

Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia

Gustavo Eugenio Echeverri Jaramillo¹, Ganiveth Manjarrez Paba²,
Melody Cabrera Ospino³

1. Bacteriólogo, Máster en Tecnología Química. Universidad de San Buenaventura - Cartagena, Bolívar, Colombia, Grupo Microbiología y Ambiente, GIMA. Programa de Bacteriología.
2. Bacterióloga, Máster en Microbiología. Fundación Universitaria Tecnológico Comfenalco, Cartagena, Bolívar, Colombia. Grupo de Investigaciones Ambientales, GIA.
3. Bacterióloga, Estudiante de Maestría. Grupo GIMA.

Correspondencia: gecheverri@usbctg.edu.co

Recibido: 04-05-2010/ Aceptado: 06-08-2011

Resumen

En esta investigación se aislaron bacterias de 4 hábitats en el ecosistema marino aledaño a una industria petroquímica en la Bahía de Cartagena. En el proceso, las muestras se sometieron a pre-enriquecimiento por una semana, a enriquecimiento por tres semanas y a un proceso de selección de cepas competitivas, donde se evidenciaron cambios marcados en las propiedades del crudo de petróleo, como en turbidez y agregados blancos por crecimiento bacteriano. Se aislaron diferentes morfotipos que al caracterizar bioquímicamente fueron identificados como *Pseudomonas aeruginosa* en todas las muestras, corroborando su gran capacidad de adaptación en ambientes contaminados de este tipo. Estos resultados permitirán la realización de pruebas de biodegradación con esta bacteria y desarrollar ensayos a nivel microcosmos para su uso potencial en procesos de biorremediación de aguas marinas contaminadas con petróleo.

Palabras clave: bacterias, Bahía de Cartagena, contaminación, ecosistemas costeros, biodegradación, hidrocarburos.

Abstract

Isolation of potential oil degrading bacteria in coastal habitats in Cartagena Bay, Colombia

In this investigation, bacteria were isolated from 4 habitats in the marine ecosystem adjacent to a petrochemical industry in the Bay of Cartagena (biofilms, neuston, surface water and sediments). In the process, the samples were subjected to a pre-enrichment of a week, to an enrichment of three weeks and a selection of competitive strains, where there were marked changes in the properties of crude oil, such as turbidity and white aggregates for bacterial growth. Different morph types were isolated to characterize biochemically as *Pseudomonas aeruginosa* was identified in all samples, confirming his great ability to adapt in such polluted environments. This will allow for biodegradation tests with this bacterium, so you can make at microcosm test for potential use in bioremediation of oil-contaminated marine waters.

Key words: bacteria, biodegradation, Cartagena Bay Coastal Ecosystems, Hydrocarbons, Pollution.

Introducción

El petróleo con sus cuatro fracciones, hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfaltenos, es un compuesto muy complejo, considerado el contaminante más extendido en la biosfera y en el ambiente marino, por lo tanto un problema global (1, 2, 3). Representa la mayor fuente energética y la base para la obtención de materias primas para la industria. Su explotación, transporte y refinación generan problemas ambientales, especialmente por derrames accidentales y de prácticas inadecuadas de eliminación de fuentes, como industrias y refinerías de petróleo (2, 4, 5, 6).

La persistencia de estos contaminantes en el ambiente se ve influenciada por varios factores como la naturaleza del contaminante, su concentración y su capacidad para interactuar con las condiciones químicas, geológicas, físicas y biológicas del sitio contaminado. La fracción aromática del petróleo compuesta por di cíclicos, tri cíclicos y heterocíclicos (naftaleno, antraceno, fenantreno y dibenzotiofeno), conlleva un problema ambiental en aguas y suelos, con gran impacto ecológico y efectos recalcitrantes y tóxicos en los seres vivos, siendo los poliaromáticos y los heterocíclicos los más remanentes, o persistentes, generando como consecuencia efectos a largo plazo sobre las comunidades bentónicas en sedimentos marinos, debido a que su remoción natural es muy lenta (7, 8, 9).

La calidad de las aguas costeras se altera por los efluentes industriales- domésticos, los efluentes industriales, los efluentes industriales agrícola-pecuario y el transporte terrestre-fluvial-marítimo. Las descargas contienen sustancias tóxicas diferentes, en los que se incluye la industria del petróleo, con aceites, hidrocarburos, fenoles, ácidos, mercaptanos entre otras. En Cartagena de Indias, la calidad de las aguas costeras se ha visto alterada por los efluentes domésticos, industriales y agrícolas, como por el transporte terrestre, fluvial y marítimo y por las descargas de la industria del petróleo. Se han encontrado valores superiores a 10ug/L en zona costera de los Departamentos del Atlántico, Bolívar y Magdalena, superando la norma para aguas marinas y costeras no contaminadas; las concentraciones en esta región de HDD en el 2001 fueron de 33ug/L

en época seca y 49.4ug/L en la húmeda, y en el 2005 de 4.7ug/L en época seca, con una tendencia a la disminución de estas concentraciones (10).

