

SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS AISLADAS A PARTIR DE SEDIMENTOS DEL CARIBE COLOMBIANO

Silvia Narváez-Flórez¹, Martha L. Gómez² y María M. Martínez³

- 1 Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR), Cerro Punta Betín, Santa Marta, Colombia. snarvaez@invemar.org.co
- 2 Ministerio de Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Desarrollo Sectorial Sostenible, Calle 37 # 8 -40. Piso 2 anexo Bogotá, Colombia. mgomez@minambiente.gov.co
- 3 Pontificia Universidad Javeriana, Departamento de Microbiología, Cra 7ª # 43-82. Oficina 608 Bogotá, Colombia. mmmartín@javeriana.edu.co

RESUMEN

A partir de sedimentos del Caribe colombiano se realizaron 31 aislamientos bacterianos en medio mínimo de sales suplementado con hidrocarburos (ACPM o petróleo crudo) como única fuente de carbono. Las cepas aisladas se sometieron a pruebas de selección en diferentes concentraciones de hidrocarburos y se escogieron once de ellas tolerantes al crudo y ACPM en un ámbito del 1-8% v/v. Posteriormente, con las cepas seleccionadas, se conformó un cultivo bacteriano mixto y se evaluó su capacidad de degradar hidrocarburos en un ensayo a escala de laboratorio, con una concentración del 2% v/v de ACPM en un periodo de 21 días. Mediciones de la biomasa en Unidades Formadoras de Colonias (UFC)/mL fueron empleadas para elaborar la curva de crecimiento del cultivo mixto y la remoción de hidrocarburos se cuantificó por cromatografía de gases acoplada a masas. El cultivo mixto fue capaz de degradar el 68.6 % de los hidrocarburos alifáticos con preferencia de los *n*-alcanos de cadena larga (C_{12} - C_{31}), alcanzando un crecimiento máximo de 3.13×10^9 UFC / mL. Bajo el tiempo de observación no se evidenció la degradación de hidrocarburos aromáticos. Nueve de las once cepas se identificaron mediante los sistemas bioquímicos BBL crystal y API 50 CHB/E como bacterias correspondientes a los géneros *Klebsiella*, *Chromobacterium*, *Flavimonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Bacillus*. Las cepas evaluadas tienen potencial enzimático para degradar hidrocarburos y es necesario caracterizarlas a nivel molecular con el fin de formular un consorcio que sea efectivo para la aplicación en campo.

PALABRAS CLAVE: Biodegradación, Hidrocarburos, Bacterias, ACPM, Petróleo crudo.

ABSTRACT

Selection of bacteria with hydrocarbon degrading capacity isolated from Colombian Caribbean sediments. Thirty one bacterial isolations in minimal salts supplemented medium with hydrocarbons (ACPM or

crude oil) as sole carbon source were isolated from sediment samples from the Colombian Caribbean. Bacterial strains underwent selection tests in different concentrations of hydrocarbons; 11 tolerant crude oil and ACPM strains in a range of 1-8%v/v were chosen. A mixed bacterial culture was created and assessed its ability to degrade hydrocarbons in a laboratory-scale test, with a concentration of 2% v/v of ACPM over a period of 21 days. Measurements of biomass in Colony Forming Units (CFU)/mL were used to develop the growth curve of the mixed culture. Hydrocarbons remotion was measured by mass chromatography. The mixed culture was able to degrade the 68.6% of aliphatic hydrocarbons in preference of long chain n- alkanes (C12- C31), reaching a maximum growth of 3.13×10^9 UFC / mL. Degradation of aromatic hydrocarbons was not evidenced under the observation time. Nine of the eleven strains were identified using the biochemical systems BBL and API 50 CHB/E; they belonged to the genus *Klebsiella*, *Chromobacterium*, *Flavimonas*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, and *Bacillus*. The evaluated strains have enzymatic potential to degrade hydrocarbons and it is necessary to characterize them at molecular level in order to develop an effective consortium for field application.

KEY WORDS: Biodegradation, Hydrocarbons, Bacteria, ACPM, Crude oil.

INTRODUCCIÓN

La contaminación por hidrocarburos del petróleo es una problemática de carácter mundial y amplia distribución geográfica, teniendo en cuenta que independiente de la zona afectada (lagos, suelos, zonas freáticas, ríos y playas) por procesos biológicos y físicos, los hidrocarburos tienen como destino final los mares y océanos (Shanidul y Tanaka, 2004). Colombia, único país de Sudamérica con costas en los dos océanos, se ha visto afectada en los últimos años por la contaminación de hidrocarburos producto de las actividades domésticas, industriales y marítimas. Así mismo, por procesos relacionados con la explotación, transporte, manejo del petróleo y sus derivados (Posada *et al.*, 2005; Vallejo *et al.*, 2005).

En la región Caribe existen problemas locales debido a derrames crónicos en los puertos, las refinerías de petróleo, terminales petroleros, por los buques de cabotaje o accidentes de buques de tráfico internacional (Marín *et al.*, 2004). Las zonas costeras más afectadas son Santa Marta, Barranquilla, Cartagena, Golfo de Morrosquillo y Golfo de Urabá. Evaluaciones sobre la contaminación de hidrocarburos derivados del petróleo muestran que los contenidos de Hidrocarburos Disueltos y Dispersos (HDD) han alcanzado valores de $33 \mu\text{g/L}$ (Marín *et al.*, 2004), concentración que supera el valor límite de $10 \mu\text{g/L}$ establecido por la UNESCO para aguas marinas y costeras no contaminadas (INVEMAR, 2001).

