

Estudio y selección de bacterias aerobias degradadoras de hidrocarburos del petróleo aisladas de costas de Cuba

✉ Yaima Barrios-San Martín, Silvia Acosta, Ayixon Sánchez, Antonio Toledo, Francisca González, Regla M García

Laboratorio de Química y Biotecnología, Centro de Investigaciones del Petróleo, Ceinpet
Churruca #481, Cerro, CP 12 600, La Habana, Cuba
E-mail: yy@ceinpet.cupet.cu

INVESTIGACIÓN

RESUMEN

El aislamiento de bacterias marinas aerobias como posibles degradadoras de hidrocarburos, es una variante muy prometedora para la descontaminación de mares y costas. Se recogieron doce muestras de agua y de agua con sedimentos de las costas de Felton (Holguín, Cuba). Se empleó el medio Bushnell-Haas con petróleo crudo ligero y, alternativamente, agua de mar suplementada con extracto de levadura y petróleo crudo, como fuentes de carbono. Se obtuvieron 33 cepas bacterianas, que se sometieron a un proceso de selección en el medio Bushnell-Haas suplementado con crudo pesado, de las que se seleccionaron tres porque degradaban los hidrocarburos en siete días. Su capacidad de degradación se evaluó a escala de laboratorio. La remoción de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) se determinó mediante el análisis de los saturados, los aromáticos, las resinas y los asfaltenos. Los análisis de las fracciones saturadas y las aromáticas fueron mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama y espectroscopia infrarroja, respectivamente. Las tres cepas seleccionadas removieron más del 60% de los HTP. Una de ellas mostró valores de remoción superiores al 65% en todas las fracciones, excepto en las resinas; mientras que dos de ellas disminuyeron las tasas de C17/pristano y C18/fitano a menos del 50% con respecto al control abiótico. Dos de las cepas se identificaron fenotípicamente como del género *Bacillus*, y otra como del género *Alcaligenes*. Las potencialidades biodegradadoras de estos microorganismos en la limpieza de costas marinas han generado nuevos estudios.

Palabras clave: bacterias marinas, biodegradación de hidrocarburos, Felton

Biotecnología Aplicada 2012;29:73-79

ABSTRACT

Study and isolation of aerobic hydrocarbon-degrading bacteria from a shoreline in Cuba. Microorganisms have been widely studied as hydrocarbon-degrading entities; the isolation of bacteria from the sea having such degrading properties is a very promising way for the decontamination of seas and shores. Twelve samples of water and sediments of Felton shoreline in the Province of Holguín, were collected in the present work. A first screening using a Bushnell-Haas medium with light crude oil, and alternatively in sea water supplemented with yeast extract and crude oil as a carbon source rendered twenty seven and six bacteria isolates, respectively. These isolates were subsequently selected in a Bushnell-Haas medium but supplemented with a heavy crude oil, resulting in a total of three strains as the best degraders in a seven days period. Pure cultures of these strains were further used in crude oil biodegradability assays. The total petroleum hydrocarbon (TPH) degradation was evaluated using SARA analysis whilst aliphatic and aromatic hydrocarbon studies were carried out using gas chromatography with FID detector, and infrared spectroscopy, respectively. All three stains removed more than 60% of the TPH and one of them showed the best degradation potential with figures above 65% for the entire hydrocarbon fraction, except resins. Two of the strains were also able to decrease C17:Pr and C18:Ph ratios to less than 50% in comparison to the abiotic control. Two of the strains were phenotypically identified as *Bacillus* sp. and one as *Alcaligenes* sp. New studies have been generated in this direction by the biodegradation potentials of these microorganisms for the decontamination of seashores.

Keywords: marine bacteria, biodegradation of hydrocarbons, Felton

Introducción

Muchos microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza utilizan hidrocarburos como única fuente de carbono. Sin embargo, se localizan en bajas concentraciones en áreas no contaminadas, y se incrementan en ambientes sometidos a impactos crónicos de contaminantes [1]. Los microorganismos anaerobios se adaptan menos a la presencia de sustratos y metales pesados, por lo que su efecto de biodegradación es limitada [2]. De los organismos vivos que se usan en tecnologías de biorremediación, las bacterias heterótrofas aerobias son el grupo más estudiado por los investigadores, por su variedad de géneros y especies, y la diversidad de organismos que metabolizan: entre ellos, los compuestos xenobióticos como

fente de carbono en cultivos puros [3]. Sin embargo, no siempre una bacteria posee las características enzimáticas necesarias para degradar uno o varios compuestos orgánicos contaminantes del ecosistema. Las poblaciones mixtas o consorcios microbianos tienen más potencialidades biodegradadoras porque la información genética que codifica su sistema enzimático es más completa y, por tanto, es más probable la degradación de las mezclas complejas de hidrocarburos en un área dañada [4, 5].