Existen informes que destacan una descarga en promedio anual 90Kg/Ha de cultivo de fertilizantes y contaminación local de HC en la Bahía de Cartagena, lo que identifica el derrame constante de HC como fuente de impacto ambiental. Por lo anterior, existe un plan de contingencia por derrames de HC en donde participan Armada Nacional y la DIMAR, a cargo de la Oficina Nacional para la Prevención y Atención de Desastres, donde se planifican y coordinan aspectos logísticos, técnicos y operativos. El estudio de los problemas asociados con la remoción de petróleo, inició entre los años 50 y 70 (11-14), y se han incrementado en los últimos años (6, 15-22). La biorremediación de petróleo es considerada una alternativa económica, versátil, práctica y eficiente comparada con los tratamientos físico y químicos, debido a que se han aislado bacterias puras y mixtas (48). Representa una estrategia atractiva y amigable para el ambiente y se centra en el aislamiento de consorcios microbianos con capacidad de degradar petróleo (4, 6, 23). En los últimos años, la ecología microbiana ha direccionado esfuerzos en determinar cuáles son los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar hábitats contaminados; para ello, han sido desarrollados estudios de diversidad, dinámicas poblacionales y de comunidades presentes en suelos contaminados, especialmente aquellas relacionadas con asociaciones de bacterias biodegradadoras (6, 24).

Entre los factores biológicos que constituyen un recurso importante en la eliminación de contaminantes se encuentran, la diversidad de especies microbianas y sus capacidades metabólicas (25); sin embargo, los ambientes marinos contaminados están habitados por microorganismos capaces de tolerar los contaminantes, dando lugar al predominio de bacterias tolerantes. En el caso de los compuestos de hidrocarburos de petróleo, son degradables a diferentes ritmos y en algunos casos son recalcitrantes a la biodegradación, lo que conllevan a un metabolismo por largos períodos de tiempo (26). Los hidrocarburos de bajo peso molecular pueden degradarse rápidamente, pero los hidrocarburos de cadena larga o aromáticos policíclicos tienden

a ser poco biodegradables debido a su mayor hidrofobicidad (27).

Existen bacterias capaces de utilizar petróleo para su crecimiento y mantenimiento, conocidas como bacterias degradadoras de hidrocarburos, dentro de las cuales se encuentra el género *Pseudomonas*, que por su versatilidad metabólica, son capaces de convertir sustratos habitualmente no degradables, en metabolitos fácilmente asimilables o susceptibles de ser catalizados enzimáticamente (24). El éxito de la biorremediación consiste en la selección de microorganismos que puedan degradar materiales contaminados a diferentes temperaturas, pH, salinidad y concentración de nutrientes. Muchos tipos de microorganismos han sido aislados para mejorar procesos de biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos de petróleo (28-30), por ejemplo *Bacillus sp*, *Rhodococcus*, *Mycobacterias*, levaduras, *Micromycetes* y *Pseudomonas*, las cuales utilizan como fuente de energía compuestos orgánicos simples y complejos y son productoras de enzimas extracelulares, incluyendo la lipasa (31). Por lo tanto, el número de comunidades bacterianas en sitios contaminados suele ser menor que en sistemas no contaminados, aproximadamente el 0.1% de la población microbiana total (27), y pueden variar de acuerdo al momento del muestreo o el grado de contaminación por hidrocarburos (32), las condiciones climáticas, el tipo de suelo, y la profundidad de las aguas. Se han aislado en ambientes oceánicos y costeros géneros como *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, considerados como representativos de bacterias marinas cultivables; también se han aislado bacterias marinas capaces de degradar hidrocarburos, llamadas bacterias hidrocarbonoclasticas profesionales (γ -Proteobacterias), *Alcanivorax* (alcanos), *Cycloclasticus* (aromáticos), *Oleiphilus* y *Oleispira* (alifáticos, alcoholes y alcanos), *Marinobacter* y *Neptunomonas* (también pueden oxidar otras fuentes de carbono); como bacterias hidrocarbonoclasticas se encuentran el *Vibrio*, *Pseudoalteromonas* y *Aeromonas* (fenantreno y criseno); también otras, aisladas de ambientes marinos degradadoras de HC, pero consideradas bacterias terrestres como *Staphylococcus* y *Micrococcus* (Naftaleno), *Sphingomonas* (2-metil fenantreno) y *Geobacillus* (alcanos) (27, 33).

La identificación de los principales organismos responsables de la biodegradación de contaminantes, y su caracterización son de importancia para la comprensión, evaluación y desarrollo de estrategias de biorremediación *in situ* (34, 27), que utilizan microorganismos autóctonos. Una de las limitaciones de este proceso, es que los hidrocarburos son de difícil acceso para las bacterias debido a su baja solubilidad en medios acuosos. Los microorganismos autóctonos de ambientes marinos son capaces de degradar u oxidar petróleo en condiciones ambientales favorables, como presencia de oxígeno disuelto y nutrientes; muchos de los factores biológicos que controlan estos procesos no están bien entendidos en la actualidad (23, 35, 36)

Por lo anterior, este estudio tuvo como objetivos fundamentales aislar e identificar cepas bacterianas con capacidad para biodegradar petróleo en cuatro hábitats diferentes en zonas aledañas a una industria petroquímica en la Bahía de Cartagena, con el fin de seleccionarlas posteriormente y hacer pruebas de degradación a nivel de microcosmos, con el fin de contribuir en un futuro a biorremediar aguas de zonas costeras contaminadas por petróleo.

