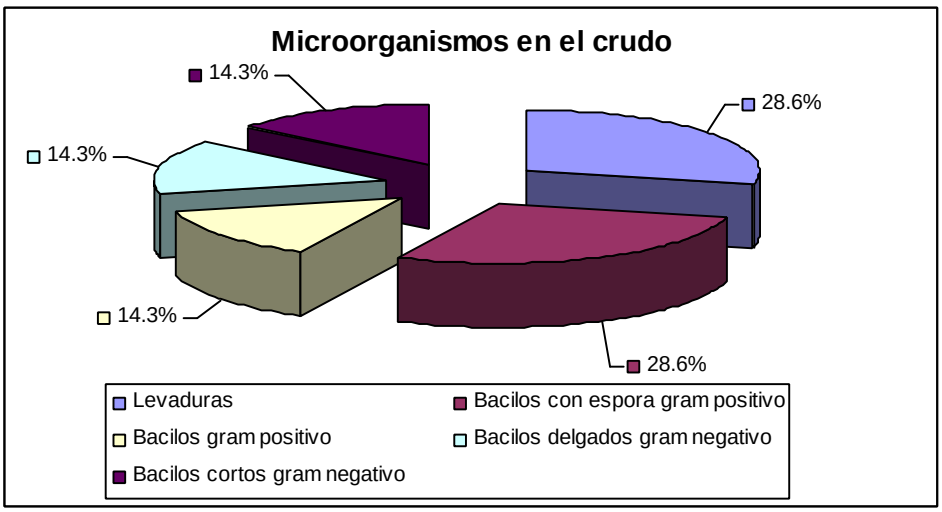

Figura 10. Distribución de los Microorganismos aislados del crudo.

La Tabla Nº 7 muestra los parámetros evaluados para la caracterización de cada cepa aislada. Se observa que, a diferencia de lo que se encontró en el agua, desde el crudo se aislaron bacterias Gram Positivas esporuladas, y levaduras, sumando entre las dos más de 50% del total.

El número de microorganismos aislados del crudo es notoriamente menor a los encontrados en el agua, esto puede deberse a la complejidad de la composición del crudo en comparación con dichas aguas. Y a pesar que las muestras fueron extraídas del mismo sitio, los microorganismos que se encuentran en las dos fases son totalmente diversos.

Tabla Nº 7: Caracterización microorganismos aislados del crudo de petróleo

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Opacidad	Cromogénesis	Superficie	Gram
C 1	circular	liso	plana	opaca	Blanca	suave	(+) bacilos con espora
C 2	circular	dentado	convexa	opaca	Blanca	rugosa	levadura
C 3	circular	dentado	umbilicada	opaca	Blanca	rugosa	(+) Bacilos
C 4	puntiforme	liso	plana	trasnlúcida	Blanca	suave	(-) Bacilos delgados
C 5	circular	liso	plana	opaca	Rosada	suave	levadura
C 7	irregular	irregular	plana	opaca	Blanca	suave	(+) bacilos con espora
C 8	puntiforme	liso	convexa	opaca	Rosada	suave	(-) bacilos cortos

7.4 Selección de bacterias degradadoras.

Una vez seleccionadas las cepas que crecieron en el crudo y verificado que correspondía a la cepa originalmente sembrada a través de su morfología según la tinción gram, se les realizó el test de identificación bioquímica preliminar (API 20 NE).

Las cepas que no presentaron crecimiento fueron la cepa 1 y 5, el resto dieron como resultados desde 1 a 4 cepas distintas, sumando un total de veintinueve cepas, de las cuales sólo catorce coincidieron con la morfología a través de tinción gram, a las cuales se le realizó el test de identificación rápida API 20 NE (Tabla Nº 8). De esas catorce a las que se le realizó el test sólo cinco coincidieron con la cepa original aislada del agua, que fue la cepa LT3, LT7, LT8, LT11 y LT12. Es decir que el 35.7% de las bacterias heterótrofas aisladas poseen capacidades degradativas de petróleo crudo.

En la Tabla Nº 8 se muestra cada cepa original sembrada y las que crecieron con el crudo especificando la morfología según tinción Gram e identificación bioquímica según test API 20 NE.

Tabla Nº 8: Caracterización de cepas que crecieron en M.M M9 con el crudo como fuente de carbono.

Cepa original	Cepa	Gram	API 20 NE
LT1			
LT2	A	Levadura	////
	B	(+) Cocobacilos	////
	C	(-) bacilos	*Stenotrophomonas maltophilia 96.6 %*
LT3	A	(-) bacilos delgados	*Pseudomona fluorescens 99.1%*
LT4	A	(-) bacilos	*Sphingomonas paucimobilis 92.3%*
	B	(-) bacilos largos	*Ralstonia picketti 86.9%*
	C	(-) bacilos	*Pseudomona fluorescens 99.8%*
LT5			
LT6	A	(+) bacilos con espora	////
	B	(+) bacilos largos	////
LT7	A	(-) bacilos delgados pequeños	*Pseudomona fluorescens 99.5%*
	B	(-) bacilos pequeños	*Pseudomonas luteola 84.7%*
LT8	A	(-) bacilos delgados	*Stenotrophomonas maltophilia 97.1%*
	B	Levadura	////
	C	(+) Bacilos largos	////
LT9	A	(-) bacilos	
	B	(-) bacilos	
	C	(-) bacilos	
	D	(-) bacilos	
LT10	A	(-) bacilos cortos	*Aeromonas salmonicida ssp salmonicida 98.3 %*
	B	(+) bacilos con espora	////
LT11	A	(+) bacilos largos	////
	B	(+) bacilos con espora	////
	C	(-) bacilos	
	D	(-) bacilos	*Pseudomonas fluorescens 99.9%*
LT12	A	(-) bacilos	*Pseudomonas fluorescens 99.8%*
	B	(-) bacilos cortos	
LT13	A	(-) bacilos largos delgados	*Aeromonas hydrophila/caviae 70.0%*
LT14	A	(-) bacilos largos	*Aeromonas hydrophila/caviae 71.1%*
	B	Levadura	////

