

## **BIORREMEDIACION DE HIDROCARBUROS DE LOS SEDIMENTOS DE LA BAHIA DE LA HABANA**

R. Núñez<sup>1</sup>; E Ortiz<sup>1</sup>; E. L Fonseca<sup>1</sup>; O. Barban<sup>1</sup>; V. Almazán<sup>1</sup>; R. Pizarro<sup>1</sup>; Okuda, I<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Microbiología Aplicada. Centro de Bioproductos Marinos.

Loma y 37, Reparto Alturas del Vedado, Ciudad de la Habana, Cuba

Teléfonos: 881-1298.

E-mail: [cebimar@infomed.sld.cu](mailto:cebimar@infomed.sld.cu); [cebimar@ama.cu](mailto:cebimar@ama.cu)

<sup>2</sup> Especialista de JICA, Japón. Published: Revista Contribución a la Educación y la Protección Ambiental 12 (6): 45-60 2005

### **RESUMEN**

*La Bahía de La Habana es uno de los ecosistemas más contaminados en nuestro país, determinado por altas concentraciones de hidrocarburos tanto en aguas como en los sedimentos. La biodegradación constituye una vía factible en la eliminación de los hidrocarburos de las zonas contaminadas. En el Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR) se han desarrollado varios productos a base de bacterias degradadoras de hidrocarburos que permiten la disminución de estos contaminantes en ambientes marinos. En particular el producto denominado BIOIL-FC ha sido utilizado satisfactoriamente en la mitigación de derrames ocurridos en diferentes ecosistemas marinos. En el presente trabajo se realizó un diseño de tres bloques para analizar la factibilidad del uso de técnicas de biorremediación de los sedimentos de una zona de la bahía por bioaumentación con el producto BIOIL-FC y microorganismos aislados de los sedimentos de la bahía; así como la bioestimulación con nitrógeno y fósforo inorgánico. La experiencia se realizó en recipientes de vidrio de 1 litro de capacidad y aereados con un flujo de aire de aproximadamente 300 mLmin<sup>-1</sup>, la relación de sedimento-agua de mar fue 1/5. Se demostró que con las técnicas de bioaumentación se logra un mayor porcentaje de remoción en 28 días y que se alcanzan valores del 75% con el BIOIL-FC, mientras que con la bioestimulación solo se logró un 22% de remoción de los hidrocarburos presente en los sedimentos. Estos resultados demuestran la factibilidad del uso del producto BIOIL-FC para el saneamiento de ambientes impactados con petróleo como la Bahía de La Habana.*

**Palabras claves:** Biorremediación, bioaumentación, bioestimulación.

*The Bay of Havana is one of more polluted ecosystems in our country, because the hydrocarbons concentration in the water and sediment is very high. The bioremediation is a good technique for the elimination of the contaminant. In the Center of Marine Bioproduct we have developed some different bioproduct based on hydrocarbons degrading marine bacteria for the elimination the hydrocarbons in sea water. The bioproduct called BIOIL-FC has been used with excellent results in the mitigation of different oil spill in cuban ecosystems. In this work were compared the effectiveness of biodegradation between bioaugmentation with BIOIL-FC and isolated microorganisms from sediment of the bay and the biostimulation with inorganic nitrogen and phosphorus. In this experience were used glasses with 1L of capacity, the air flow was 300 mLmin<sup>-1</sup>. In this work was used a ratio sediment-seawater 1/5. The results demonstrated the effectiveness of bioaugmentation under biostimulation, went BIOIL-FC was used the remotion values was 75% in only 28 days in comparation with the 22% of the biostimultion process. In this work was demonstrated the satisfactory utilization of BIOIL-FC for the mitigation of the pollution with crude oil in different environment like the Bay of Havana.*

**Key words:** Bioremediation, bioaugmentation, biostimulation.

## **INTRODUCCIÓN**

La Bahía de la Habana durante más de 100 años ha estado expuesta a todo tipo de contaminación y en especial con hidrocarburos, provenientes de diferentes fuentes, principalmente de la refinería Níco López.