Materiales y métodos

Medios de cultivo y reactivos. Se utilizaron caldo nutritivo, agar nutritivo y agar-agar comerciales marca Merck, y se prepararon según las instrucciones del fabricante. El caldo de pre – enriquecimiento se preparó con $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ (0.9mg/L) marca R.A. Chemicals, agregando ACPM al 1% comprado en una estación de gasolina. El caldo de enriquecimiento fue preparado con sales grado reactivo marca Merck, K_2HPO_4 : 1.5g/L; KH_2PO_4 : 0.5g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0.5g/L; NaCl: 0.5g/L; MgSO_4 : 3.0g/L; FeSO_4 : 0.002g/L; CaCl_2 : 0.002g/L, todos en 1.000mL de agua destilada, suplementados con crudo de petróleo al 1%, muestra obtenida por donación de una empresa petroquímica; el medio mineralizado sólido se obtuvo agregando agar-agar 15g/L con 1% de crudo de petróleo. Los medios fueron esterilizados en autoclave horizontal por 15 minutos a 20 libras de presión y 121°C, para garantizar completa esterilidad.

Toma de muestras. El muestreo se hizo en forma radial en las inmediaciones de vertimientos finales de

una refinería de petróleo y sus alrededores, donde se delimitaron cinco puntos diferentes de muestreo, por medio del sistema de geoposicionamiento (GPS). En cada uno de ellos, se tomó la muestra por duplicado. Las coordenadas en las cuales fueron tomadas las diferentes muestras se presentan en la Tabla 1. Los análisis fueron realizados a partir de cuatro hábitats de microorganismos reconocidos en el sistema marino: bio películas, sedimentos o lodos, neuston y agua subsuperficial, Figura 1.

Bio película. Se tomó una muestra por raspado con espátula estéril, cerca del desagüe de una industria petroquímica, la cual fue envasada en frascos estériles.

Sedimento. Las muestras de sedimento fueron tomadas por duplicado utilizando una draga tipo Vanveen para muestreo de sedimento, y pasadas a su vez a frascos estériles de 250 ml.

Neuston. Estas muestras fueron tomadas por duplicado, dejando entrar agua de la capa superficial ubicada en la interface agua-aire (Neuston) en una placa de vidrio de forma piramidal, construida por los autores, de 20 cm x 20 cm, cuya capacidad de carga es un volumen entre 11 y 15 ml, que de manera aleatoria se tomaron, hasta llenar los frascos estériles.

Agua sub superficial. Se recolectaron muestras por duplicado en frascos estériles de 250 ml, sumergiéndolos a 30 cm de la superficie, abriéndolos y dejando pasar el agua hasta su llenado y tapado finales.

Todas las muestras fueron transportadas en condiciones de refrigeración en nevera portátil con hielo, hasta ser procesadas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de San Buenaventura, Cartagena. Las muestras fueron marcadas e identificadas, así:

- Localización del muestreo: inmediaciones del vertimiento final de una industria petroquímica, Bahía de Cartagena.
- Sitio de recolección de la muestra: se denominó teniendo en cuenta el lugar exacto según la distribución del área de muestreo donde se tomaron (Punto- P1 a P5), siendo el código del duplicado P1a y P1b, completando los 5 puntos.
- Fecha de recolección: 20 de Octubre de 2009.
- Tipo de muestreo: integrado.

Fases de laboratorio. Para la realización de las fases de pre-enriquecimiento y de enriquecimiento bacterianos, se realizaron algunas modificaciones a los procedimientos sugeridos por Gómez *et al.*, 2006 (37); Narváez *et al.*, 2008 (38); Mohajeri *et al.*, 2010 (26); Bacosa *et al.*, 2010 (4); y Zhengzhi Zhang *et al.*, 2011 (6).

Pre-enriquecimiento

Biopelícula. Se tomó 1gr de biopelícula y se agregó a 9mL de caldo de pre-enriquecimiento ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) con ACPM al 1%.

Sedimento. Se diluyeron 50gr de sedimento en 450mL de agua de mar estéril, con agitación por 15 minutos. 1mL de la dilución anterior se agregó en 9 ml de caldo de pre – enriquecimiento ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) con ACPM al 1%.

Neuston y agua subsuperficial. Se tomó 1mL de la muestra y se agregó a 9 ml de caldo de pre – enriquecimiento ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) con ACPM al 1%. Los caldos de pre-enriquecimiento sembrados se incubaron a 35°C con agitación permanente durante 7 días.

Tabla 1. Localización de las estaciones de muestreo georeferenciadas (GPS).

