

# Degradación de diesel en agua de mar utilizando un consorcio bacteriano

## *Diesel degradation in seawater using a bacterial consortium*

MSc. Janet Nápoles-Álvarez<sup>I</sup>, Lic. Leonardo Bahín-Deroncelé<sup>I</sup>,  
Ph D. Mariano Gutiérrez-Rojas<sup>II</sup>, Dra. C. Dania Del Toro-Álvarez<sup>III</sup>,  
Dra. C. Arelis Abalos-Rodríguez<sup>I</sup>

janet@uo.edu.cu

<sup>I</sup>Centro de Estudios de Biotecnología Industrial. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba; <sup>II</sup>Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, México; <sup>III</sup>Facultad de Ingeniería Química y Agronomía. Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Cuba

### Resumen

La dependencia inevitable de los productos petroquímicos ha resultado en un problema ambiental serio en las últimas décadas, y ha afectado en gran medida los ecosistemas acuáticos. Los objetivos de este trabajo fueron caracterizar el agua de mar de la playa Mar Verde y realizar experimentos de degradación de diesel comercial en esta agua, empleando un consorcio bacteriano. Se determinó el oxígeno disuelto, contenidos de nitrato y fosfato, pH y salinidad, además de la población microbiana heterótrofa y degradadora de diesel. Se realizó la cinética de degradación del diesel comercial, empleando un consorcio integrado por 4 cepas bacterianas y dos medios de cultivo: agua de mar estéril y agua de mar sin esterilizar. Los resultados de la caracterización arrojaron que los parámetros estudiados fueron similares a los normados según NC 22:1999 y NC 25:1999. La población heterótrofa fue de 87 UFC mL<sup>-1</sup> con diversidad de morfología, las cuales no interfirieron en los experimentos de degradación. El consorcio bacteriano fue capaz de degradar a los 30 días el 53 % y el 62 % del diesel en el medio estéril y sin esterilizar, respectivamente. Se demostró que este consorcio puede ser empleado en procesos de biorremediación de agua de mar contaminada con diesel.

**Palabras clave:** biodegradación, diesel, consorcio bacteriano, agua de mar.

### Abstract

The inevitable dependence on petrochemicals products has resulted in a serious environmental problem in recent decades and has greatly affected aquatic ecosystems. The objectives of this research were to characterize the seawater of the Mar Verde beach and carry out commercial diesel degradation experiments in this water, using a bacterial consortium. Dissolved oxygen, nitrate and phosphate contents, pH and salinity were determined, as well as the heterotrophic and diesel degrading microbial population. The degradation kinetics of the commercial diesel was performed, using a consortium composed of 4 bacterial strains and two culture media: sterile seawater and unsterilized seawater. The characterization results showed that the parameters studied were similar to the norms according to NC 22: 1999 and NC 25: 1999. The heterotrophic population was 87 CFU mL<sup>-1</sup> with diversity of morphology, which did not interfere in the degradation experiments. The bacterial consortium was able to degrade 53 % and 62 % of the diesel in the sterile and non-sterile medium at 30 days, respectively. It was

demonstrated that this consortium could be used in diesel contaminated seawater bioremediation processes.

**Keywords:** biodegradation, diesel, bacterial consortium; seawater.

## **Introducción**

La contaminación por petróleo crudo y sus derivados en ecosistemas acuáticos constituye un grave problema en la actualidad, sobre todo cuando se asocia a derrames accidentales a gran escala. Existen muchas fuentes de generación de contaminación por estos compuestos, entre las que destacan: accidentes de buques tanques, fugas en equipos de perforación marina y operaciones de trasiego de combustibles [1,2]. Los ecosistemas marinos contaminados por compuestos derivados de la refinación del petróleo, tales como el diesel y en especial en los estuarios, requieren de 10 o más años para su recuperación [3].

Casi todo el hidrocarburo que llega a las aguas superficiales es vertido directamente en las bahías debido a que en éstas se localizan complejos industriales. La mayoría de los hidrocarburos flotan y se diseminan sobre la superficie del mar por amplias zonas por el efecto del oleaje, las corrientes marinas y el viento, en cuyos casos puede llegar hasta las zonas costeras afectando las playas cercanas al derrame [4].

El proceso más importante para eliminar los hidrocarburos no volátiles presentes en el medio acuático es la biodegradación, en la cual, mediante la acción de algunos microorganismos, se degradan los compuestos hasta la mineralización, obteniéndose oxígeno, dióxido de carbono y agua [5,6].