La acción del hombre sobre el medio ambiente ha conllevado a numerosos investigadores a nivel mundial a la búsqueda de soluciones que disminuyan los efectos nocivos de la contaminación para las generaciones futuras y la conservación de las especies.

Las investigaciones relacionadas con la biorremediación surgen como una alternativa eficiente para la recuperación de los ecosistemas. Esta técnica aprovecha la capacidad que tienen los microorganismos de crecer a partir de sustancias nocivas al medio ambiente, de manera que la degradan hasta dióxido de

carbono y agua (Shmaefsky, 1999, Advanced BioTech, 2000, Mack Kay, 2001), además, permite tratar grandes volúmenes de contaminantes con un impacto ambiental mínimo, a diferencia de otros procedimientos de descontaminación (Molnaa y Grubbs, 2001).

Los procesos de biorremediación se clasifican en técnicas de bioestimulación y bioaumentación. La bioestimulación consiste en la adición de nutrientes, sustratos o tensioactivos que estimulen el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos degradadores presentes en la zona impactada (Gruiz y Kriston, 1995; Baheri y Meysami, 2002; Núñez, 2003). La bioaumentación comprende el uso de enzimas o cultivos de microorganismos con alta capacidad de oxidación con el propósito de eliminar sustancias indeseables (Shmaefsky, 1999), donde se asegura que estén presentes los microorganismos específicos capaces de degradar al compuesto contaminante no deseado hasta sus moléculas básicas (Advanced BioTech, 2000).

En el Centro de Bioproductos Marinos se obtuvo un bioproducto formado por cinco bacterias hidrocarbonoclasta aisladas de la bahía de Cárdenas, el cual ha sido patentado y denominado BIOIL (Bellota et al, 1994).

Este cultivo mixto (BIOIL-FC) ha sido utilizado con resultados satisfactorios en el tratamiento de varios derrames de hidrocarburos en bahías y playas de Cuba. (Fonseca et al, 1994; Núñez et al. 2000, Núñez, 2003).

Teniendo en cuenta la necesidad de buscar soluciones que atenúen la contaminación con hidrocarburos en la Bahía de la Habana nos propusimos como objetivo comparar tres variantes de técnicas de biorremediación a nivel de laboratorio con los sedimentos de una de la zona más contaminadas de este ecosistema.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Para el tratamiento de los sedimentos de la zona del Ingenito, Bahía de La Habana fue utilizado un diseño en bloques al azar formado por tres variantes (Tabla 1). Todas las experiencias se realizaron por duplicado en recipientes de vidrio de 1 litro de capacidad y aireados directamente con una bomba

aeradora a un flujo de aire de aproximadamente  $300 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , la relación de sedimento-agua de mar fue 1/5 (Núñez et al, 2002)

Tabla 1. Variantes utilizadas durante el experimento

BLOQUE	TRATAMIENTO
1	Nitrógeno y fósforo (Bioestimulación)
2	Cultivo Bahía Habana (Bioaumentación)
3	BIOIL-FC (Bioaumentación)

En todas las variantes se añadió una concentración de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  de  $5 \text{ gL}^{-1}$ .

En la variante 2 se utilizó un cultivo mixto de 5 cepas de bacterias degradadoras de petróleo, aisladas de la zona de Atarés en la Bahía de La Habana (Ortiz et al., 2002) y en la variante 3 se utilizó el bioproducto BIOIL-FC (Núñez, 2003).

Todas las experiencias de bioaumentación fueron inoculadas al 5% v/v.

**Determinación de la concentración de hidrocarburos totales:** La determinación cuantitativa de hidrocarburos totales en las muestras de agua de mar, sedimentos marinos y suelos se realizó mediante el método gravimétrico descrito en el American Public Health Association (1995), donde fue utilizado n-hexano (grado espectroscópico) como solvente de extracción.