Ante desastres que han ocasionado grandes mareas negras, como la colisión del buque *Exxon Valdez* con los arrecifes de Prince William Sound, que causó el derrame de alrededor de 50 000 toneladas de petróleo

1. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock, biología de los microorganismos. 10 ed. Revised. Madrid: Prentice Hall, Iberia; 2004.

2. Pollard SJT, Hrudye SE, Fedorak PM. Bioremediation of petroleum-and creosote-contaminated soils: a review of constraints. Waste Manage Res. 1994; 12(2):173-94.

3. Abalos A, Vinas M, Sabate J, Manresa MA, Solanas AM. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Biodegradation. 2004;15(4): 249-60.

crudo, en marzo de 1989 [6], y el hundimiento del *Prestige*, tras el cual 63 000 toneladas de petróleo crudo afectaron 1900 km de costas españolas y francesas, en noviembre de 2002, se aplicaron técnicas de biotecnología ambiental [7].

En la primera ocasión, se adicionaron nutrientes mediante fertilizantes (Inipol EAP 22 y Custombler), que incrementaron la remoción del petróleo crudo tres veces con respecto a la remoción natural [6]. Tras el segundo accidente, los primeros estudios de laboratorio para determinar la biodegradabilidad en la playa Sorrizo (Coruña, España), con el propósito de aplicar la bioestimulación y la bioaumentación, mostraron un alto potencial de degradación de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP): entre 6 y 45% después de siete días. Adicionalmente los cultivos enriquecidos con microorganismos autóctonos y petróleo del *Prestige* como única fuente de carbono y energía, degradaron cerca del 90% de los HTP en dos semanas [7]. Teniendo en cuenta estas y otras referencias, se desarrolló una investigación con el objetivo de aislar, seleccionar e identificar las bacterias aerobias de las costas de Felton (Holguín, Cuba), impactadas por hidrocarburos; y caracterizar las cepas seleccionadas atendiendo a su potencialidad de degradación de hidrocarburos.

Materiales y métodos

Muestreo

El ecosistema marino de Felton está contaminado por el vertimiento de hidrocarburos (Figura 1). De forma manual, se recogieron 12 muestras de este ambiente: cuatro de agua y ocho de agua con sedimentos, y se envasaron en frascos estériles de 1 L. Se conservaron a 4 °C y se trasladaron al laboratorio para su procesamiento antes de que transcurriesen 24 h.

Aislamiento

En el proceso de selección primaria se emplearon dos protocolos de discriminación, denominados A (modificado de [8]) y B (modificado de [9]). En el protocolo A: las muestras se agitaron a 350 rpm durante 5 min. De cada una se tomó 1 mL, que se sembró en 9 mL del medio Bushnell-Haas [10], con crudo Mesa 30 (agua

y sedimentos al 0.5% v/v, azufre total al 0.90% m/m, densidad a 15 °C 0.8735 g/cm³, densidad 30° API) al 1%, como única fuente de carbono (cada muestra se replicó cinco veces). Las muestras se incubaron durante 21 días de forma estática, entre 26 y 28 °C. Concluido el periodo de incubación se sembró 0.1 mL de cada cultivo en el medio para el aislamiento de bacterias marinas (10.0 g de glucosa, 0.5 g de peptona, 1.0 g de extracto de levadura, 15.0 g de agar, 750 mL de agua de mar, 250 mL de agua destilada), mediante la técnica de esparcimiento con espátula de Drigalsky (cada muestra se replicó tres veces). Las placas se incubaron entre 26 y 28 °C durante siete días. En el protocolo B: las muestras se agitaron a 350 rpm durante 5 min. Se colocaron 100 mL de cada una en un frasco estéril con tapa de rosca, con capacidad para 250 mL, al que se adicionaron 6 mL del crudo Mesa 30 y 0.1 g de extracto de levadura. Se incubaron en agitación durante siete días, a 130 rpm y 30 °C. Transcurrido este periodo, se tomaron 10 mL del cultivo obtenido y se inocularon en 100 mL de agua de mar estéril con 6 mL del crudo Mesa 30 y 0.1 g de extracto de levadura, que se incubaron durante siete días más, en iguales condiciones. Este proceso se repitió una vez más. Transcurrido el tiempo de incubación, se sembró 0.1 mL de cada cultivo obtenido, en el medio de aislamiento marino, utilizando la técnica de esparcimiento con espátula de Drigalsky. Cada muestra se replicó tres veces. Las placas se incubaron entre 26 y 28 °C durante siete días.