A las cinco cepas degradadoras encontradas, se le realizó un test de identificación taxonómica más preciso, para tener una mejor certeza de la cepa con la que se esta trabajando, el test GN2 de Biolog. Con este test fueron identificadas sólo cuatro de las cinco cepas, ya que la cepa LT3A no fue identificada con este test. (Tabla Nº 9)

Tabla Nº 9: Test Biolog GN2 y API 20 NE

Cepa	**Biolog GN2**	**API 20 NE**
LT3A	No identificada	*Pseudomona fluorescens 99.1%*
LT7A	*Pseudomonas boreopolis*	*Pseudomonas fluorescens 99.5%*
LT8A	*Pseudomonas boreopolis*	*Stenotrophomonas maltophilia 97.1%*
LT11D	*Pseudomonas fluorescens*	*Pseudomonas fluorescens 99.9%*
LT12A	*Pseudomonas marginalis*	*Pseudomonas fluorescens 99.8%*

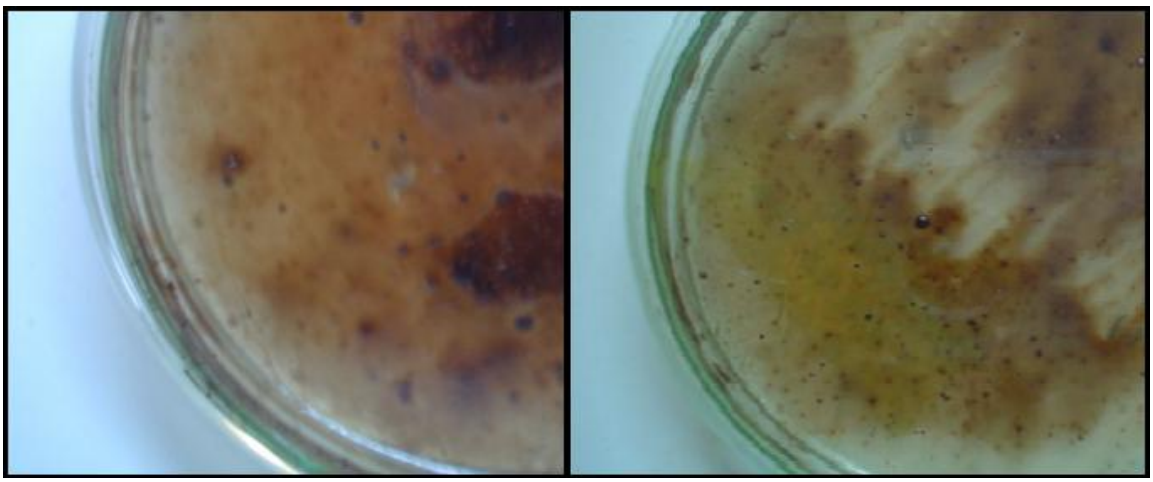

Figura 11: Siembra de las cepas aisladas del agua en Medio Mínimo M9, con crudo como fuente de carbono.

En la Figura 11 se observa el crecimiento de más de una colonia diferente en la placa, por esta razón se aislaron todas colonias que se distinguían y luego a través de pruebas bioquímicas se seleccionaron las cepas del agua que eran degradadoras.

7.5 Ensayo de biodegradación del crudo.

Luego de 21 días de degradación los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla Nº 10: Ensayo de biodegradación				
Días	**LT7A [mg/l]**	**LT8A [mg/l]**	**LT11D [mg/l]**	**LT12A [mg/l]**
0	33.12	17.446	13.17	27.091
7	3.09	2.216	20.67	9.791
11	25.42	1.236	6.91	0.991
15	17.32	0.614	0.65	15.391
21	20.02	13.546	17.17	29.791

Las concentraciones representadas en la Tabla Nº 10 se obtuvieron restándole el valor del blanco perteneciente a cada cepa que el instrumento arrojó. Estos fueron:

Cepa	**LT7A**	**LT8A**	**LT11D**	**LT12A**
BLANCO [mg/l]	0.48	0.254	1.73	0.509

En la Figura 12 se representa el comportamiento de la cepa LT7A, donde se observa que desde el día 0 al 7 hubo una disminución de 30.03 [mg/l], lo que corresponde al 90.67% de la concentración inicial. Del día 7 al 11 existe un aumento de la concentración de hidrocarburo, y luego al día 21 una disminución nuevamente, llegando a una concentración al final del ensayo de 20.02 [mg/]. Se observa un comportamiento periódico sinusoidal con amplitud variable.