PUNTO DE MUESTREO	COORDENADAS
1	08°43'50.7" 76°32'73.8"
2	08°43'48.7" 76°32'74.5"
3	08°43'49.4" 76°32'74.9"
4	08°43'50.4" 76°32'74.9"
5	08°43'50.6" 76°32'77.4"



Figura 1. Toma de muestras

Tinción de Gram y repique en agar nutritivo. Se realizó coloración de Gram a cada uno de los tubos de caldo de pre-enriquecimiento. Posteriormente, Se tomaron 10 μ l de cada tubo de caldo de pre-enriquecimiento y se realizó siembra por agotamiento en Agar nutritivo con 1% de ACPM como única fuente de carbono y energía, con el fin de aislar colonias de cada muestra cultivada por 7 días. Los cultivos fueron incubados por 24 horas a 35°C.

Enriquecimiento. La fase de enriquecimiento constó de un proceso de tres semanas. Inicialmente, pasados 7 días de incubación de las muestras pre-enriquecidas, se tomó 1 ml de estas y se sembraron cada uno en tubos con caldo de enriquecimiento (caldo mineralizado + 1% de petróleo crudo). Se incubaron a 37°C por 7 días con agitación continua. Este mismo procedimiento se realizó a los 14 y a los 21 días. El petróleo se observó como una sustancia negra inmiscible localizada en la parte superior del tubo.

Selección de cepas competitivas en la degradación de petróleo (selección horizontal). Para la selección horizontal de las cepas estas fueron reactivadas en caldo nutritivo e incubadas a 35°C por 24 horas. Posteriormente se realizaron siembras masivas en agar mineralizado 1% de crudo de

petróleo a 30°C por 7 días con 3 repiques semanales.

Identificación bioquímica. Todos los tubos fueron repicados en agar nutritivo y las cepas caracterizadas bioquímicamente utilizando el sistema BD BBL Crystal Identification Systems Entric/nonfermenter ID Kit. El procedimiento se hizo de acuerdo con las especificaciones técnicas de la casa comercial, generando código que al buscarlo en una base de datos permite tener el género y la especie de la bacteria estudiada.

Resultados

Pre-enriquecimiento

En esta etapa, se inició una adaptación de los microorganismos en los diferentes hábitats muestreados con diesel o ACPM como fuente de carbono y energía. La coloración de Gram permitió apreciar bacilos gram negativos, cocobacilos gram negativos, bacilos gram positivos, cocos gram positivos, algas y protozoos. La tendencia en los cuatro hábitats fue la prevalencia de bacilos y cocobacilos gram negativos, siendo marcada la gran diversidad en el hábitat de biopelícula. Al finalizar los 7 días de incubación se realizaron cultivos sobre agar nutritivo, evidenciando crecimientos entre moderados y abundantes, de veintiocho colonias con morfologías diversas. Así mismo, en algunos cultivos

se presentó pigmentación de color verdoso, pensando en posibles bacterias del género *Pseudomonas*, como se observa en la Figura 2 y 3. En esta etapa, fue evidente en la muestra de Neuston y de agua subsuperficial la formación de natas blanquecinas transparentes y de sustancia con característica jabonosa en la superficie del tubo, la cual fue más abundante al cuarto día de incubación, mientras que las muestras de sedimento y biopelícula presentaron abundante turbidez, nata en la parte superior y formación de sedimento, el cual se hizo mucho más abundante el día quinto.

Enriquecimiento

En esta etapa, la adaptación se fortalece al hacer repiques semanales por 21 días utilizando crudo de petróleo como fuente de carbono y energía. Este hecho, permitió seleccionar bacilos y cocobacilos Gram negativos en los cuatro hábitats estudiados. Los cultivos sobre agar nutritivo de los tubos a los 21 días

de incubación presentaron abundante crecimiento con morfologías de colonias grandes y algunas pequeñas, irregulares, cremosas, convexas y coloración amarilla, con una característica común de tinción verdosa en todos los cultivos, permitiendo seleccionar hasta ese momento 12 morfo tipos Figura 4 y 5.

Al hacer un seguimiento de los cambios en los tubos en la tercera semana de enriquecimiento, se evidenció turbidez y cambios en las propiedades del crudo de petróleo, al disgregarse y sedimentarse, hasta la desaparición de aproximadamente el 90% toda la mancha de coloración oscura, con formación de un sobrenadante amarillento, Figura 4 y 5.

Selección de cepas competitivas

Las 12 colonias seleccionadas fueron sembradas en agar mineralizado con 1% de crudo, tal como se presenta en otras investigaciones recientes (33). Los resultados presentaron crecimiento en la totalidad

PRE ENRIQUECIMIENTO (7 días)

Neuston A (NA)

- Bacilos Gram Negativos
- Cocobacilos Gram Negativos



Crecimiento Moderado

- Colonia 1 (NAc1):** forma circular, borde entero, umbilical, lisa, blanca.
- Colonia 2 (NAc2):** forma circular, borde entero, convexa, cremosa, amarilla.
- Colonia 3 (NAc3):** Forma en roseta, borde lobulado, elevación crateriforme, textura rugosa, blanca.