### **Tratamiento estadístico de los resultados**

Para el tratamiento estadístico de los resultados, una vez que fue verificado el cumplimiento de la distribución normal de los datos según Kolmogorov y Smirnov, así como la homogeneidad de varianzas por el método de Bartlett, fue realizado el análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan (Lerch, 1977) en la cual las medias que se diferencian se expresan con diferente letra.

## **RESULTADOS Y DISCUSION**

### **Degradación de hidrocarburos en los sedimentos del Ingenito para las diferentes variantes**

En la tabla 2 se muestran los resultados de concentración de hidrocarburos en el tiempo obtenidos para cada variante.

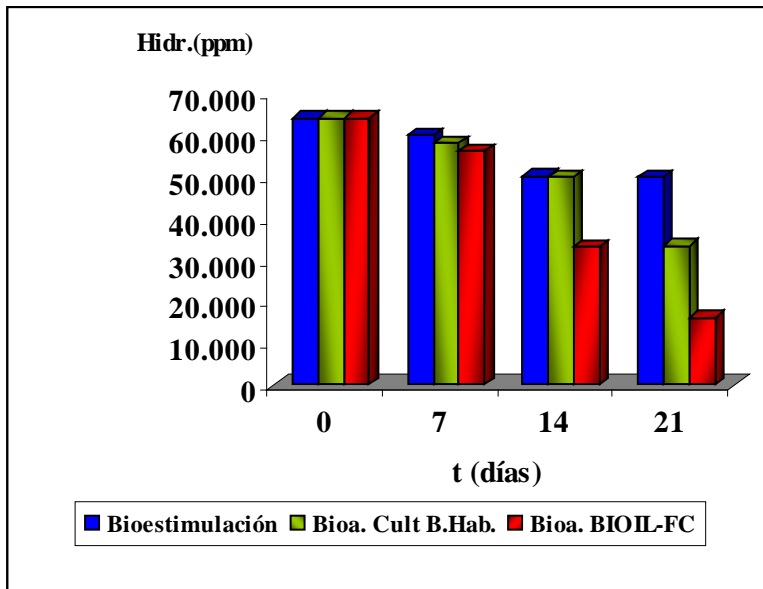


Figura 1. Evolución de los hidrocarburos en el tiempo para cada variante estudiada.

Los resultados demostraron que se produjo una reducción significativa de la concentración de hidrocarburos en el tiempo en todas las variantes evaluadas. Sin embargo, para la bioaumentación se alcanzaron valores significativamente inferiores de hidrocarburos con respecto a la bioaumentación, por lo que los porcentajes de remoción fueron superiores con respecto a lo alcanzado en la técnica de bioestimulación tradicional (Fig.2).