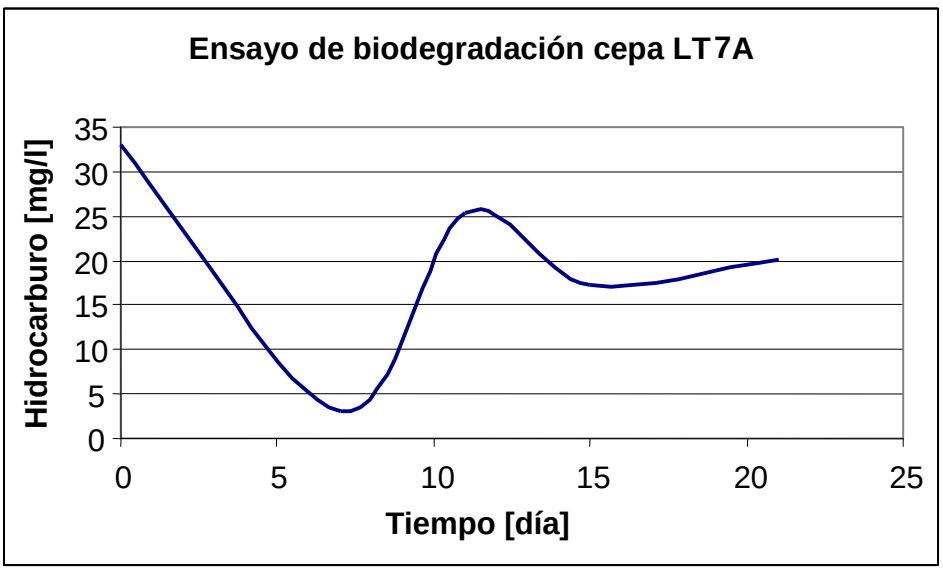

Figura 12. Ensayo de biodegradación cepa LT7A.

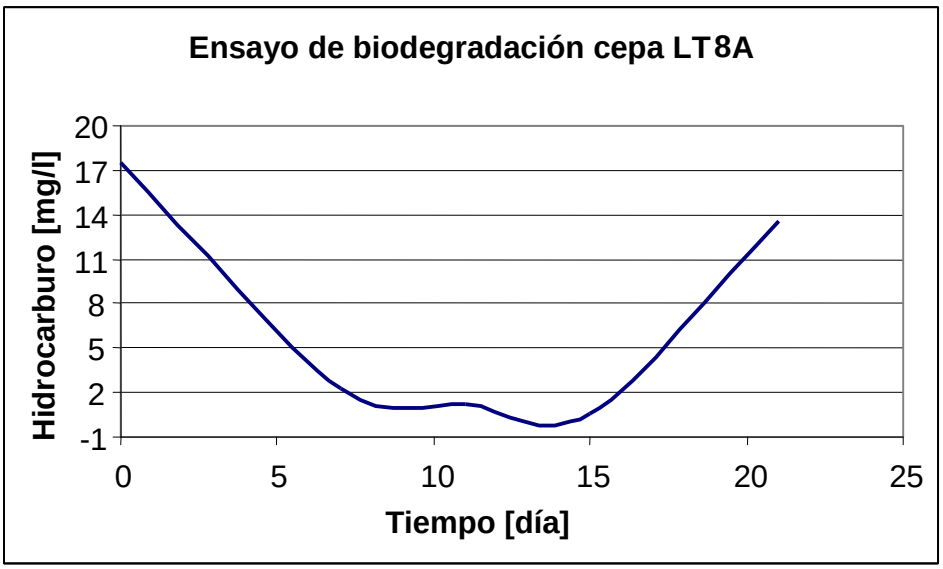

Figura13: Ensayo de biodegradación cepa LT8A.

La cepa LT8A, representada en la Figura 13, presenta una disminución continua del crudo hasta el día 15 de degradación, llegando a una concentración de 0.614 [mg/l], que corresponde una disminución del 96.48% de la concentración inicial. Se nota una mayor velocidad los primeros 7 días, siendo un 87.29% degradado de la concentración inicial. Desde el día 15 al fin del ensayo, día 21, se observa un aumento significativo llegando a una concentración de 13.546 [mg/l] al final del ensayo.