En este sentido, existen numerosos trabajos en los cuales se han aislado y evaluado diferentes microorganismos con capacidad degradativa, utilizándose como inoculantes para la biorremediación de ecosistemas contaminados [7,8, 9]. Además, se han diseñado sistemas ingenieriles para la biorremediación de ecosistemas contaminados por petróleo y sus derivados [10,11].

Aun así, el estudio de microorganismos con potencialidades de degradar petróleo y sus derivados ha aumentado notablemente, más si se trata de la búsqueda de cepas capaces de degradar compuestos recalcitrantes.

Al suroeste de la provincia de Santiago de Cuba se encuentra la zona industrial en la cual están enclavadas diversas industrias que utilizan petróleo y sus derivados para sus actividades, con el riesgo de contaminación tanto para suelos como para cuerpos de agua. Por la cercanía a la zona industrial se escogió el agua de la playa de Mar Verde, persiguiendo como objetivos su caracterización y la degradación de diesel empleando un consorcio bacteriano.

### *Métodos utilizados y condiciones experimentales*

#### *Origen y toma de las muestras*

La toma de muestra se realizó en la playa Mar Verde, ubicada al oeste en la provincia de Santiago de Cuba, entre las 9:00 am y 11:00 am, en los meses de febrero y abril, a una profundidad de 1 m de la superficie y a 10 m de la orilla del mar. La temperatura del agua estuvo entre los 23 - 25 °C. La conservación de las muestras dependió del análisis posterior.

#### *Determinación de parámetros en el agua de mar*

**Determinación de oxígeno disuelto, contenido de nitrato y fosfato** Para la determinación del oxígeno disuelto en el agua de mar, se siguió el método de Winkler con modificación de azida, según APHA [12]. El contenido de nitrato y fosfato se cuantificó espectrofotométricamente según APHA [12].

**Determinación de pH** El pH se determinó por potenciometría.

**Determinación de la cantidad de cloruros** La determinación se realizó según Norniella-Rodríguez y Hernández-Monzón [13] con la modificación siguiente: Se tomaron 30 mL de muestra y se llevaron a un volumétrico de 250 mL, completándose con agua destilada. Se tomaron tres alícuota de 12,5 mL y se llevaron a matraces de 50 mL. La valoración se realizó con  $\text{AgNO}_3$  ( $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ ) previamente normalizado con tiosulfato de sodio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). La cantidad de cloruros se calcula por la ecuación 1:

$$\% \text{Cl} = \frac{c(\text{AgNO}_3) \times M \left( \frac{X}{Z^*} \right) \text{Cl} \times V_C \times 20}{V_m} \times 100 \quad (1)$$

donde:

c ( $\text{AgNO}_3$ ): es la concentración de la solución de Nitrato de Plata, M (Cl): Masa Molar del Cloruro, Vc: Volumen consumido de Nitrato de Plata en la valoración y Vm: Volumen de muestra.

**Determinación de salinidad** La salinidad de la muestra se determinó a partir de la clorinidad según APHA [12].

**Determinación de población microbiana heterótrofa y degradadora de diesel** La población microbiana heterótrofa se determinó por conteo de viables en placas Petri con agar nutriente, las placas se incubaron a 30 °C y el conteo de las colonias se realizó después de 48 h. El crecimiento microbiano se expresó como Unidades Formadoras de Colonia ( $\text{UFC mL}^{-1}$ ). La población degradadora de diesel presente en el agua de mar se determinó empleando 1 % de hidrocarburo. Las muestras con diesel se incubaron por 48 h a 180 rpm y 30 °C. Posteriormente se realizó el conteo de viables bajo iguales condiciones que para la población heterótrofa. Cada experimento se realizó por triplicado.

#### *Cinéticas de degradación por el consorcio bacteriano*

Se empleó un consorcio bacteriano integrado por cuatro cepas Gram negativas (*Xanthomonas sp.*, *Acinetobacter bouvetii*; *Shewanella sp.*; *Deffluviobacter lusatiensis*) aisladas de la rizósfera de *Cyperus laxus* Lam, contaminada con petróleo en Veracruz (México), con la colaboración de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa y actualmente depositadas en la Colección de Cultivos del CEBI. Los estudios de degradación se desarrollaron en botellas con 50 mL de agua de mar. Se siguieron dos experimentos: con el agua de mar estéril, ME (1 atm durante 15 min) y agua de mar sin esterilizar, MSE. Se añadió a cada botella el 10 % de diesel comercial como fuente de hidrocarburo, el cual fue filtrado (filtro microbiológico de tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$ ) para eliminar microorganismos presentes en este compuesto. Se inoculó con las cuatro cepas en proporción 1:1:1:1 (concentración inicial de  $10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$ , las cuales crecieron en caldo nutriente (30 °C, 180 rpm, 48 h). Los cultivos fueron incubados en una zaranda y se tomaron muestra los 3, 7, 10, 14, 21 y 30 días.