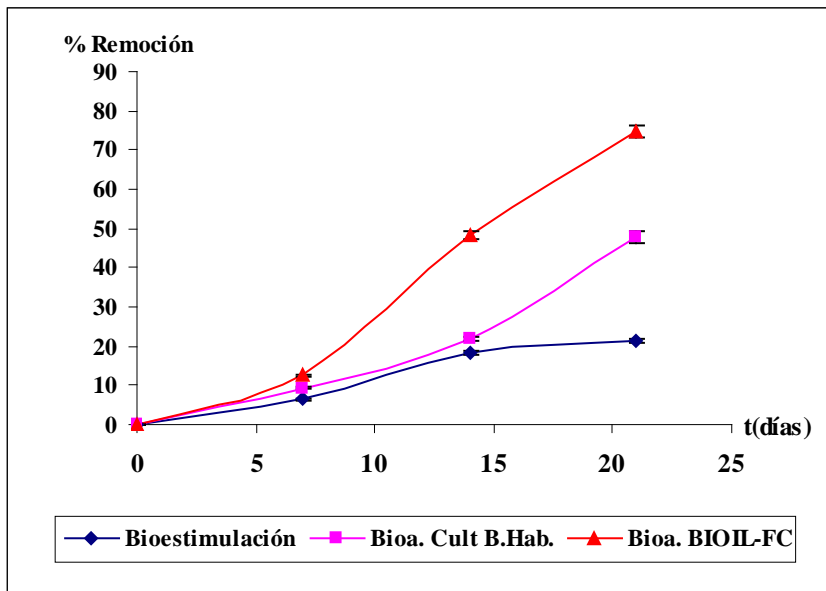


Figura 2. Porcentaje de remoción de hidrocarburos en sedimentos de la Bahía de La Habana utilizando técnicas de biorremediación por bioestimulación y bioaumentación (Duncan,  $p < 0,05$ ).

Estos resultados deben estar determinados por una mayor eficiencia en la degradación cuando se utilizan poblaciones grandes de bacterias, que garantiza la acción microbiana tanto en hidrocarburos gaseosos como líquidos y sólidos de las series alifáticas, oleofílicas y naftalénicas (Il'inskii et al, 1998). Además, en presencia de cultivos mixtos se produce la degradación simultánea de un sustrato de múltiples componentes como el petróleo, debido a ocurre una competencia por el sustrato donde los microorganismos de menor velocidad de degradación se ven obligados a oxidar los compuestos más pesados del crudo (Van der Linden, 1978; Bertrand et al., 1983 y Rambeloarisoa et al., 1984).

La inoculación de microorganismos degradadores de petróleo (bioaumentación), principalmente bacterias, ha sido estudiada como una vía para disminuir las consecuencias nocivas de un derrame. La velocidad de degradación de hidrocarburos es mayor por éste método y además se evitan los metabolitos tóxicos que se forman durante el proceso de biodegradación cuando se utilizan fertilizantes orgánicos (Lee y Tremblay, 1995).

En particular el uso de BIOIL-FC favorece la oxidación del crudo y sus derivados, ya que este bioproducto contiene en su formulación un cultivo de cinco bacterias con una alta velocidad de oxidación de las diferentes fracciones del petróleo. Además, es importante destacar que en la

formulación del bioproducto se incluye un biotensioactivo de tipo emulgente producido por una de las cepas que lo integran (*Bacillus licheniformis* CBM-60), que debe modular la hidrofobicidad de la superficie celular facilitando la adhesión y colonización de la interfase (Köhler et al, 2000).

Este bioproducto fue utilizado satisfactoriamente en un derrame de más de 500 toneladas de crudo pesado en la Bahía de Matanzas en el año 1998, donde se logró un 70 % de remoción de los hidrocarburos en sedimentos a los 30 días (Núñez, 2003).

**El experimento fue detenido al cabo de los 28 días porque en todos los casos se observó una saturación de los porcentajes de degradación.**

La biodegradación es el mecanismo más importante, efectivo y económico para la eliminación final de los hidrocarburos del petróleo presentes en el medio marino. Bajo su acción se ponen en juego múltiples reacciones de oxidación, que conducen a la formación de hidrocarburos de menor peso molecular, además de la formación de dióxido de carbono, agua y biomasa microbiana (Sirvins y Tramier, 1985).

## **CONCLUSIONES**

En el presente trabajo se demostró que la oxidación de hidrocarburos, fue superior con la técnica de bioaumentación que cuando se utilizó la bioestimulación con la cual sólo se logró un 22% de remoción de los hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de la bahía.

Entre las técnicas de bioaumentación se logró un mayor porcentaje de degradación de los hidrocarburos con el bioproducto BIOIL-FC (75%) que con el cultivo mixto aislado de la Bahía de la Habana (48%).

## **Agradecimientos**

Se agradece a la Empresa de Colaboración de Japón JICA y a la Delegación del CITMA de Ciudad de la Habana por el financiamiento y la facilidad de los muestreos de sedimento en la Bahía de la Habana.