Neuston B (NB)

- Bacilos Gram Negativos
- Cocobacilos Gram Negativos



Crecimiento Abundante

- Colonia 1 (NBc1):** Forma irregular, borde lobulado, elevación crateriforme, textura rugosa, blanca.
- Colonia 2 (NBc2):** forma circular, borde entero, convexa, textura cremosa, amarilla.
- Colonia 3 (NBc3):** forma circular, borde entero, convexa, textura cremosa, blanquecina.

Biopelícula A (BA)

- Bacilos Gram Negativos
- Cocobacilos Gram Negativos
- Bacilos Gram Positivos
- Cocos Gram Positivos
- Algas
- Protozoos



Crecimiento Abundante

- Colonia 1 (BAc1):** Forma circular, borde entero, convexa, cremosa, blanquecina, mediana.
- Colonia 2 (BAc2):** Forma irregular, borde entero, convexa, cremosa, amarilla, mediana.

Biopelícula B (BB)

- Bacilos Gram Negativos
- Cocobacilos Gram Negativos
- Bacilos Gram Positivos
- Cocos Gram Positivos
- Algas
- Protozoos



Crecimiento Abundante

- Colonia 1 (BBc1):** Forma circular, borde entero, convexa, cremosa, blanquecina, mediana.
- Colonia 2 (BBc2):** Forma circular, borde entero, convexa, cremosa, amarilla, pequeña.
- Colonia 3 (BBc3):** Forma irregular, borde ondulado, crateriforme, textura arrugada, blanca.

Figuras 2 y 3. Resultados de la etapa de pre-enriquecimiento.

Agua sub superficial A (ASSA)

Bacilos Gram Negativos
Cocobacilos Gram Negativos
Cocos Gram Positivos



Crecimiento Moderado

Colonia 1 (ASSac1): Forma irregular (de hoja), borde entero, convexa, textura cremosa, pigmento rosado.
Colonia 2 (ASSac2): forma circular, borde entero, convexa, cremosa, amarilla.

Agua sub superficial B (ASSB)

Bacilos Gram Negativos
Cocobacilos Gram Negativos



Crecimiento Moderado

Colonia 1 (ASSbc1): Forma irregular, borde lobulado, elevación crateriforme, textura rugosa, blanca, grande.
Colonia 2 (ASSbc2): forma circular, borde entero, convexa, textura cremosa, blanquecina.
Colonia 3 (ASSbc3): Forma circular, borde entero, plana, textura lisa, blanca, grande.

Sedimento A (SA)

Bacilos Gram Negativos
Cocobacilos Gram Negativos
Cocos Gram Positivos



Crecimiento Moderado

Colonia 1 (SAc1): Forma irregular, borde lobulado, elevación crateriforme, textura rugosa, color crema.
Colonia 2 (SAc2): forma circular, borde entero, convexa, textura cremosa, amarillo claro.
Colonia 3 (SAc3): forma circular, borde entero, convexa, textura cremosa, blanca.
Colonia 4 (SAc4): forma irregular, borde lobulado, levantada, rugosa, amarilla, pequeña.
Colonia 5 (SAc5): forma circular, borde entero y levantado, lisa, color amarillo verdoso.
Colonia 6 (SAc6): forma circular, borde entero, convexa, textura cremosa, blanquecina, muy pequeña.

Sedimento B (SB)

Bacilos Gram Negativos
Cocos Gram Positivos



Crecimiento Moderado

Colonia 1 (SBc1): Forma irregular, borde lobulado, elevación crateriforme, textura rugosa, blanca, grande.
Colonia 2 (SBc2): Forma irregular, bordes digitados, elevación crateriforme, textura rugosa, blanca, grande.
Colonia 3 (SBc3): Forma circular, borde entero, plana, textura lisa, blanca, mediana.
Colonia 4 (SBc4): forma circular, borde entero, convexa, textura cremosa, blanca.
Colonia 5 (SBc5): Forma irregular, bordes entero, elevación crateriforme, textura rugosa y seca, amarilla.
Colonia 6 (SBc6): Forma irregular, borde lobulado, elevación convexa, textura lisa y cremosa, blanquecina.

de las cajas, evidenciando el crecimiento de colonias negras puntiformes y generando desaparición parcial de la coloración oscura del crudo de petróleo, como se observa en la Figura 6.

Identificación bioquímica

De las 12 colonias seleccionadas en agar mineralizado con crudo de petróleo al 1%, se escogieron nueve colonias para su caracterización bioquímica. Los resultados de esta caracterización, permitieron demostrar la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en las nueve colonias escogidas de los cuatro tipos de hábitats muestreados, Figura 7. Los resultados demuestran la alta selectividad de esta bacteria, su tolerancia y adaptación, lo que confirma su capacidad de degradar una amplia gama de substratos, incluido el crudo de petróleo. Así mismo el uso de esta bacteria puede ser aplicado en posteriores estudios de biorremediación de aguas marinas, pasando de pruebas de laboratorio a pruebas de microcosmos, debido a que muchos factores ambientales podrían afectar la habilidad de

estos microorganismos de degradar hidrocarburos en ecosistemas contaminados.