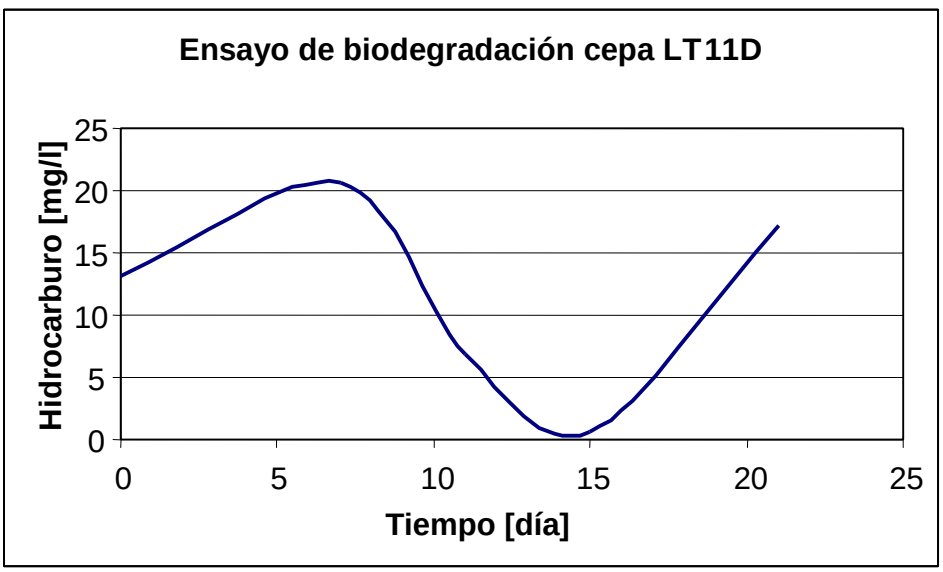

Figura14. Ensayo de biodegradación cepa LT11D

El comportamiento de la cepa LT11D expresado en la Figura 14, es de oscilaciones periódicas sinusoidales con una amplitud similar. Los primeros siete días se observa un aumento de concentración que llega a 20.67 [mg/l]. Las dos mediciones siguientes, realizadas el día 11 y 15 de degradación existe una disminución de casi el total del hidrocarburo llegando a una concentración de 0.65 [mg/l], que corresponde al 95.06% de la concentración inicial medida el día 0. Luego aumenta nuevamente a una concentración de 17.17 [mg/l] al momento de finalizar el ensayo.

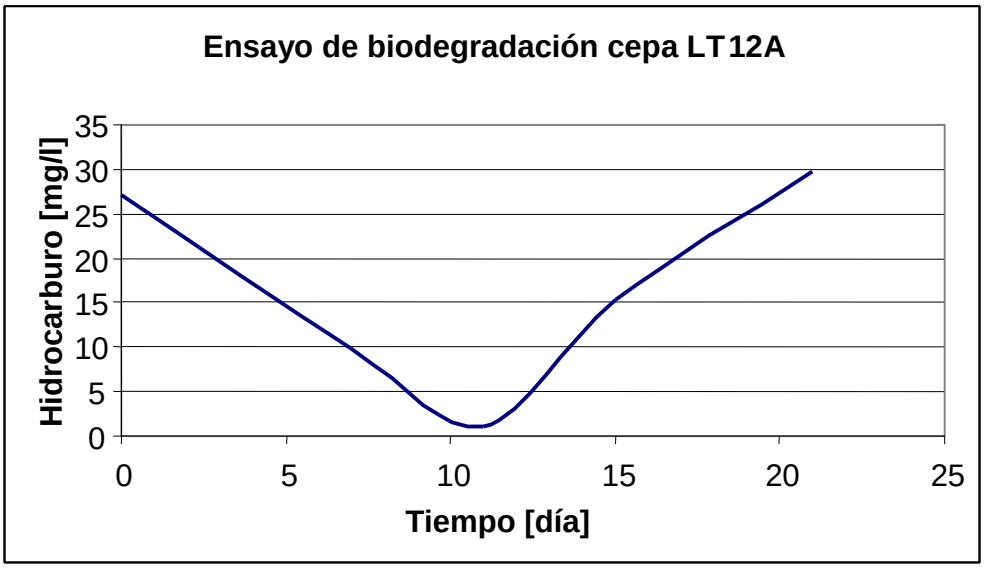

Figura 15. Ensayo de biodegradación cepa LT12A.

En la Figura 15 se observa la disminución de la concentración los primeros 11 días, alcanzando un valor de 6.91 [mg/l], que corresponda a un 74.49% de la concentración inicial. Desde el día 11 al 21 del ensayo se observa un aumento con una velocidad casi constante, llegando a una concentración de 29.791 [mg/l], que incluso es mayor que la registrada al momento de comenzar con la prueba.

Como se puede observar desde la figura 12 hasta la 15, todas las cepas que fueron probadas para la biodegradación, presentan un comportamiento con tendencia a la oscilación.

Se sabe que muchas especies de distintos géneros bacterianos sintetizan Polihidroxialcanoatos, termoplásticos que funcionan como reserva de carbono y de energía de los microorganismos. El tipo de microorganismos que los acumulan pertenecen a dos grupos: aquellos que los acumulan por limitación de un nutriente en presencia de una fuente de carbono en exceso, y aquellos que los acumulan durante su crecimiento (Rittmann y McCarty 2001). Se piensa que las cepas en estudio poseen la capacidad de sintetizar estos gránulos y acumularlos hasta que la fuente de carbono que fue inoculado disminuye y esta reserva es utilizada. El instrumento utilizado no discrimina entre los gránulos de Polihidroxialcanoatos y el crudo de petróleo. Esta es una de las razones por la que el hidrocarburo, en todas las cepas con las que se realizó el ensayo, luego de haber disminuido su concentración aumenta.