A partir de las 24 h del cultivo en el medio de aislamiento para bacterias marinas, se observaron al microscopio estereoscópico, y se procedió al aislamiento mediante la siembra por agotamiento de las colonias observadas. Este proceso se repitió mientras aparecieron nuevas colonias durante los siete días que duró la incubación. Las cepas se purificaron mediante la siembra por agotamiento, y la pureza se comprobó por su homogeneidad en la tinción de Gram y por las características del cultivo.

Caracterización fenotípica de las cepas

Las cepas se caracterizaron fenotípicamente mediante pruebas morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, siguiendo procedimientos descritos antes [11-14].

4. Nápoles J. Ensayos de tratabilidad en suelos contaminados con petróleo [dissertation]. Santiago de Cuba: Universidad de Oriente; 2005.

5. Vinas M, Sabate J, Espuny MJ, Solanas AM. Bacterial community dynamics and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation during bioremediation of heavily creosote-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(11):7008-18.

6. Swannell RP, Lee K, McDonagh M. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol Rev.* 1996;60(2):342-65.

7. Fernandez-Alvarez P, Vila J, Garrido-Fernandez JM, Grifoll M, Lema JM. Trials of bioremediation on a beach affected by the heavy oil spill of the *Prestige*. *J Hazard Mater.* 2006;137(3):1523-31.

8. Bushnell LD, Haas HF. The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *J Bacteriol.* 1941;41(5):653-73.

9. Baumann L, Baumann P, Mandel M, Allen RD. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. *J Bacteriol.* 1972;110(1):402-29.

10. Rivera-Cruz MC, Ferrera-Cerrato R, Volke V, Rodríguez R, Fernández L. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoam.* 2002;20(4):423-34.

11. Chablé de la Cruz G, García F, Madrigal EO. Evaluación de la respuesta de los microorganismos presentes en un derrame de hidrocarburos [Internet]. 2004 [cited 2009 Oct 29]. Available from <http://www.biologia-en-internet.com>

12. Oliver J. Taxonomic scheme for the identification of marine bacteria. *Deep-sea Res.* 1982;29(6):795-8.

13. Martínez J, Romay Z, Rojas T, Guerra G. Manual práctico de Microbiología. La Habana: Pueblo y Educación; 1985.

14. Pellón F, Orozco R, León J. Bacterias marinas con capacidad antimicrobiana aisladas de moluscos bivalvos en cultivos. *Rev Per Biol.* 2001 [cited 2010 Apr 14];8(2):[about 10 p.]. Available from: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/biologia/v08_n2/bacte_marinas.htm



Figura 1. Contaminación en el ecosistema marino de Felton por vertimiento de hidrocarburos. A) Angostura, Felton (Holguín). B) Ensenada de Palmarito (Holguín).

En la descripción de las características del cultivo se tuvieron en cuenta criterios definidos previamente [13]. La descripción morfológica se basó en la forma bacteriana, la movilidad y la pigmentación.

Las características térmicas se evaluaron teniendo en cuenta el crecimiento de cada cepa a distintas temperaturas, sembradas en el medio de aislamiento para bacterias marinas e incubadas a las siguientes temperaturas: 4, 22, 30 y 46 °C, durante 7 días. El requerimiento salino se determinó según la tolerancia de las cepas a distintas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl). Las cepas se cultivaron en el medio de aislamiento para bacterias marinas, donde se sustituyó el agua de mar por agua destilada, variando el porcentaje de NaCl en el medio, a las concentraciones de 0, 0.5, 1, 3, 5, 7 y 10%. Los cultivos se incubaron a 22 °C durante 48 h, y luego se registró la presencia o la ausencia de desarrollo bacteriano en la placa. Estos se descartaron a los 15 días de incubación.