Con el fin de contrarrestar los efectos nocivos causados por la presencia del petróleo en los ecosistemas marinos se han desarrollado técnicas físicas, químicas y biológicas que buscan remover el mayor porcentaje del contaminante y disminuir el impacto generado tras un derrame o acumulación progresiva. Entre las diversas técnicas, la biodegradación es considerada actualmente la alternativa menos costosa para transformar contaminantes

presentes en diversos ecosistemas, teniendo en cuenta que gran variedad de bacterias cuentan con la maquinaria enzimática para transformar los compuestos xenobióticos persistentes y éstas pueden ser aisladas de lugares donde haya existido una previa exposición al contaminante (Márquez *et al.*, 2001).

En investigaciones realizadas por Christon *et al.* (1997), se logró una disminución de hidrocarburos cercana al 95% con la adición de microorganismos al área de tratamiento, mientras que en los campos no tratados la reducción fue del 14%. En el caso del buque petrolero Exxon Valdez, la adición de nutrientes a través de fertilizantes (INIPOL EAP 22 y Custombler) incrementó en una magnitud de tres veces la remoción de petróleo crudo. La adición de nutrientes promueve la biodegradación al aumentar las poblaciones microbianas y la formación de microemulsiones agua-aceite, que reducen la viscosidad y tensión superficial, lo cual a su vez aumenta la disponibilidad del sustrato (Swannell *et al.*, 1996).

En Colombia los procesos de biodegradación han sido enfocados principalmente al tratamiento de suelos. El Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes ha desarrollado diferentes estudios encaminados al aislamiento y bioaumentación de bacterias nativas degradadoras de crudo en suelos impactados por derrames del oleoducto Caño Limón Coveñas. En otros estudios se han tratado suelos a través de biolabranza y adición de nutrientes, obteniendo porcentajes de degradación de hidrocarburos totales del petróleo entre el 35%-61% (Castro *et al.*, 2004; Vallejo *et al.*, 2005). En el ambiente marino costero se ha trabajado en el campo del aislamiento y caracterización de microorganismos degradadores de compuestos orgánicos en la Bahía de Cartagena (Salamanca, 1999). Bajo este marco de referencia, teniendo en cuenta que son pocas las investigaciones realizadas en Colombia a nivel de biorremediación en ambientes marino costeros, se desarrolló la presente investigación, que tuvo como objetivo seleccionar bacterias aisladas de sedimentos del Caribe colombiano en estaciones históricamente impactadas por hidrocarburos y evaluar su capacidad de degradación, con el fin de que posteriormente puedan ser aplicadas como una herramienta estratégica en la biorremediación de ecosistemas contaminados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Los microorganismos que se emplearon en el presente estudio hacen parte del Cepario de Bacterias Marinas (CBM) del INVEMAR y se aislaron de estaciones históricamente impactadas con hidrocarburos de los departamentos de Bolívar, Magdalena, Sucre y Córdoba (Marín *et al.*, 2004; Figura 1). Se llevó a cabo la siguiente metodología: 50 g del sedimento recolectado con una draga metálica Ekman de 0.05 m³, a una profundidad no mayor a los 15 cm, fueron adicionados a 450 mL de agua de mar estéril, agitados por 15



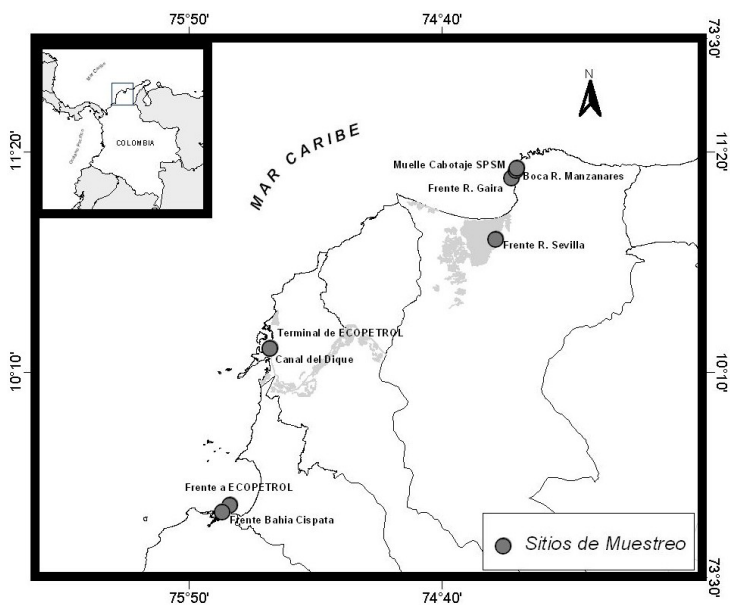


Figura 1. Área de estudio y ubicación de estaciones de muestreo en la región Caribe colombiana.

minutos a 180 rpm a temperatura ambiente. Un mL del sobrenadante se inoculó en 9 mL de caldo de preenriquecimiento N y P (100 mg K_2HPO_4 y 100 mg NH_4SO_4) con crudo al 1% ó ACPM al 1%. Los caldos de preenriquecimiento se incubaron a 35°C con agitación de 180 rpm durante siete días. Transcurrido este tiempo, se transfirió 1 mL de los caldos de preenriquecimiento a 9 mL de caldo MMS (Medio Mínimo de Sales) fresco que contenía: $Ca(NO_3)_2$ (60 mg/L), $NaHCO_3$ (125 mg/L), KNO_3 (70 mg/L), NH_4Cl (70 mg/L), KH_2PO_4 (100mg/L), $FeSO_4 \times 7H_2O$ (10 mg/L), $MnCl_2 \times H_2O$ (7 mg/L), $ZnSO_4$ (1.5 mg/L), crudo 1% v/v ó ACPM 1% v/v. Las sales empleadas para la preparación del medio fueron grado analítico. Se realizaron tres pases sucesivos a medio MMS fresco, cada siete días hasta completar un tiempo final de incubación de 21 días.