Los análisis se realizaron por triplicado y botellas sin inóculo fueron empleadas como control abiótico.

### **Métodos analíticos**

**Crecimiento bacteriano** El crecimiento bacteriano fue determinado por conteo de viables en placas Petri con agar nutriente; las cajas se incubaron a 30°C y el conteo de las colonias se realizó después de 48 h. El crecimiento bacteriano se expresó como Unidades Formadoras de Colonia.

**Determinación del diesel residual como hidrocarburos totales.** Las muestras fueron lavadas dos veces con diclorometano en embudos de separación. Se dejó reposar hasta la separación visible de las fases acuosa y orgánica. Los hidrocarburos residuales del diesel se determinaron por método gravimétrico. **Capacidad de Emulsificación** El índice de emulsificación ( $E_{24}$ ) se determinó según Satpute *et al.* [24]. Para ello se vertieron en probetas 2 mL de caldo y 4 mL de diesel, posteriormente se mezcló con la ayuda de un vórtex por 2 min y se dejó reposar 24 h. El índice de emulsificación fue calculado como el cociente entre la altura de la capa emulsionada y la altura total, el mismo se expresó como porcentaje (%).

### **Análisis Estadístico**

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y fueron evaluadas por un análisis de varianza (ANOVA) con el paquete STATGRAPHICS Centurion XV, para un nivel de confianza del 95 %.

### **Resultados**

#### *Caracterización del agua de mar de la playa Mar Verde*

Las características del agua de mar de la playa Mar Verde, determinadas por sus parámetros físicos y químicos, se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1**  
**Parámetros característicos del agua de mar**

Parámetro determinado	Valor del parámetro
Oxígeno disuelto (mg L <sup>-1</sup> )	4,8±0,3
Contenido de nitrato (mg L <sup>-1</sup> )	<0,02
Contenido de fosfato (mg L <sup>-1</sup> )	0,04±0,02
pH (unidades)	7,82±0,03
Cantidad de Cloruros (g L <sup>-1</sup> )	19,88
Salinidad (g L <sup>-1</sup> )	35,67±0,5

Para conocer la diversidad de microorganismos presentes en el agua de mar de la playa de Mar Verde, se determinó la población microbiana heterótrofa, arrojando como resultado un promedio de 87 UFC mL<sup>-1</sup> con diversidad de morfología. Las características morfológicas de las colonias presentes fueron:

*Colonia 1:* colonias amarillas - anaranjadas, con bordes lisos, redondas, poco elevadas, brillantes y grandes.

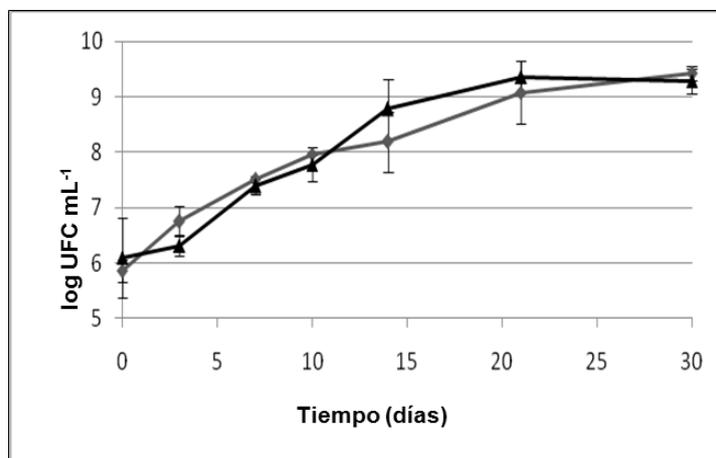
*Colonia 2:* colonias amarillas, medianas, bordes lisos, redondas y abultadas.

*Colonia 3:* colonias blanco-amarillentas, redondas, bordes lisos, medianas, cremosas y opacas.

Con el propósito de conocer, cuáles de las colonias presentes en el agua de mar poseían la capacidad de crecer, tolerar y/o degradar diesel como única fuente de carbono, se añadió este compuesto según las técnicas descritas por Núñez[15]. Se observaron 30 UFC mL<sup>-1</sup>, las cuales coincidían con las características morfológicas de las colonias 1 y 3.