Discusión

El éxito de la biorremediación en derrames de petróleo depende de la disponibilidad de los microorganismos adecuados, los factores ambientales y la composición del aceite derramado (26).

En relación con la metodología empleada en el estudio, varios autores coinciden en que la selección de microorganismos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros enriquecidos con petróleo, es considerada como una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y supervivencia de cepas tolerantes a elevadas concentraciones de petróleo (24).

Así mismo, los resultados de esta investigación representan importancia al considerar que se asemejan a lo expuesto por Ruberto et al., 2003(39) y Narváez 2006 (38), quienes así mismo reportaron que el grupo predominante en los aislamientos fueron los bacilos Gram negativos. Estos, tienen una ventaja

ENRIQUECIMIENTO (21 días)



Neuston A (NA)

Bacilos Gram Negativos
Cocobacilos Gram Negativos

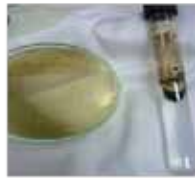


Crecimiento Abundante
NA Colonia1: colonia de forma irregular, borde entero, elevación convexa, cremosa.



Neuston B (NB)

Cocobacilos Gram Negativos

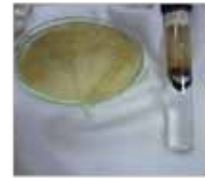
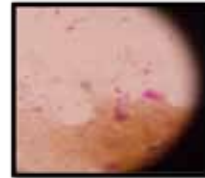


Crecimiento Mod-Abundante
NB Colonia1: colonia mediana de forma irregular, borde entero, elevación convexa cremosa.
NB Colonia2: colonia pequeña, redonda, borde entero, elevación convexa, cremosa.



Biopelícula A (BA)

Cocobacilos Gram Negativos



Crecimiento Abundante
BA C1: colonia grande de forma redonda, borde entero, elevación convexa, color amarillo opaco.



Biopelícula B (BB)

Bacilos Gram Negativos



Crecimiento Abundante
BB C1: colonia grande de forma irregular, borde entero, convexa, cremosa.
BB C2: colonia pequeña de forma redonda, borde entero, elevación convexa, color amarillo opaco.
BB C3: colonia pequeña, de forma redonda, borde entero, elevación convexa, color blanco.



Agua sub superficial A (ASSA)

Bacilos Gram Negativos



Crecimiento Mod-Abundante
ASSa C1: colonia de forma irregular, borde entero, elevación convexa, cremosas.
ASSb C2: colonia pequeña, redonda, borde entero, elevación convexa, cremosas.



Agua sub superficial B (ASSB)

Bacilos Gram Negativos



Crecimiento Abundante
ASSb C1: colonia grande de forma irregular, borde entero, elevación convexa, color amarillo opaco.



Sedimento A (SA)

Bacilos Gram Negativos



Crecimiento Abundante
SA C1: Colonia de forma irregular, borde entero, elevación convexa, cremosas.



Sedimento B (SB)

Bacilos Gram Negativos



Crecimiento Abundante
SB C1: colonia grande de forma redonda, borde entero, elevación convexa, cremosas, color amarillo opaco.

Figuras 4 y 5. Resultados de la etapa de enriquecimiento.



Figura 6. Procesamiento y resultados de la etapa de selección horizontal de cepas competitivas.

amplia frente a las bacterias Gram positivas, debido a que son considerados importantes degradadores de hidrocarburos por la presencia de lipopolisacáridos en su membrana, que facilitan la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos en sistemas acuosos y contribuyen al incremento en la superficie de ataque del contaminante (40).

Pérez et al., 2008 (24), sustenta que las comunidades microbianas en áreas contaminadas son dominadas por los organismos capaces de utilizar o sobrevivir a compuestos tóxicos, como los ambientes contaminados con hidrocarburos, tal es el caso del género *Pseudomonas*.

La *Pseudomonas aeruginosa* ha sido identificada como un género destacado en diversos procesos de degradación (31, 41-45) y es la que con mayor frecuencia se aísla de ambientes contaminados con hidrocarburos. Sin embargo, otras especies de *Pseudomonas* han sido aisladas de sedimentos de otras costas como *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas synxatha*, *Pseudomonas reactans* (46) y *Pseudomonas putida* (47).

Otras investigaciones han demostrado que especies de *Acinetobacter* involucradas en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos, así como en la producción de heteropolisacáridos de alto peso molecular que actúan como emulsionantes de gran alcance (48).

Agradecimientos

A las auxiliares de laboratorio de la Universidad San Buenaventura-Cartagena por su valioso aporte. A la Fundación Tecnológico Comfenalco a través de su Dirección de Investigaciones por cofinanciar esta investigación. A estudiantes de semillero de investigación que de una u otra manera colaboraron y fortalecieron su proceso formativo.