## **BIBLIOGRAFÍA**

Advanced BioTech, (2000). "Why add microbes?" Advanced BioTech, California, USA. [http://www.adbio.com/bioreem/why\\_add\\_microbes.htm](http://www.adbio.com/bioreem/why_add_microbes.htm)

- American Public Health Association (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater, 19<sup>th</sup> ed. Washington, DC.
- Baheri, H. y Meysami, P. (2002). Feasibility of Fungi Bioaugmentation in Composting a Flare Pit Soil. **Journal of Hazardous Materials**. 89: 2-3: 279-286
- Bellota, M.; Fonseca, E.L.; Núñez, R.R.; Martínez, J.; Villaverde, M. J.; Joseph, N. y Fuentes, M. (1994). Bioproducto para combatir la contaminación por hidrocarburos de petróleo y sus derivados. Certificado #22323. C12N. 11/02 : CO2F 3/34.
- Fonseca, E. L.; Bellota, M.; Villaverde, M.; Martínez, J.; Núñez, R. R.; Riverón, L. A.; Joseph, N. y Fuentes, M. (1994). Tratamiento de un derrame de petróleo combustible en la Bahía de Cienfuegos, Cuba. Archivo Científico. OCIM. Instituto de Oceanología.
- Gruiz, K y Kriston, E. (1995). In situ bioremediation of hydrocarbon in soil. **Journal of Soil Contamination**. 4(2): 163-173.
- Il'-inskii,-V.V.; Porsheva,-O.V.; Semenenko,-M.N. (1998) Hydrocarbon-oxidizing microorganisms in coastal and open waters of the Mozhaiskoervoir: Activity and contribution to the processes of natural purification in summer. **Water-Resour; Vodnye-Resursy**. 25(3): 306-309. Y 335-338.
- Köhler, T., Kocjancic, L., Barja, F., van Delden, C. y Pechére, J.C. (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. **J. of Bacteriol**. 182, 5990-5996.
- Lee, K. y Tremblay, G. H. (1995). Biorremediation of oiled beach sediments. Assessment of inorganic and organic fertilizers, evolving technologic. Oil spill Conference, API. Washington DC, USA. 107-112.
- Lerch, G. (1977). La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas. Ed. Científico Técnica. La Habana.
- Mac Kay, N.I. (2001). Biorremediación. <http://www.ambienteNews.htm>. 1-4.
- Molnaa, B.A y Grubbs, R.B. (2001). Bioremediation of petroleum contaminated soil using microbial consortia as inoculum. <http://www.bugsatwork.com/default.htm>.
- Núñez et al. 2000,
- Núñez R. (2003). Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la bioremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis de doctorado. Universidad de La Habana. Cuba.
- Núñez, R., Oramas, J., Ortiz, E., Fonseca, E. y otros. (2003). **BIOIL-FC: Tecnología de Biorremediación de derrames de petróleo en ecosistemas marinos. Memorias del V Congreso Internacional sobre Desastres Naturales. La Habana. Cuba.**
- Núñez, R.R.; Ortiz, E; López,J.L.; Fonseca, E.L; Barban, O.; Y; Martínez C.; Pizarro, R.; Sakai, S\* (2002). Degradación de los Hidrocarburos de los sedimentos de Marimelena, Bahía de la Habana. En prensa
- Ortiz, E., M. Morales, L. Graña, D. Enríquez, R. Núñez, R. Núñez, L. Coya, S. Sánchez, S. Fundora, E. Fonseca, R. Pizarro, C. Martínez, Y. Díaz, L. González (2002). Colección de microorganismos marinos del Instituto de Oceanología. Informe Final del Proyecto de investigación. Presentado ante el Comité de Expertos del Programa “Sistemática y Colecciones Biológicas, su Conservación, Mantenimiento y Exhibición”, Agencia de Medio Ambiente.
- Rambeloarisoa et al., 1984
- Shmaefsky, B.R. (1999). Bioremediation: Panacea or fad? Access Excellence. The National Health Museum. <http://www.accessexcellence.org/LC/ST/st3bg.html>
- Sirvins y Tramier, 1985
- Van der Linden, 1978;