Para la caracterización bioquímica se tuvieron en cuenta las cualidades de las cepas para fermentar glucosa, lactosa, sacarosa y manitol; y para producir indol, gas y sulfuro de hidrógeno. Se determinó la presencia de las enzimas: catalasa, oxidasa, ureasa, gelatinasa, amilasa, hemolisina; y la capacidad de crecimiento en citrato de Simmons, en el medio McConkey, en el medio CromoCen® CC y en la base del medio CromoCen® AGN (Centro de Biopreparados, Biocen, Cuba). A los medios de cultivo específicos se les adicionó NaCl al 2%.

Selección

Las cepas se agruparon teniendo en cuenta que coincidieran los criterios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos para su cultivo coincidieran al 100%. Se prepararon inóculos de cada una de las cepas seleccionadas. Para ello se tomó una asada de un cultivo joven y se diluyó en 5 mL de agua de mar estéril hasta lograr una concentración aproximada de 1×10^6 ufc/mL, según la escala de McFarland. Se sembró 0.1 mL del inóculo en el medio Bushnell-Haas al que se le agregó agar con el crudo Mesa 30 al 1%, como única fuente de carbono, y con cloruro de trifetil tetrazolium (TTC) como indicador de crecimiento. Se incubó a una temperatura y humedad relativa ambiente, durante 21 días (de cada cepa se sembraron tres réplicas). Cada 24 h se observaron los cultivos y se seleccionaron las cepas con un crecimiento abundante antes de los siete días.

Capacidad de degradación de hidrocarburos

Preparación del inóculo

Las cepas seleccionadas se transfirieron a un medio con agar triptona soya (ATS) suplementado con 2% de NaCl en una placa, y se incubaron a 30 °C durante 24 h. Se transfirieron asadas de cada cepa a 15 mL de agua de mar estéril y se homogenizaron en vórtex hasta alcanzar una concentración de 10^6 ufc/mL, según la escala de McFarland. Esta se comprobó mediante diluciones seriadas, y sembrando en placa por el método de Track Dilution. La solución constituyó el inóculo.

Condiciones de cultivo

El inóculo al 10% (v/v) se agregó en el medio Bushnell-Haas (88% v/v) con crudo Mesa 30 (2% v/v), como

única fuente de carbono, para un volumen final de 150 mL. Los cultivos se incubaron a 30 °C durante 45 días. Como control abiótico, se empleó un medio de cultivo y crudo sin inocular. Cada cepa se ensayó por triplicado.

Determinación de hidrocarburos

El análisis de los hidrocarburos se efectuó a los 45 días. La fase orgánica de las muestras se extrajo con 45 mL de diclorometano grado HPLC (tres extracciones de 15 mL cada una), mediante el método de extracción líquido-líquido durante 30 min en embudo de vidrio con llave y tapa de vidrio. El extracto orgánico se filtró a través de sulfato de sodio anhidro (grado reactivo). Se realizó un análisis de los saturados, los aromáticos, las resinas y los asfaltenos (SARA), según las normas ASTM D2007 y ASTM D2549. La precipitación de asfaltenos se realizó con n-pentano.

La fracción de hidrocarburos saturados disuelta en n-hexano se analizó en un cromatógrafo gaseoso Philips PU 4400 (Philips Scientific, Reino Unido), con un detector de ionización de llama (FID) y columna capilar de CP SIL 5CB de 30 m de longitud x 25 mm de diámetro interior, con las siguientes condiciones cromatográficas: temperatura del inyector: 300 °C, temperatura del detector: 320 °C, gradiente de la columna: de 60 a 300 °C (6 °C/min).

Las fracciones de los hidrocarburos monoaromáticos y poliaromáticos se analizaron por espectroscopía FTIR en un espectrofotómetro Mattson (PYE UNICAM, Reino Unido), utilizando la técnica de película entre ventana de NaCl. El procesamiento de los espectros fue mediante el software Omnic, Versión 5.2A.

Resultados y discusión

Aislamiento

La selección de los sitios de muestreo en Felton garantizó que la biota aislada estuviera en presencia del contaminante (hidrocarburos) en su ambiente natural. Tal presencia en los protocolos de aislamiento A y B permitió el crecimiento de 33 cepas que podían degradarlo. Estas se cultivaron en presencia de hidrocarburos (crudo Mesa 30), que favoreció la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo y el aislamiento de clones tolerantes a estos compuestos.