*Parámetros de respuesta de la cinética de degradación por el consorcio bacteriano*

**Crecimiento del consorcio bacteriano** Se determinó el crecimiento microbiano mediante el conteo de viables para corroborar la asimilación de los hidrocarburos del diesel comercial por el consorcio. En la figura 1 se presentan los valores de Unidades Formadoras de Colonias durante la cinética.



**Fig. 1- Crecimiento del cultivo bacteriano en función del tiempo para ME (-◄-) y MSE (-▲-). Cada valor es la media de tres réplicas (barras de error).**

Para ambos medios (ME y MSE) se observa el crecimiento del consorcio hasta alcanzar valores en el orden de  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> el día 21, valor que se mantuvo constante hasta el día 30. Según apreciaciones visuales, el crecimiento de las cepas *A. bouvetii* y *Xanthomonas sp.*, predominó durante la cinética para ambos experimentos. *Defluviobacter lusatiensis* fue observada el día 21 y sólo una colonia de *Shewanella sp.*, se observó en el experimento con el medio MSE el día 30. No fueron observadas, en el experimento con medio MSE, bacterias autóctonas degradadoras de diesel con las características morfológicas correspondientes las colonias 1 y 3.

**Diesel residual** Para conocer si el diesel ha sido consumido por el consorcio bacteriano se determinó el diesel residual por gravimetría. La figura 2z muestra el comportamiento durante la cinética del consumo de diesel para los medios ME y MSE. El mayor consumo de diesel ocurrió en los primeros 10 días en ambos medios, para luego permanecer prácticamente constante, alcanzando porcentajes de degradación de más del 50 %. Se observó, precisamente entre estos días, un cambio de coloración en el diesel tratado pasando de amarillo parduzco a amarillo claro.

Al final de la cinética, para el medio ME quedó aproximadamente 2,00 g de diesel, alcanzándose el 53 % de remoción del hidrocarburo. Sin embargo, en el medio MSE quedó 1,59 g de diesel, para el 62 % de remoción.

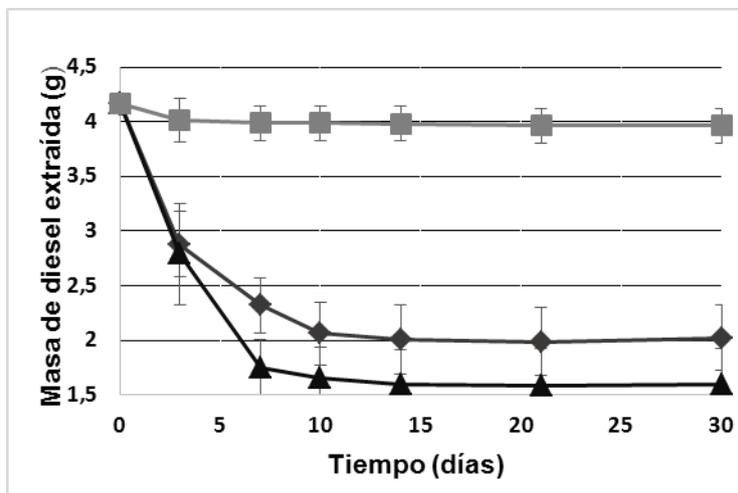


Fig. 2- Masa de diesel en función del tiempo para ME (-♦-), MSE (-▲-) y control abiótico (-■-). Cada valor es la media de tres réplicas (barras de error).

### *Capacidad de emulsificación por el surfactante*

En la figura 3 se muestra el comportamiento del índice de emulsificación correspondiente a los experimentos con los dos medios de cultivo (ME y MSE). En ambos medios existió un comportamiento similar, donde crece el índice de emulsificación para luego disminuir el día 21 y permanecer prácticamente igual hasta el final de la cinética. El mayor valor de índice de emulsificación se logró el día 14 con 68,4 % para el MSE y 65,7 % para el ME.