Finalizado el tiempo de incubación a partir de los tubos de caldo MMS se aislaron bacterias tolerantes a crudo y ACPM en agar nutritivo (Haines *et al.*, 1996; Rojas-Avelizapa *et al.*, 1999; Núñez, 2003). Las cepas aisladas se conservaron en el CBM del INVEMAR (4°C y -80°C) y en el Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes - CIMIC (-80°C) en medio MMS con glicerol.

Selección de cepas para ensayo de degradación

Con el fin de elegir microorganismos capaces de degradar hidrocarburos competitivamente, se efectuaron las pruebas de selección horizontal y Concentración

Mínima Inhibitoria (CMI). En la prueba de selección horizontal cada cepa se reactivó en caldo nutritivo (Merck) y se incubó a 35°C por 24 horas. Posteriormente cada cultivo se ajustó al tubo No.1 del patrón de Mac Farland (3×10^8 células/mL) y se sembró de forma masiva en agar MMS suplementado con 1% de PC y agar MMS suplementado con 1% de ACPM. Las cajas fueron incubadas a 35°C durante siete días. Este procedimiento de presión selectiva se realizó en tres rondas sucesivas; al cabo de la última ronda se observó la capacidad de las cepas para crecer en presencia de ambos contaminantes.

Los ensayos de CMI se realizaron por triplicado y se evaluó un rango de concentraciones del 1%, 2%, 4%, 6%, 8% y 10% de ACPM. En cada tubo de MMS con su concentración determinada de ACPM se inoculó una alícuota de 0.5 mL de la cepa a evaluar proveniente de un caldo nutritivo de 24 horas de crecimiento, ajustado al tubo No.1 del patrón de MacFarland. Los cultivos se incubaron a 35°C y se realizaron observaciones diarias por 21 días. Se estableció como tubos positivos aquellos que presentaron crecimiento por turbidez y disgregación del ACPM (Brown y Braddock, 1990; Haines *et al.*, 1996). Se consideró la CMI de ACPM como la concentración más baja de este compuesto, donde se presentó ausencia de crecimiento y disgregación del ACPM.

Las cepas escogidas en las prueba de selección horizontal y CMI se caracterizaron macroscópica y microscópicamente teniendo en cuenta la morfología bacteriana, coloración de Gram, tamaño, bordes, cromogénesis, elevación y consistencia (Gómez *et al.*, 2006). Las cepas se identificaron bioquímicamente mediante el sistema BBL Crystal y API 50 CHB/E (Biomérieux®).

Ensayos de degradación de ACPM

Los ensayos de degradación se evaluaron a partir de la actividad conjunta de las cepas seleccionadas. Inicialmente, cada cepa proveniente de las pruebas de selección se sembró en 125 mL de medio MMS suplementado con 2% v/v de ACPM. Los cultivos se incubaron por 24 horas a 30°C y 200 rpm (Agitador orbital BWR DS-500). Transcurridas 24 horas se realizó el recuento en cámara de Neubauer para determinar la concentración celular de los inóculos y conformar el cultivo bacteriano mixto, el cual estuvo conformado por cada cepa proveniente del inóculo en una concentración final de 10^5 células/mL (Palittapongarnpim *et al.*, 1998; Márquez *et al.*, 2001). El ensayo constó de un tratamiento y un control abiótico. En el tratamiento, la unidad experimental se conformó de medio MMS, ACPM al 2% v/v y el cultivo bacteriano mixto. El control abiótico lo conformó el medio MMS y ACPM al 2% v/v. Los cultivos se incubaron permanentemente a 30°C, con tiempos de agitación de 12 horas por día a 200 rpm; cada tratamiento se realizó por triplicado durante 21 días.

Determinaciones microbiológicas y químicas

Para las determinaciones microbiológicas, a partir de las botellas del tratamiento y el control abiótico se realizó el recuento de viables cada tres días por la técnica de dilución y recuento en placa de agar nutritivo (Palittapongarnpim *et al.*, 1998). Con los resultados obtenidos se elaboró la curva de crecimiento.

El análisis de hidrocarburos se realizó los días 0, 10 y 21 siguiendo los métodos de extracción y medición de hidrocarburos descritos por Garay *et al.* (2003). Las muestras se extrajeron con hexano y se fraccionaron por cromatografía en columna de alúmina (Tamaño de partícula: 0.108 – 0.200 mm). Para el fraccionamiento se utilizaron como eluyentes las siguientes soluciones: n-hexano para la recuperación de los hidrocarburos alifáticos (F1); n-hexano: diclorometano (7:3) para hidrocarburos mono-aromáticos (F2); y diclorometano para hidrocarburos poli-aromáticos (F3). En el análisis se empleó un cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas (GC/MSD) HP 6890/5973, equipado con una columna capilar HP5-MS de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y película de 0.25 μm . El cromatógrafo operó con las siguientes condiciones: programación de temperatura del horno desde 60 °C (1 min) hasta una temperatura final de 300 °C (8 min) a 8 °C/min, inyección Splitless (0.75 min) y temperatura del inyector 280 °C. Como gas de arrastre se utilizó helio a flujo constante de 1 mL/min. Los espectros de masa fueron adquiridos con un detector MSD (280 °C) en un ámbito de 35-450 unidades de masa atómica a 3.8 scan/s.