Referencias

- Alexander, M. Factors affecting microbial biodegradation. En: Alexander M, editor. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York; 1999. p. 302-63.
- Al-Mailem D, Sorkhoh N, Salamah S, Eliyas M, Radwan S. Oil-bioremediation potential of Arabian Gulf mud flats rich in diazotrophic hydrocarbon-utilizing bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2010; 64: 218-225.
- Allsopp D, Seal K, Gaylarde C. Introduction to biodeterioration, 2^a ed. Cambridge University Press, UK; 2004.
- AL-Saleh E, Drobiova H, Obuekwe C. Predominant culturable crude oil-degrading bacteria in the coast of Kuwait. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2009; 63: 400-406.
- Bacosa H, Suto K, Inoue C. Preferential degradation of aromatic hydrocarbons in kerosene by a microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2010; 64:702 - 710.
- Bracho M, Díaz L, Soto L. M. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp. *Ciencia*. 2004; 12:269-275.
- Chaerun S, Tazaki K, Asada R, Kogure K. Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon degrading bacteria. *Environmental International*. 2004. 30: 911-922.
- Chesneau H. The silent fuel killers (stability and microbiologicals). En: Proceedings of 2000 International Joint Power Generation Con-

CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Pseudomonas aeruginosa

Código 3223111311



Crecimiento Abundante
ASSb C1: colonia grande de forma irregular, borde entero, elevación convexa, cremosas, color amarillo opaco.



Crecimiento Mod-Abundante
ASSb C2: colonia pequeña, redonda, borde entero, elevación convexa, cremosas.



Crecimiento Abundante
SB C1: colonia grande de forma redonda, borde entero, elevación convexa, cremosas, color amarillo opaco.



Crecimiento Mod-Abundante
NB Colonia2: colonia pequeña, redonda, borde entero, elevación convexa, cremosa.



Crecimiento Abundante
SA C1: Colonia de forma irregular, borde entero, elevación convexa, cremosas.



Crecimiento Abundante
BA C1: colonia grande de forma redonda, borde entero, elevación convexa, cremosas, color amarillo opaco.

Pseudomonas aeruginosa

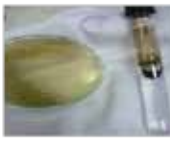
Código 3023111311



Crecimiento Abundante
NA Colonia1: colonia de forma irregular, borde entero, elevación convexa, cremosa.



Crecimiento Abundante
ASSb C1: colonia grande de forma irregular, borde entero, elevación convexa, cremosas, color amarillo opaco.



Crecimiento Mod-Abundante
NB Colonia1: colonia mediana de forma irregular, borde entero, elevación convexa cremosa.

Figura 7. Procesamiento y resultados de la caracterización bioquímica.

- ference; 2000. P. 1-8.
- Cho B H, Chino H, Tsuji H, Kunito T, Nagaoka K, Otsuka S, et al. Analysis of oil components and hydrocarbon-utilizing microorganisms during laboratory scale bioremediation of oil-contaminated soil of Kuwait. Chemosphere. 1997; 35 (7): 1613-1622.
- Cohen Y. Bioremediation of oil by marine microbial mats. International Microbiology. 2002. 5:189-193.
- Ferrari M, Neirotti E, Albornoz C. Occurrence of heterotrophic bacteria and fungi in an aviation fuel handling system and its relationship with fuel fouling. Rev Argent Microbiol.1998; 30(3):105-114.
- Geiselbrecht A, Herwig R, Deming J, Staley J., Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from puget sound sediments. Applied and Environmental Microbiology. 1996; 62 (9), 3344-3349.
- Gallego J, Loredo J, Llamas J, Vásquez F, Sánchez J. Biorremediation of diesel - contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. Biodegradation. 2001; 12:325-335.
- Gaylarde C, Bento F, Kelley J. Microbial contamination of stored hydrocarbon fuels and its control. Rev Microbiol.1999; 30:1-10.
- Gómez M, Hurtado C, Dussan J, Parra J, Narváez S. Determinación de la capacidad de degradación de compuestos orgánicos persistentes por bacterias marinas aisladas de sedimentos en el Caribe Colombiano. Actual Biol. 2006; 28 (85):125-137.
- Harayama S, Yuki K, Akihiro H. Microbial communities in oil-contaminated seawater. Current Opinion in Biotechnology. 2004; 15:205-214.
- Hasanuzzaman M, Umadhay-Briones K, Zsiros S, Morita N, Nodasaka Y, Yumoto I, et al. Isolation, identification, and characterization of a novel, oil-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* T1. Curr Microbiol. 2004; 49:108-114.
- Hill E. Biodeterioration of petroleum products. En: Proc. of IX Symposium Microbiology Inst. of Petrol; 1967. P.19-20.
- Holloway B. *Pseudomonas* in the late twentieth century. En: Galli E, Silver S, Witholt B, edición. *Pseudomonas* molecular biology and biotechnology. Washington, DC: American Society for Microbiology.1992.
- Instituto de Investigaciones Marinas INVEMAR. Informe del estado de los ambientes marinos y costeros en Colombia. Serie de Publicaciones periódicas. 2006; 8.
- Harayama K, Robert A, Shigeaki harayama k. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. Journal of Bacteriology. 2000182(8): 2059-2067
- Kaplan C, Kitts C. Bacterial Succession in a petroleum land treatment unit. Applied and Environmental Microbiology. 2004; 70 (3): 1777 - 1786.
- Li H, Zhao Q, Boufadel M, Venosa A. A universal nutrient application strategy for the bioremediation of oil-polluted beaches. Marine Pollution Bulletin. 2007. 54 (8): 1146-1161.
- Mackey A, Hodgkinson M. Assesment of the impact of Naphthalene contamination on mangrove fauna using behavioral bioassays. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1996; 56: 279-286.
- Martínez A, Gaju N. El papel de los tapetes microbianos en la bio recuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. Revista Ecosistemas [revista en Internet] 2005 Mayo. [acceso 19 de octubre de 2010]; 14 (2). Disponible en: http://www.revistaecosistemas.net/revista_frame.asp?pagina=%2Farticulo.asp%3Fid%3D122.
- Mashreghi M, Marialigeti K. Characterization of bacteria degrading petroleum derivates isolated from contaminated soil and water. Journal of Sciences. 2005; 16(4): 317-320.