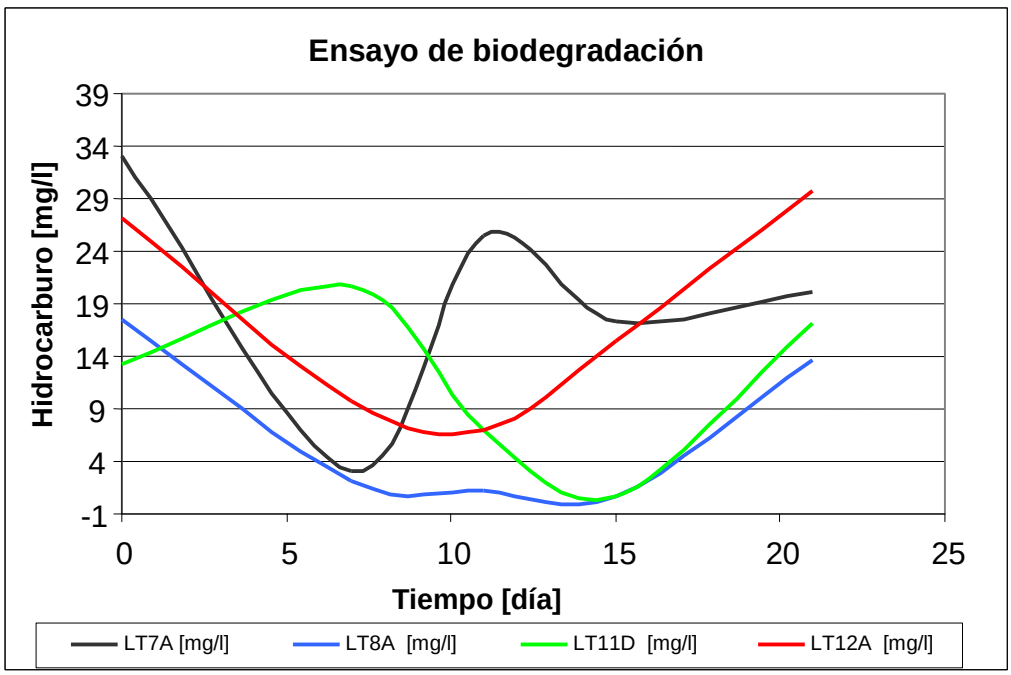

Figura 16. Ensayo de biodegradación.

Al observar la Figura 16, haciendo una comparación entre las cepas se destaca que la prueba que se inicia con una mayor concentración de hidrocarburo de petróleo, la cepa LT7A, es la que presenta una velocidad superior de degradación los primeros 7 días, disminuyendo en un 90.67% la concentración inicial.

La cepa LT8A y LT12A los primeros 7 días presentan un comportamiento similar, con una velocidad de degradación evidentemente menor a la presentada por la cepa LT7A, disminuyendo en 87.29% para la cepa LT8A y un 63.85% la cepa LT12A.

Se realizó un ensayo preliminar con una metodología similar, pero utilizando como instrumento de medición un Espectrofotómetro, midiendo a una longitud de onda de 256 nm y 228 nm, los resultados obtenidos, que no están incluidos en este documento, arrojaron un comportamiento similar en todas las cepas bacterianas probadas, lo que confirma los resultados obtenidos y expresados anteriormente.

7.6 Crecimiento Bacteriano.

Luego de 21 días de mediciones en el Espectrofotómetro los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Tabla Nº 11: Medición del Crecimiento Bacteriano por Espectrofotometría

Días	LT7A [600nm]	LT8A [600 nm]	LT11D [600 nm]	LT12A[600 nm]
0	0	0	0	0
2	0,001	0	0	0
5	0,003	0	0,003	0
7	0,005	0,004	0,005	0,005
8	0,007	0,005	0,006	0,007
11	0,009	0,006	0,009	0,009
15	0,01	0,007	0,011	0,012
16	0,012	0,009	0,015	0,013
18	0,014	0,009	0,017	0,013
21	0,015	0,009	0,021	0,017

En la Tabla Nº 11 se observa el crecimiento bacteriano medido hasta el día 21, en todas las cepas se evidencia un crecimiento paulatino con tendencia a estabilizarle en las ultimas mediciones realizadas. Estos datos están de acuerdo a la cinética normal de crecimiento, en la que primero viene una fase de adaptación de los microorganismos al medio, luego una fase exponencial, después una fase estacionaria, que fue hasta donde se realizó la prueba.