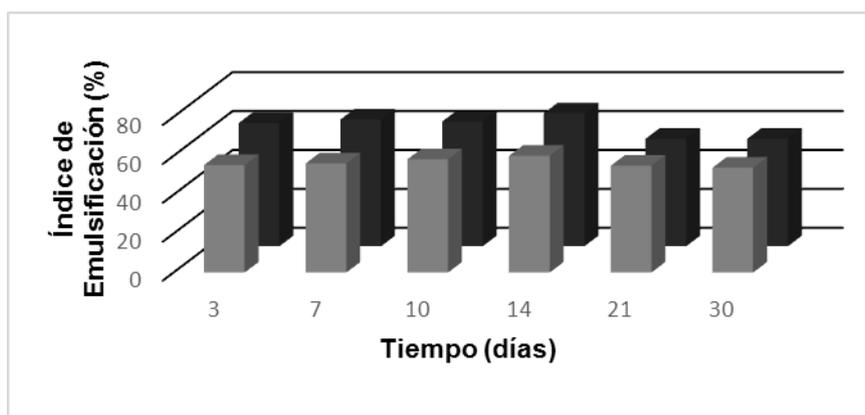


Fig. 3 Comportamiento del Índice de Emulsificación, durante 21 días de la cinética para MSE (■) y ME (■).

No se observaron diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confiabilidad de 95 % ( $p$ -valor $>0,05$ ) al evaluar cada parámetro de respuesta de la cinética para ambos medios.

## Discusión

En los procesos de degradación aerobios, el oxígeno juega un papel fundamental. Durante la degradación de los hidrocarburos, la activación de las diferentes enzimas que llevan a cabo el proceso catabólico es provocada por el oxígeno molecular [16], el cual activa las diferentes enzimas. Además, el crecimiento celular y la formación de biomasa celular en procesos de degradación de hidrocarburos, dependen en gran medida de la cantidad de oxígeno presente en el medio y que pueda ser asimilado por las bacterias [15,16].

En un rango de temperaturas de 20 a 50 °C la solubilidad del oxígeno disuelto en agua de mar varía de 4,3 a 9 mg L<sup>-1</sup> [18], y según la norma cubana NC 25:1999 [19], los valores de oxígeno disuelto en agua marina de buena calidad son mayores de 5 mg L<sup>-1</sup>, parámetro similar al mostrado en este trabajo.

El nitrógeno, es un elemento necesario para la producción de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos nucleicos y otros constituyentes celulares. Por otro lado, el fósforo interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de las células y es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos en los procesos de reproducción y degradación [16]. Los valores de nitrato y fosfato fueron similares a los establecidos en la NC 25:1999 (nitrato <0,01 mg L<sup>-1</sup> y fosfato <0,05 mg L<sup>-1</sup>) [19], demostrando que esta agua tiene buena calidad.

En ecosistemas marinos los niveles de nitrato y fosfato se encuentran limitados por la cantidad de sales que poseen los mismos, además a la baja solubilidad de gases. Las sales presentes en el agua de mar tienden a excluir las moléculas gaseosas por la reducción de espacios intermoleculares reduciendo así el área superficial, lo cual trae como consecuencia que los niveles de estos nutrientes en el agua de mar sean bajos [5]. Cantidades similares fueron descritas por Carmenate *et al.* [20] en un tramo costero cercano a un complejo industrial en la Bahía de Las Habana, cuantificando 0,012 mg L<sup>-1</sup> de nitrato y 0,06 mg L<sup>-1</sup> de fosfato.

El pH es un factor abiótico que regula procesos biológicos mediados por enzimas. En el agua de mar, debido al gran volumen que las mismas

representan, el pH no suele variar significativamente, presentando valores entre 7 y 8,5 unidades [18]. La norma cubana NC 22:1999[21], refiere que para fines recreativos los valores de pH deben estar entre 6,1 y 8,9 unidades. En cualquiera de los casos, el valor de pH mostrado en este trabajo se encuentra en el rango permisible.

Las bacterias presentan valores máximos de actividad enzimática a ciertos valores de pH que varían entre cada género bacteriano, pero se conoce que su efectividad requiere de condiciones de pH entre 6 y 8 unidades [22].

La salinidad que tiene el agua de Mar Verde ( $35,67 \pm 0,5 \text{ g L}^{-1}$ ) clasifica como aguas polihalinas (34 a  $38 \text{ g L}^{-1}$ ) y se corresponde tanto con los valores de salinidad típicos para aguas del Mar Caribe (34 a  $36 \text{ g L}^{-1}$ ) como a los establecidos por la NC 22:1999 ( $36 \text{ g L}^{-1}$ ) [21]. Cambios en la salinidad inducen cambios estructurales y fisiológicos en muchos microorganismos. Las variaciones en salinidad se pueden producir como resultado de la mezcla de masas de agua con salinidades diferentes, la formación de precipitados insolubles y la difusión de una masa de agua a otra [18].