Porcentaje de degradación

El porcentaje de degradación del cultivo mixto se estableció por medio de la diferencia de los porcentajes de remoción del tratamiento con el cultivo bacteriano mixto y el control abiótico en el tiempo 0 y 21 (Palittapongarnmin *et al.*, 1998; Gómez, 2003). Los porcentajes de degradación de los alcanos ramificados persistentes, pristano y fitano, se emplearon como indicadores de transformación microbiana (Díaz *et al.*, 2000; Seklemova *et al.*, 2001; Wang y Fingas, 2003).

$$\% \text{ Remoción Hidrocarburos} = \left(\frac{\sum \text{Área Hcos Resueltos (Día 21)}}{\sum \text{Área Hcos Resueltos (Día 0)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Degradación} = \left(\left(\frac{\% \text{ Remoción}}{\text{Tratamiento}} \right) - \left(\frac{\% \text{ Remoción}}{\text{Control abiótico}} \right) \right) \quad (2)$$

Análisis estadístico

Se determinó la normalidad de los datos de remoción de hidrocarburos aromáticos mediante la prueba de Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas por medio del test de Bartlett. Cumplidos estos dos supuestos se realizó un análisis de varianza con un nivel de

significancia del 5% para determinar si existían diferencias entre los tratamientos bióticos y abióticos en la degradación de ACPM a través del tiempo de muestreo. Para la evaluación de los datos se empleó el programa computarizado Statistic versión 8. El comportamiento de la curva de crecimiento fue descrito con base a los promedios y desviación estándar de los recuentos microbianos diarios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de cepas para ensayos

A partir de los sedimentos recolectados en la región Caribe se aislaron 31 cepas bacterianas con capacidad de tolerar hidrocarburos del petróleo. Las cepas se aislaron en medio MMS con PC/ACPM y posteriormente se conservaron en el CBM del INVEMAR y en el CIMIC de la Universidad de los Andes. De 31 cepas aisladas se logró la recuperación viable de 26, de las cuales, 12 provenían de medio MMS con ACPM y 14 de medio MMS con PC. Con el grupo de 26 cepas se inició el proceso de selección horizontal.

Selección horizontal en petróleo crudo y ACPM

De las 14 cepas bacterianas aisladas de PC y evaluadas en ACPM se obtuvo que el 100% fueron capaces de crecer en ACPM, mientras que sólo el 66.7% de las 12 cepas aisladas de ACPM tuvieron capacidad de crecer en PC. En total, el 84.6% (22) de las 26 cepas evaluadas crecieron en las dos mezclas de hidrocarburos. Estos microorganismos se encontraron expuestos al contaminante en su ambiente natural y fueron cultivados en la etapa de aislamiento en presencia de hidrocarburos, lo cual posiblemente, favorece la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo y selección de individuos tolerantes al compuesto. El PC actúa como agente selectivo de microorganismos (Wrenn y Venoza, 1996), al presentar una mezcla compleja de hidrocarburos con mayor concentración de aromáticos de alto peso molecular que el ACPM (Wang *et al.*, 2001), compuestos tóxicos para algunos microorganismos y compuestos del tipo resinas y asfaltenos resistentes a la degradación (Venoza y Zhu, 2003).

De igual forma, el PC induce la selección de microorganismos con capacidades metabólicas para degradar productos refinados del petróleo, como el ACPM, ya que se involucran genes, complejos enzimáticos y vías metabólicas relacionadas. Este proceso es conocido como “aclimatación cruzada” y ha sido registrado por Leahy y Colwell (1990) y Álvarez y Vogel (1991). La capacidad de un microorganismo para asimilar diferentes mezclas de hidrocarburos como fuentes de carbono depende de la especificidad de sus enzimas. Algunas monooxigenasas, dioxigenasas y lipooxigenasas tienen el potencial para convertir el petróleo y sus derivados en enantiómeros que puedan ser asimilados, ampliándose de esta

forma el ámbito de sustratos disponibles para el metabolismo (Mahajan *et al.*, 1994; Smits *et al.*, 2002; Van Hamme *et al.*, 2003).

Concentración Mínima Inhibitoria

Las cepas bacterianas (22), provenientes de la selección horizontal, se enfrentaron a concentraciones de ACPM entre 1-10% v/v. Una concentración mínima del 2% de ACPM inhibió el 50% de la población evaluada, mientras que el 50% de las cepas restantes toleraron un ámbito de 1%-8% v/v de ACPM, para un total de 11 cepas seleccionadas en esta fase. Los microorganismos que toleraron elevadas concentraciones de hidrocarburos, posiblemente han desarrollado mecanismos que les permiten mantener la integridad de su membrana ante un flujo excesivo de hidrocarburos, tales como el incremento en la rigidez de la membrana por descenso en el contenido de ácidos grasos insaturados, alteración en la conformación cis/trans de los fosfolípidos y sistemas de exclusión homólogos a los empleados por las bacterias en la resistencia a antibióticos (Ramos *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2001). Los hidrocarburos son compuestos lipofílicos que en elevadas concentraciones inhiben el desarrollo microbiano, producen intoxicación (LaGrega *et al.*, 1996) e inducen en las bacterias una respuesta de “stress” y cambios celulares a nivel de la membrana, enzimas y proteínas (Sikkema *et al.*, 1995).