Caracterización fenotípica de las cepas aisladas

Sobre la base de los resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas, se identificaron 28 de 33 cepas (85%) hasta género. Aun cuando existen algunos esquemas taxonómicos para identificar los microorganismos aislados de ecosistemas marinos [12, 15], se han clasificado nuevos géneros y especies en el ambiente marino [16], que solamente pueden identificarse mediante métodos moleculares. Por este motivo, se presentan los resultados de la identificación de género.

Se identificaron dos géneros de bacilos grampositivos: *Bacillus* y *Kurthia*; y cinco géneros de bacilos gramnegativos: *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Marinomonas*, *Pseudomonas* y *Azotobacter*. No se pudieron identificar cinco cepas de los últimos bacilos mediante las pruebas bioquímicas de este estudio.

El género más abundante fue *Bacillus*, 14 de 33 (42%). Numerosas de sus especies se han aislado y

15. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1994.

16. Gallardo AA, Riso S, Fajardo MA, Estevas S. Caracterización de poblaciones microbianas presentes en la macroalga comestible *Monostroma undulatum*, Witrock. *Arch Latinoam Nutr.* 54(3):337-45.

17. Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev.* 1990;54(3):305-15.

18. Annweiler E, Richnow HH, Antranikian G, Hebenbrock S, Garms C, Franke S, et al. Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene-derived carbon into biomass by the thermophile *Bacillus thermovorans*. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(2):518-23.

19. Roling WF, Milner MG, Jones DM, Lee K, Daniel F, Swannell RJ, et al. Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(11):5537-48.

20. Ficker M, Krastel K, Orlicky S, Edwards E. Molecular characterization of a toluene-degrading methanogenic consortium. *Appl Environ Microbiol.* 1999; 65(12): 5576-85.

21. Dojka MA, Hugenholtz P, Haack SK, Pace NR. Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(10):3869-77.

22. Olivera NL, Commendatore MG, Moran AC, Esteves JL. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from slip bilge wastes. *J Ind Microbiol Biot.* 2000;25(2):70-3.

23. Núñez R. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos [dissertation], La Habana: Universidad de La Habana; 2004.

24. Ara-Rojas SL, Massol-Deyá A. Diversidad bacteriana en un biorreactor de lecho fluidificado durante el tratamiento de agua contaminada con nafta. *Rev Argent Microbiol.* 2007;39(4):243-51.

25. Kim JS, Crowley DE. Microbial diversity in natural asphalt of the Rancho La Brea Tar Pits. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(14):4579-91.

26. 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(3):792-801.

27. Daane LL, Harjono I, Zylstra GJ, Haggblom MM. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plants. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(6):2683-91.

28. Colores GM, Macur RE, Ward DM, Inskeep WP. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(7):2959-64.

29. Kanaly RA, Bartha R, Watanabe K, Harayama S. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(10):4205-11.

descrito como degradadoras de hidrocarburos [17-19], tanto en ambientes terrestres [17-20] como marinos y dulceacuícolas [21-26]. Se ha descrito la degradación de naftaleno por la especie *B. thermoleovorans* [18], y de tolueno por *Bacillus* sp. [20, 26]. En una caracterización de la plataforma occidental cubana [27], se describió la presencia de este género tanto al norte como al sur. El bioproducto BIOIL-FC, del Centro de Bioproductos Marinos (Cebimar), del Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente, está compuesto por una cepa de *Bacillus licheniformis* [23].

De las 33 cepas, se identificaron cinco del género *Alcaligenes* (15%). Algunas especies de este género se han aislado de ambientes marinos contaminados con hidrocarburos [5, 17, 28]. Colores *et al.* observaron que al adicionar surfactantes en suelos contaminados con hidrocarburos, las poblaciones de *Alcaligenes* sp. desplazaron otras poblaciones bacterianas (*Rhodococcus* y *Nocardia*) [29]. Se ha descrito que la cepa *Alcaligenes denitrificans* WW1 degrada hidrocarburos poliaromáticos de cuatro anillos [30]. Estos microorganismos están distribuidos en suelos y aguas, y en ocasiones en muestras clínicas.