Existen muchas investigaciones en las cuales se han aislado y encontrado diversos microorganismos degradadores de derivados del petróleo en distintos ambientes, incluidos los ecosistemas marinos. Éstos son capaces de utilizar los hidrocarburos del petróleo como única fuente de carbono y energía y, mediante procesos catabólicos, transformarlos en formas inocuas o menos tóxicas al medio ambiente [23, 24]. Aunque fueron detectadas tres morfologías diferentes de colonias de bacterias en el agua de Mar Verde, sólo las colonias 1 y 3 fueron capaces de crecer con 1 % de diesel, lo cual sugiere que éstas pueden metabolizar o tolerar concentraciones similares del hidrocarburo. Sin embargo, estas colonias no fueron observadas en medio no estéril (MSE) cuando se realizaron los experimentos de degradación del diesel comercial (10 %), evidenciándose que no interfieren con el crecimiento de las cepas del consorcio, lo cual fue corroborado estadísticamente para un 95 % de confiabilidad.

En los experimentos de degradación del diesel comercial, el crecimiento bacteriano observado en ambos medios (ME y MSE) sugirió que el consorcio

bacteriano empleado utilizó los hidrocarburos como fuente de carbono. La fase estacionaria de crecimiento observada, pudo estar condicionada por (i) la baja disponibilidad del diesel hacia las cepas del consorcio bacteriano, (ii) que se produjeran metabolitos intermediarios durante la degradación de los hidrocarburos que pudieran inhibir el crecimiento o (iii) a la baja cantidad de nutrientes esenciales presentes en el agua de mar.

Estudios previos de degradación, empleando el consorcio bacteriano, demuestran la capacidad de crecer en hexadecano ( $13 \text{ g L}^{-1}$ ), donde *Shewanella sp.* y *D. lusatiensis* utilizan los metabolitos excretados por *A. bouvetii* y *Xanthomonas sp.* [25]. Este crecimiento no fue observado para *Shewanella sp.* en agua de mar sin esterilizar, lo cual puede deberse a que se necesite más tiempo de metabolización del hidrocarburo o que se haya inhibido el crecimiento de la bacteria. Pucci *et al* [26] demuestran que el género *Shewanella* ha sido empleado en procesos de biodegradación por poseer un importante rol en el cometabolismo de compuestos halogenados y del petróleo.

La degradación del diesel ocurrió en los primeros 10 días, sin embargo, el crecimiento bacteriano permaneció constante luego de los 21 días de la cinética. El aumento de las poblaciones bacterianas luego del décimo día y la poca degradación del diesel pudiera deberse a que el consorcio estuviera consumiendo el biosurfactante excretado por *A. bouvetii* como fuente preferencial de carbono [27].

En este trabajo se obtuvo un porcentaje de degradación de 62 %. Usualmente las investigaciones relacionadas con la degradación de diesel se dirigen a suelos, existiendo poca información en agua de mar. Sin embargo, Cleber *et al* [28] reportan un porcentaje máximo de degradación del 35 % en medio salino para el diesel ( $200 \text{ mg L}^{-1}$ ) empleando cepas de *Acinetobacter baumannii* en 21 días de experimentación.

Araujo *et al.* [29] estudiaron la degradación de concentraciones de petróleo crudo entre  $7,467$  y  $8,265 \text{ g L}^{-1}$  alcanzando un 80 % de remoción empleando un cultivo mixto.

Otros estudios de degradación, reportan un porcentaje de degradación del 90 % de petróleo crudo en playas y costas cubanas empleando BIOIL-FC, producto que contiene cinco cepas bacterianas aisladas en ambientes marinos [15].

La baja solubilidad y disponibilidad de los contaminantes hidrocarbonados hacia los microorganismos puede mejorarse mediante el uso de biosurfactantes por el aumento en la biodisponibilidad del hidrocarburo para los microorganismos y por la interacción con la superficie celular que permite que los sustratos hidrofóbicos se asocien más fácilmente con las células bacterianas [30].

Es conocido que *A. bouvetii* es capaz de producir biosurfactante que no reduce significativamente la tensión superficial pero es capaz de formar emulsiones estables [25]. El biosurfactante excretado por *A. bouvetii* es un emulsificante tipo Lipo-heteropolisacárido [31].