Caracterización e identificación microbiana

Las 11 cepas seleccionadas en las pruebas descritas anteriormente presentaron morfologías bacilares, ocho gram negativas y tres gram positivas, de las cuales ocho se identificaron dentro de la base de datos del BBL crystal y API 50 CHB/E como *Klebsiella* sp., *Chromobacterium* sp., *Flavimonas orizihabitans*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus brevis*, *B. pumillus* y *B. cereus*. *Klebsiella* sp. (Survery *et al.*, 2004), *F. orizihabitans* (Lanfraconi *et al.*, 2003; Van Hamme *et al.*, 2003), *E. cloacae* (Saadoun, 2002) y *Bacillus* spp. (Díaz *et al.*, 2000; Kazunga y Aitken, 2002; Márquez-Rocha *et al.*, 2005) han sido aisladas frecuentemente de suelos contaminados con compuestos petrogénicos, los cuales utilizan como única fuente de carbono y energía. De igual manera ha sido registrado por otros autores el aislamiento de estas especies en ambiente marinos (Roy *et al.*, 2002; Kawakami y Nishimura, 2006). *Pseudomonas* es el género que con mayor frecuencia se aísla de ambientes contaminados con hidrocarburos (Norman *et al.*, 2002) y de la cual mayor información ha sido registrada; se conoce su capacidad para crecer sobre una amplia variedad de hidrocarburos del petróleo como benceno, naftaleno, tolueno (Haigler *et al.*, 1992), gasolina, kerosene y diesel (Wongsa *et al.*, 2004). También se han estudiado los complejos enzimáticos y los plásmidos relacionados en la asimilación y degradación del contaminante relacionado (Hamamura *et al.*, 2001; Smits *et al.*, 2002). En

su gran mayoría las bacterias degradadoras de hidrocarburos se encuentran en el grupo de gram negativas (Ruberto *et al.*, 2003), los lipopolisacáridos presentes en sus membranas ayudan a la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos en sistemas acuosos y contribuyen al incremento en la superficie de ataque sobre el contaminante, para su posterior asimilación (Sikkema *et al.*, 1995).

Ensayos de degradación del ACPM

Finalizado el período de incubación de los ensayos de degradación de ACPM se evidenció una disminución total de alifáticos en términos de *n*-alcanos del 92.15%, donde el cultivo bacteriano degradó el 68.61 % y por factores abióticos se removió el 23.54% (Tabla 1). En la figura 2 se muestra el perfil cromatográfico de masas del ACPM de los días cero y 21 del tratamiento y en la figura 3 se muestra el comportamiento individual de los *n*-alcanos en el tratamiento y el control abiótico de los días cero y 21 en términos de abundancia relativa, por lo cual la abundancia de cada compuesto se encuentra comparada y manifestada en relación con C-15, que fue el alcano más abundante en el día cero del ensayo (Abundancia relativa/C-15), de acuerdo con Guyomarch (2002). En ambas figuras

Tabla 1. Porcentaje de remoción y degradación de hidrocarburos alifáticos del ACPM por factores bióticos y abióticos.

Parámetros	Ensayos	% Remoción		% Degradación	
		Día 10	Día 21	Día 10	Día 21
Cultivo bacteriano mixto (Factor biótico)		31.28	92.15	9.42	68.61
Control abiótico		21.85	23.54	-----	-----

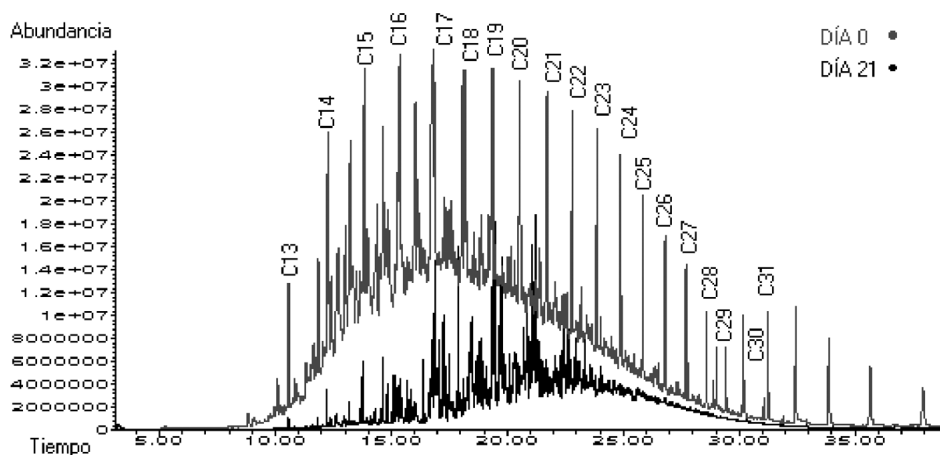


Figura 2. Perfiles cromatográficos de los días 0 y 21 de los *n*-alcanos del ACPM.