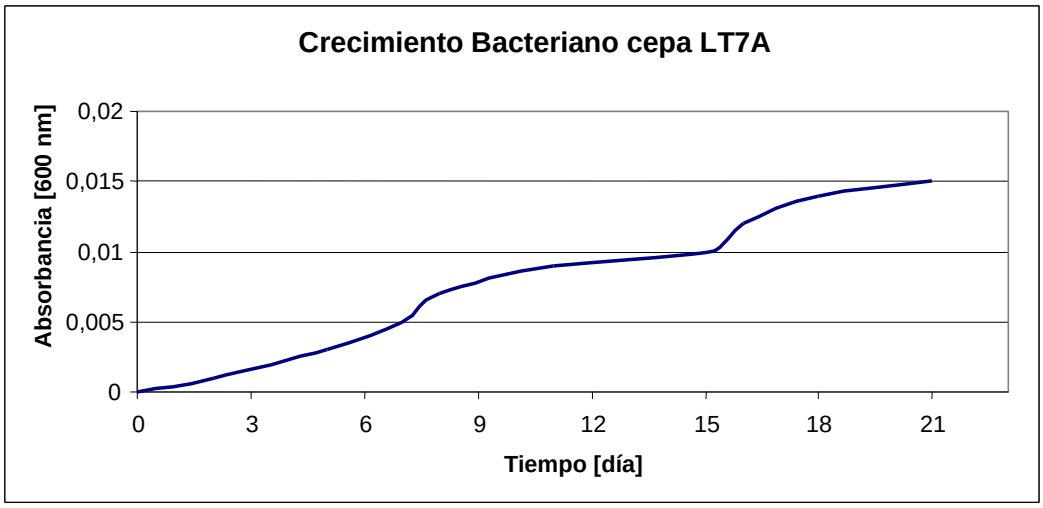

Figura 17: Curva de Crecimiento Bacteriano cepa LT7A

En la Figura 17 se observa que la fase inicial del crecimiento es poco pronunciada, esto se puede deber a que la cepa tiene una adaptación al medio bastante rápida y comienza su metabolismo para desarrollarse activamente. Al día 15 de realizada la prueba hay una tendencia a estabilizarse, esto coincide con el aumento de la concentración del hidrocarburo, que como se explicó anteriormente, es producto del uso de los gránulos de reserva de energía.

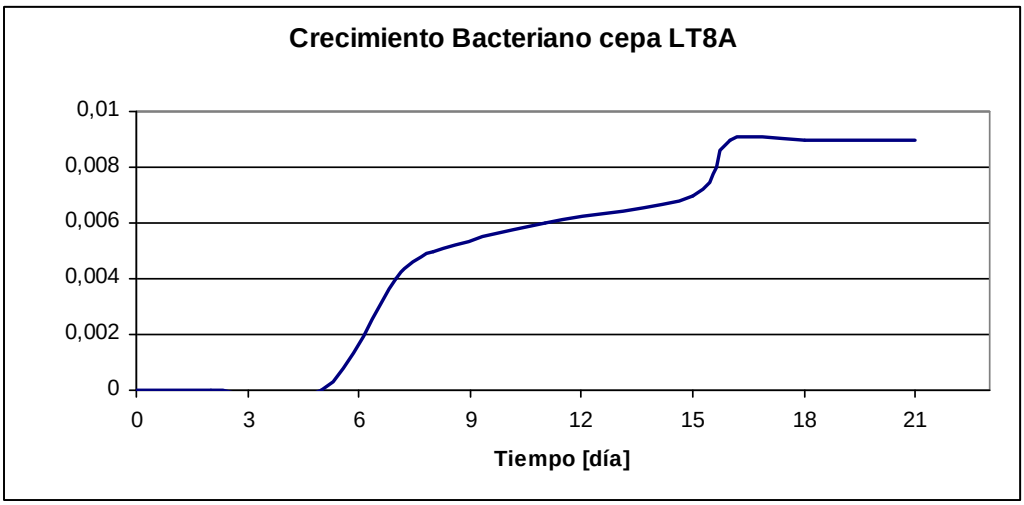

Figura 18: Curva de Crecimiento Bacteriano cepa LT8A

La cepa LT8A, representada en la Figura 18, muestra una fase logarítmica de adaptación más prolongada que la cepa LT7A, recién después del 5to día la

bacteria comienza su metabolismo y se desarrolla, estando al día 18 en la fase estacionaria de su crecimiento.

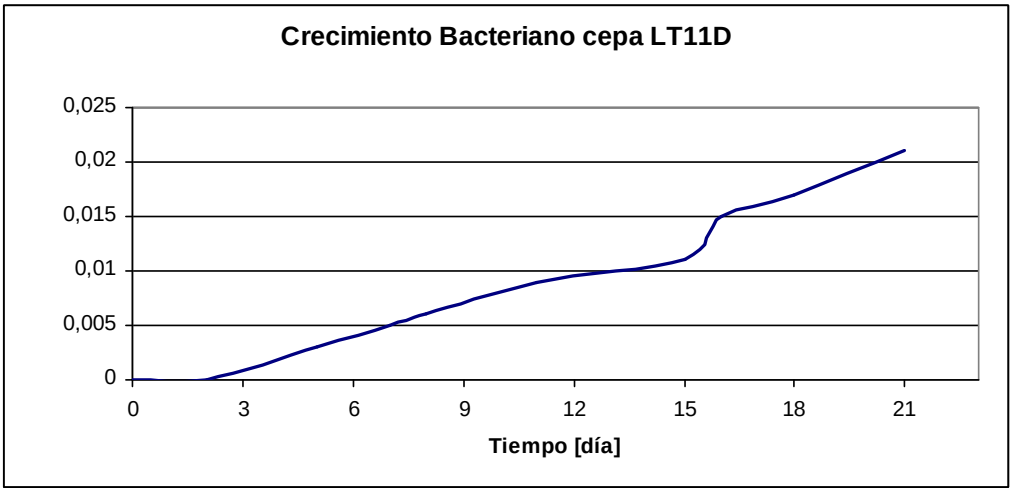

Figura 19: Crecimiento Bacteriano cepa LT11D

La cinética de crecimiento presentada por la cepa LT11D, Figura 19, entre los días 10 y 15 se observa una tendencia a estabilizar, que se puede deber a la presencia de gránulos de Polihidroxialcanoatos que sirven para que el desarrollo de las bacterias siga su curso. Hasta el día 21 del ensayo no se observa la fase estacionaria.