La disminución del índice de emulsificación a los 21 días coincide con el crecimiento constante del consorcio, lo que indica es fuente preferencial de carbono y energía para mantener viabilidad. La degradación de biosurfactantes es un fenómeno frecuente durante la degradación de hidrocarburos. Las cepas del consorcio *A. bouvetii* y *D. lusatiensis* son capaces de degradarlos como fuente de carbono preferencial [25], debido a que favorece el intercambio de metabolitos entre las cepas fácilmente cuando en el medio no existen compuestos más simples para ser degradados por los microorganismos, lo cual influye en la disminución de los valores del Índice de emulsificación [14].

Cepas del género *Acinetobacter* producen emulsificantes durante la fase estacionaria de crecimiento, en particular, el emulsan de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 puede ser detectado en el cultivo después de las 10 h de crecimiento, y la máxima producción ocurre en la fase estacionaria. Por el contrario, los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* GL1, son producidos durante todo el cultivo [25].

Por otra parte, estudios con cepas del género *Bacillus* revelan que los exopolímeros producidos por éstas, presentan actividad emulsificante, variando entre 2 y 90 %. La cantidad de sales no influyen con la actividad emulsificante

de las cepas del consorcio, lo cual coincide con los resultados de este trabajo [29].

## Conclusiones

***Los parámetros químicos, físicos y microbiológicos evaluados en la playa Mar Verde se encontraron dentro de las regulaciones de las normas cubanas (NC 25:1999 y NC 22:1999). El consorcio bacteriano degradó un 62 % del diesel comercial en el medio MSE, a los 30 días del proceso, pudiendo emplearse para futuros procesos de biorremediación en los ambientes costeros de Santiago de Cuba.***

## Referencias bibliográficas

1. MISHRA, S.; SINGH, S.N. Microbial degradation of n-hexadecane in mineral salt medium as mediated by degradative enzymes. *Bioresource Technology* 2012, 111, 148-154.
2. PALANISAMY, N.; RAMYA, J.; KUMAR, S.; CHANDRAN, P.; KHAN, S. Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 2014, 12, 142, 2-8.
3. WANG, C.; XUE, C.; XUE, Y.; LI, Z.; LV, Y.; ZHANG, H. Quality changes in sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) during storage in artificial seawater saturated with oxygen, nitrogen and air. *Journal of the Science of Food and agriculture*. 2011, 92, 191 – 196.
4. CORRAL, M.; VERGARA, E.; BARRAGÁN, N.R. Estudio de dispersión de hidrocarburos en medio marino. XVI Congreso Internacional de Ingeniería de Proyectos, Valencia, España, 2012, p 838-845.
5. PANIAGUA-MICHEL, J.; ROSALES, A. Marine bioremediation – A sustainable biotechnology of petroleum hydrocarbons biodegradation in coastal and marine environments. *Bioremediation & Biodegradation*. 2015, 6, 2, doi:10.4172/2155-6199.1000273.
6. DARMAWAN, R.; NAKATA, H.; OHTA, H.; NIIDOME, T.; TAKIKAWA, K.; MORIMURA, S. Isolation and evaluation of PAH degrading bacteria. *Bioremediation & Biodegradation*. 2015, 6, 3, doi:10.4172/2155-6199.1000283.

7. TURNER, D.A.; PICHTEL, J.; RODENAS, Y.; MCKILLIP, J.; GOODPASTER, J.V. Microbial Degradation of Gasoline in Soil: Comparison by Soil Type. *Bioremediation & Biodegradation*. 2014, 5, doi:10.4172/2155-6199.1000216
8. OLAPADE, O. Phylogenetic Characterization and community diversity of hydrocarbon-utilizing bacteria in soil microcosms enriched with aromatic hydrocarbons. *Bioremediation & Biodegradation*. 2015, 6,4, doi:10.4172/21556199.1000305
9. EL MAHDI, A.; AZIZ, H.A.; ABUAM, S.S.; EL-GENDY, N.S.; NASSAR, H. Performance of Isolated *Kocuria* sp. SAR1 in Light Crude Oil Biodegradation. *Bioremediation & Biodegradation*. 2015, 6, 4, doi:10.4172/2155-6199.1000303.
10. NOZARI, M.; REZA, M.; DEGHANI, M. Investigation of the effect of co-metabolism on removal of dodecane by microbial consortium from soil in a slurry sequencing bioreactor. *Bioremediation & Biodegradation*. 2014, 5, 7, doi:10.4172/21556199.1000253.
11. PRAKASH, V.; SAXENA, S.; SHARMA, A.; SINGH, S.; SINGH, S.K. Treatment of oil sludge contamination by composting. *Bioremediation & Biodegradation*. 2015, 6, 3, doi:10.4172/2155-6199.1000284.
12. APHA. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. American Public Health Association, USA, 1998, p 10-161 ISBN: 0-87553-235-7.
13. NORNIELLA RODRÍGUEZ, G.; HERNÁNDEZ-MONZON, A. Análisis Químico Cuantitativo. Tomo 1, La Habana, Cuba, Editorial Universitaria Félix Varela. 2014. p 89. ISBN: 978-959-07-1146-6.
14. SATPUTE, K.; SUREKHA, ARUN.; BANPURKAR, G.; PRASHANT, K.; DHAKEPHALKAR, I.; BANAT, M.; CHOPADE, A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010, 1, 1-18.
15. NÚÑEZ, R. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Cuba, 2003.
16. KOSHLAF, E.; BALL, A. Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology*. 2017, 3, 1, 25-49.

17. DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*. 2011, doi: 10.406/2011/941810.
18. BAIRD, C.; CANN, M.; DOMENECH, X. Química Ambiental. 2da ed. Editorial Reverté, S.A. España, 2014, p 776, ISBN: 9788429179156.
19. NC 25:1999 Evaluación de los objetos hídricos de uso pesquero. Especificaciones. 1ra ed., Oficina Nacional de Normalización, Norma Cubana, p 9.
20. CARMENATE, M; ARRIAZA, L.; BUSUTIL, L.; DURÁN, A.; GARCÍA, C.; GARCÍA, I. Calidad del agua marina en un tramo costero con uso industrial en la provincia de la Habana. Informe Técnico, Instituto de Oceanología, La Habana, Cuba. 2009, p 12.
21. NC 22:1999 Lugares de baño en costas y masas de aguas interiores. Requisitos higiénicos sanitarios. 1ra ed., Oficina Nacional de Normalización, Norma Cubana, p 9.
22. BARRIOS SAN MARTIN, Y; SÁNCHEZ, A.; TOLEDO, A.; GONZÁLEZ, F.; GARCÍA, R.M. Estudio y Selección de Bacterias aerobias y degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de costas de Cuba. *Biología Aplicada*. 2012, 29, 73-79.
23. HEAD, I.M.; JONES, D.M.; ROLING, W.F. Marine microorganisms make a meal of oils. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006, 4, 173-182.
24. WINDERL, C; ANNESER.B; GRIEBLER .C; MECKENSTOCK ,RU; LUEDERS, T. Depth-resolved quantification of anaerobic toluene degraders and aquifer microbial community patterns in distinct redox zones of a tar oil contaminant plume. *Appl Environ Microbiol.* 2008, 74, 792-801.
25. TZINTZUN, O. Estudio de los mecanismos de remoción de hexadecano por los cultivos puros y mixtos derivados de un consorcio bacteriano. Tesis Doctoral, Facultad de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México, 2012, p 102.
26. PUCCI, N.; ACUÑA, A.; TONIN, N.; TIEDEMANN, M.C.; PUCCI O.H. Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina. *Rev. Perú. Biol.* 2011, 17, 237-244.

27. RIOJAS GONZÁLEZ, H.; TORRES-BUSTILLOS, L.; MONDACA-FERNÁNDEZ, I.; BALDERAS-CORTES, J.; GORTÁRES-MOROYOQUI, P. Efectos de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva*. 2010, 9, 3, 120 – 145.
28. CLEBER, L.; SANTOS, E.A.; SANTOS, M.O.S.; MUSSY, M.Y.; WANDERLEY, M.Y.; BASTOS, R.; BRUCHA, G.; REIS, M.; REIS, M. G. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – ro, Amazônia. *Revista Química Nova*. 2011, 5, 775-779.
29. ARAUJO, I; MAGLEID, A.G.; NANC, B.; MORILLO, A.G.; CÁRDENAS, C.; HERRERA, L. Surfactantes Biológicos en la biorremediación de Aguas contaminadas con crudo Liviano. *Interciencia*. 2008, 33, 245-250.
30. PACWA PLOCINICZAK, M.; PLAZA, G. A.; PIOTROWSKA – SEGET, Z.; CAMEOTRA, S. Environmental Applications of biosurfactants: Recent Advances. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011, 12, 633 – 654.
31. ORTEGA DE LA ROSA, ND; VÁZQUEZ-VÁZQUEZ, JL; HUERTA-OCHOA, S; GIMENO, M; GUTIÉRREZ-ROJAS, M. Stable bioemulsifiers are produced by *Acinetobacter bouvetii* UAM25 growing in different carbon sources. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2018, 41, 6, 859-869.