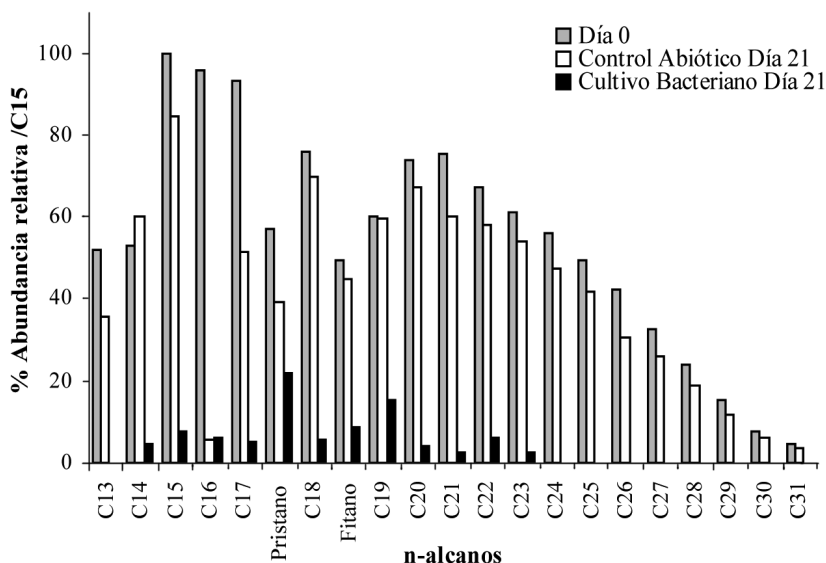


Figura 3. Abundancia relativa de los *n*-alcanos en relación con C-15 durante los 21 días de exposición del ensayo.

se observa la remoción de los alcanos de cadena larga (C_{12} - C_{31}), con porcentajes de degradación entre 75%- 85% por acción microbiana, mientras que los alcanos menores a doce átomos de carbono no fueron detectados en las muestras. Diferentes autores han señalado que los alifáticos de cadena corta, se volatilizan en las primeras horas después de un derrame y por sus propiedades tienden a ser tóxicos para las bacterias (Cookson, 1995; Solano *et al.*, 2000).

El pristano y fitano, alcanos ramificados más resistentes a la degradación que los *n*-alcanos y empleados como indicadores de transformación biológica, fueron degradados en 30% y 73.8% respectivamente (Figura 3). En algunos casos, se ha registrado la no degradación de estos compuestos o valores inferiores a los hallados en este ensayo (Sharma y Pant, 2000; Ghazali *et al.*, 2004; Penet *et al.*, 2004).

Finalizado el ensayo no se observaron diferencias significativas en la remoción de hidrocarburos aromáticos (mono y poliaromáticos) entre el control abiótico (3.6%) y el tratamiento con bacterias (3.5%), obteniendo valores no relevantes de biodegradación (datos no mostrados). Resultados similares fueron obtenidos por Ruberto *et al.* (2003), quienes encontraron diferencias significativas en la degradación de aromáticos entre el control abiótico y el tratamiento sólo 20 días después de haber iniciado el ensayo, sugiriendo que las pérdidas por factores abióticos solapan el metabolismo microbiano y se hace necesario prolongar el tiempo de las mediciones para su detección.

El ACPM está compuesto de alcanos lineales, ramificados, hidrocarburos aromáticos de dos y tres anillos en su mayoría y pocos hidrocarburos aromáticos de alto peso molecular (Wang *et al.*, 2001). Los hidrocarburos aromáticos no disminuyeron significativamente posiblemente debido a las altas concentraciones de alifáticos, que son preferidos por las bacterias para su metabolismo y son fácilmente degradables, aún cuando se ha encontrado que algunos aromáticos de bajo peso molecular son metabolizados antes que muchos compuestos saturados (Venoza y Zhu, 2003).

Determinaciones microbiológicas

El comportamiento exhibido por el cultivo bacteriano mixto en la curva de crecimiento mostró una etapa de crecimiento exponencial entre los días cero y seis, con valores promedio de 2.98×10^6 y 1.33×10^9 UFC/mL respectivamente, seguido de un descenso poblacional en el día nueve y continuo ascenso en el día doce, punto donde inicia una etapa de declive que se extiende hasta el día 21, obteniendo un valor final de 1.29×10^8 UFC/mL. Se determinó que la población logró su máximo crecimiento durante los días seis y doce con valores de 1.33×10^9 UFC/ml y 3.13×10^9 UFC/ml, lo cual se correlacionó con la disminución de hidrocarburos alifáticos que las cepas emplearon como fuentes de carbono y energía (Figura 4).

Los valores poblacionales alcanzados obedecen a una oferta elevada de sustratos. El diesel o ACPM es una fuente rica de hidrocarburos alifáticos y estos son más susceptibles al ataque microbiano, seguidos por los hidrocarburos ramificados, aromáticos de bajo peso

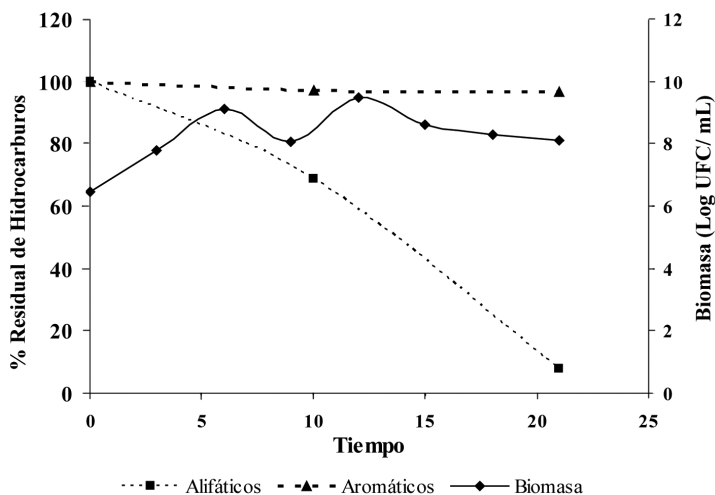


Figura 4. Curva de crecimiento del cultivo bacteriano mixto y porcentaje residual de hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

molecular, y por último los aromáticos de alto peso molecular y cicloalcanos (Leahy y Colwell, 1990; Plohl y Leskovsek, 2002).