27. Matsumiya Y, Wakita D, Kimura A, Sanpa S, Kubo M. Isolation and characterization of a lipid-degrading bacterium and its application to lipid-containing wastewater treatment. *J Biosci Bioeng.* 2007; 103: 325–330.
28. Murzaev N. About microbiological methods of serum removal from oils. *Mikrobiologiya.* 1964; 33(6):1082–1091.
29. Narváez M, Martínez M. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, aisladas a partir de sedimentos del Caribe Colombiano. *Bol Invest Mar Cost Colombia.* 2008; 37 (1): 63-77.
30. Pérez R, Camacho M, Gómez J, Ábalos A, Viñas M, Cantero D. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas.* 2008. 39: 44-51.
31. Rolling W, Head I, Larter S. The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Res Microbiol.* 2003; 154(5):321–328.
32. Rozanova E. Distribution of microflora in oil strata operated over long periods of time. *Mikrobiologiya.* 1971; 40(2):363–369.
33. Roy S, Hens D, Biswas D, Biswas D, Kumar R. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. *World Journal of Microbiology & Biotechnology.* 2002; 18: 575–581.
34. Ruberto L, Vazquez S, Mac Cormack W. Efectiveness of the natural bacterial flora: Biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2003; 52:115-125.
35. Samuel R, Stack A, y Weston L. Biosurfactant Production by Crude Oil-Degrading Microorganisms. *Proc. 96th Meeting of Gen. Am. Soc. on Microbiology.* 1996; p. 439.
36. Shriadah M. Impacts of an oil spill on the marine environment of the United Arab Emirates along the Gulf of Oman. *Marine Pollution Bulletin.* 1998. 36: 876–879.
37. Shtina, E, Nekrasova K. Vosstanovlenie neftezagryaznennykh pochvennykh ekosistem (Reduction of Oil-Polluted Soil Ecosystems). Moscow: Nauka. 1998; 57–81.
38. Sikkema J, Bont J, Poolman B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews.* 1995; 59:201 – 222.
39. Tanaka D, Takashima M, Mizuta A, Tanaka S, Sakatoku A, Nishikawa A. *Acinetobacter* sp. Ud-4 Efficiently degrades both edible and mineral oils: Isolation and characterization. *Curr Microbiol.* 2010; 60: 203 – 209.
40. Ueno A, Hasanuzzaman H, Yumoto I, Okuyama H. Verification of Degradation of n-Alkanes in Diesel Oil by *Pseudomonas aeruginosa* Strain WatG in Soil Microcosms. *Current microbiology.* 2006; 52: 182 – 185.
41. Vargas P, Cuellar R, Dussan J. Biorremediación de residuos de petróleo. Hipótesis – apuntes científicos Uniandinos. 2004; 4:44-49.
42. Vishnyakova T, Vlasova I, Grechyushkina N, Krylov I, Paushkin Y, Litvinenko S, et al. Biological contamination of oil and oil products and their protection during transport and storage. Review. En: Vishnyakova TP, editor. *CNIITeneftehim, M, Russian;* 1970.
43. Watanabe K, Kodama Y, Kaku N. Diversity and abundance of bacteria in an underground oil-storage cavity. *BMC Microbiol.* 2002; 2:23.
44. Wilhelms A, Larter S, Head I, Farrimond P, di-Primio R, Zwach C. Biodegradation of oil in uplifted basins prevented by deep-burial sterilization. *Nature.* 2001; 411(6841):1034–1037.
45. Yang S, Chen C, Sung Y, Lin Y. Effect of moisture content on the microbial activity in JP-5 fuel oil. *Chinese J Microbiol Immunol.* 1992; 25(4):223–231.
46. Yi-Chen Liu, Ling-Zhi Li, Ying Wua, Wei Tian, Li-Ping Zhang, Lian Xu, et al. Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the alkB gene. *Bioresource Technology.* 2010; 101: 310–316.
47. Zahed M, Aziz H, Isa M, Mohajeri L, Mohajeri S. Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. *Bioresource Technology.* (2010) 10: 9455-9460.
48. Zhengzhi Z, Zhaowei H, Chunyu Y, Cuiqing M, Fei T, Ping X. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology.* 2011;102: 4111–4116.