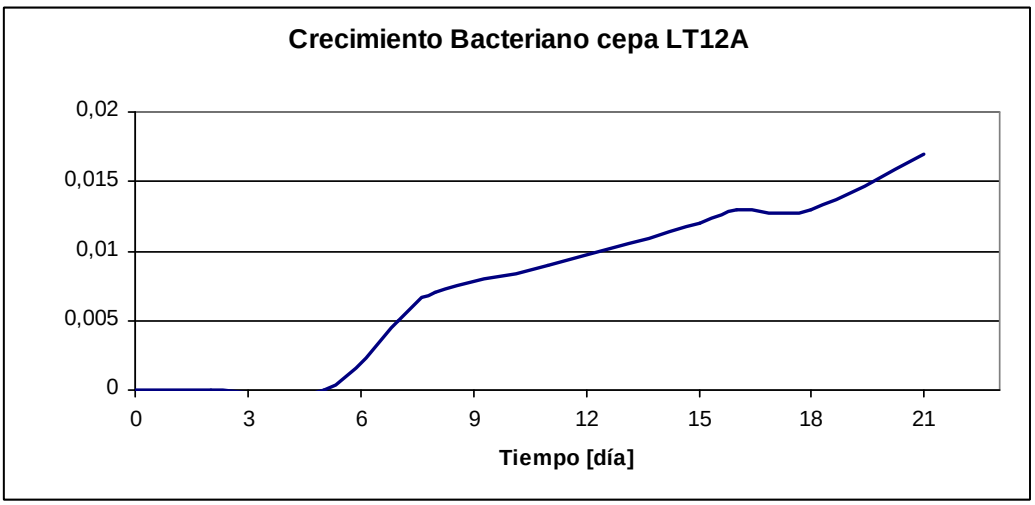

Figura 20: Crecimiento Bacteriano cepa LT12A

En la Figura 17 se observa el crecimiento de la cepa LT12A, la que presenta una fase inicial de adaptación y exponencial de desarrollo muy marcada hasta el día 17, donde se asume que hay más fuente de carbono disponible gracias a los gránulos de Polihidroxialcanoatos y sigue el crecimiento bacteriano. Al igual que la cepa LT11D, hasta el día 21 del ensayo no se presenta de forma clara la fase estacionaria.

8 CONCLUSION.

Con respecto a la caracterización física y química del agua, se logró identificar los parámetros que están fuera de la norma impuesta por del Decreto Supremo Nº 90, y a pesar que el límite para hidrocarburo no se ve sobrepasado para esta fosa en particular, no quiere decir que las otras fosas están bajo la normativa también, por lo que es necesario tener un plan de recuperación para esta agua, eliminando el hidrocarburo.

La cantidad de bacterias heterótrofas encontradas en el agua está dentro del rango esperado, según la bibliografía encontrada. Del total de estas cepas, un 35.7% fue capaz de crecer en un medio con hidrocarburo de petróleo como única fuente de carbono, confirmando la hipótesis planteada.

Se logró aislar 14 cepas distintas heterótrofas del agua, las que fueron caracterizadas bioquímica y morfológicamente realizando test de identificación rápida como el API 20 NE.

A partir de la identificación preliminar se pudo seleccionar las cepas apropiadas para el ensayo de biodegradación de hidrocarburo, por los antecedentes que se conocían, y el metabolismo que presentaron en las pruebas realizadas.

Los resultados obtenidos demuestran una actividad degradativa de las cepas bacterianas aisladas del agua, sobre la mezcla de hidrocarburo utilizado, disminuyendo la concentración total inicial de los hidrocarburos inoculados.

Las curvas obtenidas en el ensayo de biodegradación, demuestran una degradación del crudo de petróleo utilizado como fuente de carbono. Y se evidencia también el desarrollo de gránulos de Polihidroxialcanoatos, que es utilizado una vez que se consume la fuente de carbono disponible en el medio. Este comportamiento es similar en todas las cepas.

Finalmente con los resultados obtenidos se demuestra el cumplimiento satisfactorio de los objetivos planteados, se encontraron cepas bacterianas del agua que fueron capaces de crecer en un medio con crudo de petróleo.

Los resultados obtenidos abren una gama de posibles investigaciones en este ámbito, las que arrojarían resultados que complementarían este trabajo y serían un gran aporte a la Ciencia, ya que son los primeros estudios realizados en esta zona.

9 SUGERENCIAS.

Para futuras investigaciones de este tipo, se sugiere realizar una caracterización del hidrocarburo con el que se está trabajando, ya que permitiría conocer cuales son los componentes que posee y cuales de ellos es el más dañino para el medio ambiente y poner énfasis en la biodegradación de ese componentes.

En el ensayo de biodegradación sería óptimo realizarlo con una metodología que permita ir observando la disminución del hidrocarburo por compuesto, para desarrollar cepas bacterias específicas para distintos tipos de hidrocarburos.

Se propone realizar un análisis filogenético a todas las cepas aisladas, para conocer con certeza el microorganismo con el que se está trabajando y aportar a investigaciones parecidas con datos nuevos de un lugar que no ha sido explorado en este aspecto antes.

Se sugiere, también realizar un ensayo con un solo compuesto del hidrocarburo, probando como se comporta una cepa a las diferentes concentraciones, obteniendo como resultado cual es la concentración óptima para el desarrollo de la cepa.

Una investigación futura podría considerar la realización de ensayos de degradación con consorcios de bacterias, y observar el comportamiento de degradación.

Como el agua de estudio esta asociada a suelo empetrolado también, se propone ampliar la investigación a ese elemento y comparar la eficiencia de las cepas encontradas en ambos sitios.