La curva de crecimiento del cultivo mixto mostró un descenso poblacional en los días 10 y 15, éstos cambios se llevaron a cabo como producto de las sucesiones bacterianas al interior del cultivo mixto, posiblemente cada cepa tuvo un papel fundamental en la transformación de los hidrocarburos, ya que generan compuestos intermediarios que pueden subsecuentemente ser empleados por otros microorganismos o beneficiar a otras cepas por remoción de compuestos tóxicos, estableciendo entre ellas relaciones sinérgicas que generan un proceso de degradación mayor (Venoza y Zhu, 2003; Ghazali *et al.*, 2004). Kaplan y Kitts (2004) asocian los descensos poblacionales con cambios en las fases de degradación rápida-lenta donde se presenta cambios en la dominancia y diversidad de determinadas especies, lo cual esta influido a su vez por la disponibilidad o no de un sustrato.

Las cepas seleccionadas en el cultivo mixto poseen capacidades metabólicas para tolerar altas concentraciones de hidrocarburos, asimilar y degradar los mismos. Estas características son el punto de partida para la investigación del metabolismo y de las interacciones microbianas intraespecíficas que se generan al interior del cultivo mixto, con el fin de conformar un consorcio microbiano de efectiva aplicación en campo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue posible gracias al apoyo logístico y financiero del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR), al Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes (CIMIC), en especial a la Dra. Jenny Dussán y al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (COLCIENCIAS). Un especial agradecimiento a todas la personas del programa Calidad Ambiental Marina por su constante apoyo logístico e intelectual y en forma general al todo el personal del Instituto.

BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, P. y T. Voguez. 1991. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture Aquifer Slurries. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 2981-2985.
- Brown, E. y J. Braddock. 1990. Sheen screen, a miniaturized most-probable-number method for enumeration of oil-degrading microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3895-3896.
- Castro, L., M. Perdomo y J. Benavides. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA*, 2(2): 39-49.

- Christon, J., G. Hurst y R. Knudeen. 1997. Manual of environmental microbiology. American Society for Microbiology. ASM Press., Washington. 1138 p.
- Cookson, J. 1995. Bioremediation engineering: Design and application. Mc Graw Hill INC, Nueva York. 524 p.
- Díaz, M., S. Grigson, C. Pepita y G. Burgués. 2000. Isolation and characterization of novel hydrocarbon-degradin euryhaline consortia from crude oil and mangrove sediments. *Mar. Biotechnol.*, 2: 522-532.
- Garay, J., G. Ramírez, J. Betancourt, B. Marín, B. Cadavid, L. Panizzo, L. Lesmes, J. Sánchez, H. Lozano y A. Franco. 2003. Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos: aguas, sedimentos y organismos. INVEMAR, Santa Marta. 177 p.
- Ghazali, F., R. Salfá, A. Sallehi y M. Basri. 2004. Biodegradation in soil by microbial consortium. *Internat. Biodeter. Biodegr.*, 54: 61-67.
- Gómez, M. 2003. Selección de un consorcio bacteriano aeróbico de la Ciénaga Grande de Santa Marta con capacidad degradadora del plaguicida organoclorado (aldrín). Tesis M.Sc. en Microbiol., Univ. Nacional de Colombia, Santa Marta. 121 p.
- Gómez, M., L. Vivas, R. Ruíz, V. Reyes y C. Hurtado. 2006. Bacterias marinas nativas degradadoras de compuestos orgánicos persistentes en Colombia. INVEMAR, Santa Marta. 32 p.
- Guyomarch, J. 2002. Identification du fuel du Prestige. Selon les protocoles et recommandations du groupe de travail européen CEN BT / TF 120 oil identification. Rapport No. GC. 02-15. CEDRE. Brest cedex-Francia. 22 p.
- Haigler, B., C. Pettigrew y J. Spain. 1992. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas sp.* strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2237-2244.
- Haines, J., B. Wrenn, E. Holder, K. Strohmeir, R. Herrington y A. Venosa. 1996. Measurement of hydrocarbon-degradating microbial populations by a 96-well plate most-number procedure. *J. Ind. Microbiol.*, 16: 36-41.
- Hamamura, N., C. Yeager y D. Arp. 2001. Two distinct monooxygenases for alkane oxidation in *Nocardioides sp.* Strain CF8. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 4992-4998.
- INVEMAR. 2001. Informe del estado de los ambientes marinos y costeros en Colombia: 2000. INVEMAR, Santa Marta. 138 p.
- Kaplan, C., y C. Kitts. 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70 (3): 1777-1786.
- Kawakami, Y. y H. Nishimura. 2006. Degradation of lubricating oils by marine bacteria observed by quantitative mass spectrometry. *J. Ocean.*, 37 (1): 1-7.
- Kazunga, C. y M. Aitken. 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1917-1922.
- LaGrega, M., P. Buckingham y J. Evans. 1996. Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Vol. I y II. McGraw-Hill, Nueva York. 1316 p.
- Lanfranconi, M., H. Álvarez y C. Studdert. 2003. A strain isolated from gas oil-contaminated soil displays chemotaxis towards gas oil and hexadecane. *Environ. Microbiol.*, 5: 1002-1008.
- Leahy, J. y R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.*, 54 (3): 305-315.

- Mahajan, M., P. Phale y C. Vaidyanathan. 1994. Evidence for the involvement of multiple pathways in the biodegradation of 1- and 2-methylnaphthalene by *Pseudomonas putida* CSV86. Arch. Microbiol., 161: 425-433.
- Marín, B., J. Garay, G. Ramírez, J. Betancourt, W. Troncoso, M. Gómez, J. Sánchez, B. Cadavid, J. Acosta, J. Vivas, M. Casas, P. Lozano y L. Arias. 2004. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la conservación de ambientes marinos y costeros de Colombia. INVEMAR, Santa Marta. 298 p.
- Márquez, F., V. Hernández y T. Lamela. 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. Water Air Soil Pollut., 128: 313-320.
- Márquez-Rocha, F., J. Olmos, M. Rosano y M. Muriel. 2005. Determination of the hydrocarbon-degrading metabolic capabilities of tropical bacterial isolates. Int. Biodeterior. Biodegrad., 55: 13-23.
- Norman, R., R. Frontera-Suau y P. Morris. 2002. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. Appl. Environ. Microbiol., 68: 5096-5103.
- Núñez, R. 2003. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis de doctorado. Universidad de la Habana, La Habana. 65 p.
- Palittapongarnpim, M., L. Pokethitiyook, E. Suchart. y M. Tangbanluekal. 1998. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. Biodegradation, 9: 83-90.
- Penet, S., R. Marchal, A. Sghir y F. Monot. 2004. Biodegradation of hydrocarbon cuts for diesel oil formulation. Appl. Environ. Microbiol., 66: 40-47.
- Plohl, K. y H. Leskovsek. 2002. Biological degradation of motor oil water. Acta Chim. Slov., 49: 279-289.
- Posada, B., B. Marín, W. Troncoso, L. Vivas y M. Gómez. 2005. Estado del medio ambiente abiótico. 11-68. En: INVEMAR. Informe del estado de los ambientes marinos y costeros en Colombia. INVEMAR, Santa Marta. 360 p.
- Ramos, J., E. Duque, J. Rodríguez-Herva, P. Godoy, A. Haïdour, F. Reyest. y A. Fernández. 1997. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. J. Biol. Chem., 272: 3887-3890.
- Rojas, A., E. Duque, G. Mosqueda, G. Golden, A. Hurtado, J. Ramos y A. Segura. 2001. Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. J. Bacteriol., 183: 3967-3973.
- Rojas-Avelizapa, N., R. Rodríguez, E. Villanueva, J. Martínez y H. Poggi. 1999. Transformer oil degradation by an indigenous microflora isolated from a contaminated soil. Resour. Conserv. Recycl., 27: 15-26.
- Roy, S., H. Dipak., D. Biswas y R. Kumar. 2002. Survey of petroleum-degrading bacteria in coastal waters of Sunderban Biosphere Reserve. World J. Microbiol. Biotechnol., 18 (6): 575-581.
- Ruberto, L., S. Vázquez y W. Mac Cormack. 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora. Biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. Internat. Biodeter. Biodegr., 52: 115-125.
- Saadoun, I. 2002. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. J. Basic Microbiol., 42: 422-430.
- Salamanca-Pinzón, S. 1999. Degradación de hidrocarburos por bacterias aisladas de la Bahía de Cartagena. Tesis Microbiol. Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

- Seklemova, E., A. Pavlova y K. Kovacheva. 2001. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*, 12: 311-316.
- Sharma, S. y A. Pant. 2000. Biodegradation and conversión of alkanes and crude oil by marine *Rhodococcus* sp. *Biodegradation*, 11: 289-294.
- Shanidul, I. y M. Tanaka. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries approach for management: a review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.*, 48: 624-649.
- Sikkema, J., J. Bont y B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59 (2): 201-222.
- Smits, T., S. Balada, B. Witholt y J. Beilen. 2002. Functional analysis of alkane hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.*, 184: 1733-1742.
- Solano, F., R. Marchal, S. Casarégola, C. Vasnier, J. Lebeault y J. Vandecasteele. 2000. A mycobacterium strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (6): 2392-2399.
- Survery, S., S. Ahmad, S. Subhan, M. Ajaz y S. Ajaz-Rasool. 2004. Hydrocarbon degrading bacteria from Pakistani soil: Isolation, identification, screening and genetical studies. *Pakistan J. Biol. Sci.*, 7: 1518-1522.
- Swannell, R., K. Lee y M. McDonagh. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.*, 60 (2): 342-365.
- Vallejo, V., L. Salgado y F. Roldán. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Rev. Col. Biotec.*, 2 (2): 67-78.
- Van Hamme, J., A. Singh y O. Ward. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67: 503-549.
- Venosa, A. y X. Zhu. 2003. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Sci. Technol. Bull.*, 8: 163-178.
- Wang, Z. y M. Fingas. 2003. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Mar. Pollut. Bull.*, 47: 423-52.
- Wang, Z., M. Fingas y L. Sigouin. 2001. Characterization and identification of a "mystery" oil spil from Québec (1999). *J. Chromatogr.*, 909: 155-169.
- Wongsa, P., M. Tanaka, A. Ueno, M. Hasanuzzaman, I. Yumoto y H. Okuyama. 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Curr. Microbiol.*, 49: 415-422.
- Wrenn, B. y A. Venosa. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon degrading bacteria by a most-probable-number method. *Can. J. Microbiol.*, 42: 252-258.

FECHA DE RECEPCIÓN: 02/09/05

FECHA DE ACEPTACIÓN: 10/04/08