10 BIBLIOGRAFÍA.

1. Atlas, R. & Bartha, R. 2001. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Cuarta edición. Madrid, España. Addison Wesley. Páginas: 696.
2. Bracho M., Diaz L., Soto L., 2004. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policiclicos y heterocíclicos por Pseudomonas spp. Laboratorio de Microbiología Acuática, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
3. Byodyne. Bioremediación. http://www.biodyne-srq.com/infbkbio_esp.html. (visita: Abril de 2006
4. Cardona, Santiago. 2002: Degradación de Diesel Mexicano por Bacterias de un Suelo Agrícola y Oxidación con Peróxido de Hidrogeno. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Cancún, México. AIDIS. 8 páginas.
5. Casellas,M.,P.Fernández, J. M. Bayona y A. M. Solanas. 1995. Bioassay-directed chemical analysisof genotoxic components in urban airbone particulate matter from Barcelona (Spain). Chemosphere 30:725-740.
6. Chile. Ministerio Secretaría General de la Presidencia de la República. 2001. Establece Norma de Emisión para la Regulación de Contaminantes Asociados a las Descargas de Residuos Líquidos a Aguas Marinas y Continentales Superficiales. Diario Oficial. Septiembre 2001.
7. Clark y Brown. Petroleum: properties and analyses in bioticandabiotic systems. En: D. C. Malins (Ed.), Effects of Petroleum on arctic and subarctic environments and organisms. Academic Press Inc. London. pp. 1-75. Howe-Grant, M. 1996. Petroleum.Encyclopedia of chemical technology 4th ed. WileyInerscience Publication. New York. 1977 pp. 342-480.)
8. Didyk, B. & Costa, M. 1977: Biodegradación de Derrames de Petróleo. XXIX REUNIÖN ANUAL de Expertos de ARPEL (Asistencia Reciproca Petrolera Estatal Latinoamericana). Montevideo, Uruguay. ECOPETROL. 7 Páginas.
9. Echarri, L. 1998. Ciencias de la Tierra y del Medio Ambiente. http://www1.ceit.es/Asignaturas/ecologia/Hipertexto/00General/Principal.html. (visita: abril 2006)
10. Fernández, P., M. Grifoll, A. M. Solanas, J.M.BayonayJ.Albaigés. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal

sediments. Environ. Sci. Technol. 26:817-829.

11. Howe-Grant, M., Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology 4th ed.* Wiley Inerscience Publication. New York. 1996.pp. 342-480.
12. Instituto Mexicano del Petróleo, IMP. (2006). www.IMP.mx
13. Lopolito María et al. 2003. Biodegradación de Hidrocarburos de Petróleo y Compuestos Relacionados. http://www.ingenieroambiental.com/?pagina=719 (visita: abril de 2006).
14. Madigan, M., Martinko, J., Parker. 2004. Brock Biología de los microorganismos. Octava edición. Madrid, España. Prentice Hall Iberia. 1064 Páginas.
15. Metcalf & Eddy. 1995. Ingenieria de Aguas Residuales. Tercera Edición. Madrid, España. Mc Graw Hill. Volumen 1.
16. Monticello D.J. The molecular biology of dibenzothiophene desulfurization. *The Seven International IGT Symposium of Gas, Oil and Environmental Microbiology*. pp.1-15, 1994.
17. Parales R., Yu C., Parales J., Gibson D.T. Expanding the limits of naphthalene Dioxigenase as a biocatalyst. *ASM Conference of Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3).* Puerto Rico, pp. 6, 2001.
18. Pineda G., Boll G., Mesta A., 2002. Biodegradación de asfaltenos por un consorcio microbiano aislado de petróleo crudo “Maya”. Laboratorio de Ecología Microbiana y Microbiología General. México D.F, México.
19. Rittmann Bruce E., McCarty Perry L.; 2001. Environmental Biotechnology: Principles and Applications McGraw-Hill Series in Water Resources and Environmental Engineering.
20. Rojas J., Moreno S., Rondón M., 2005. Biodegradación de gasoil rango Diesel por un cultivo mixto de bacterias. Laboratorio de biotecnología de microorganismos. Departamento de Biología. Facultad de ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida. Venezuela.
21. Rosini, 1960 Rosini, F. D. 1960 Hydrocarbons in petroleum. Journal of Chem.Educ. 39:554-561.
22. Seeley H., Vandemark P., Lee J., 1995. Microbes in Action, Laboratory Manual of Microbiology. Cuarta edition. USA.
23. Solis, L. 2005. Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región de Chile contaminados por hidrocarburos. Licenciado en Ciencias Biológicas. Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile.

24. Speight, J. G. 1991.The chemistry and technology of petroleum. John Wiley and Sons. 1991 New York.).
25. Tissot B., Welte D.H. 1984 *Petroleum formation and ocurrence*, Springer-Verlang, New York (USA), pp. 699.
26. Torres Dulio. 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente: Ecosistemas. Año XII, Nº 2.
27. Vargas, P., Cuellar, R., Dussán, J. 2004. Bioremediación de residuos del petróleo. Hipótesis, Apuntes Científicos Uniandinos, Nº 4
28. Vásquez, M, & Reyes, W. 2002. degradación de Aroclor 1242 por Psudomonas sp. Biblioteca Nacional del Perú. Perú.