Dos cepas pertenecían al género *Pseudomonas*. Desde principios de los años 90, se describió la presencia de este género en ecosistemas contaminados con hidrocarburos, y como degradador de tales compuestos [17]. Actualmente han aumentado las publicaciones que así lo refieren [19, 24, 25, 31, 32]. Pueden degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos en ecosistemas terrestres [28, 33-35] y acuícolas [36, 37] y están en diversos ecosistemas [17, 23, 25, 26, 28, 31-40]; y además degradan fenantreno en suelos [38], antraceno, fenol [41] y metilbromuro de metilo en aguas marinas [40].

Otras dos cepas pertenecían a los géneros *Acinetobacter* y *Marinomonas*. En estudios recientes de biodegradación de hidrocarburos en ambientes acuáticos, se ha hecho referencia al primero de estos géneros [26, 36, 37]; y se ha descrito la presencia de estas bacterias en ambientes terrestres, marinos y en aguas residuales. En el año 2001 se aisló por primera vez el género *Marinomonas* de los sedimentos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos [42]. También se ha descrito que algunas especies de este género pertenecen a *Alteromonas* [17], son típicas de las costas y aguas de los océanos, por lo que para su cultivo requieren agua de mar, y se desarrollan en temperaturas entre 20 y 40 °C.

Solo se identificó una cepa del género *Kurthia*, y otra del género *Azotobacter*. En la literatura consultada no se encontró información concerniente a la presencia de estos microorganismos en ambientes contaminados con hidrocarburos. El primero es un género de bacilos grampositivos, descritos como bacterias ambientales. El segundo es típico de aguas y suelos. En ambos, las temperaturas óptimas de crecimiento oscilan entre 20 y 30 °C.

Selección de cepas

Las 33 cepas aisladas y caracterizadas se agruparon teniendo en cuenta su coincidencia al 100% con los criterios de cultivo, los morfológicos, fisiológicos y bioquímicos. Dieciocho cepas se sometieron al proceso de selección.

A partir del tercer día, la cepa de *Bacillus* sp. F1FLC creció abundantemente en las condiciones del ensayo a partir del tercer día. Las cepas de *Alcaligenes* sp. F10S1 y *Bacillus* sp. F9S crecieron a partir del cuarto día.

Las bacterias que crecieron en crudo pesado Vardadero Venta, desarrollaron mecanismos que les permitieron mantener la integridad de su membrana ante un flujo excesivo de hidrocarburos. Tales fueron el aumento de su rigidez por la disminución del contenido de ácidos grasos insaturados, las alteraciones en la conformación cis/trans de los fosfolípidos y sistemas de exclusión homólogos a los empleados por las bacterias en la resistencia a antibióticos [43, 44]. Los hidrocarburos son compuestos lipofílicos que, en concentraciones elevadas, inhiben el crecimiento, provocan intoxicación [45] e inducen una respuesta de estrés en las bacterias y cambios celulares a nivel de membrana, enzimáticos y proteicos [44, 46].

Caracterización de la capacidad de degradación de hidrocarburos de las cepas seleccionadas

La capacidad de degradación de los hidrocarburos del petróleo (crudo Mesa 30) se determinó después de 45 días de cultivo estático. Tres cepas en estudio (F10S1, F9S y F1FLC) removieron más del 50% del hidrocarburo. La cepa F10S1 removió el 69.26% (Figura 2).

Los tratamientos (cepas) mostraron diferencias significativas entre sí y con respecto al control ($p < 0.05$). La concentración de los hidrocarburos aromáticos I no mostró diferencias significativas con respecto a los tratamientos, pero sí entre estos y el control ($p < 0.05$). No hubo diferencias significativas en las concentraciones de las fracciones de los aromáticos II y de las resinas entre tratamientos, ni con respecto al control ($p < 0.05$). La concentración de asfaltenos mostró diferencias significativas entre los tratamientos y con respecto al control ($p < 0.05$) (Tabla 1).

La figura 3 muestra el perfil cromatográfico de la fracción de compuestos saturados, en términos de intensidad eléctrica (picoamperes) en función del tiempo (minutos), de las cepas F9S, F10S1 y F1FLC. En cada una de las imágenes que conforman la figura se muestra el perfil del control abiótico y el perfil de la cepa en discusión. Se muestra un grupo de cadenas carbonadas. En los perfiles de las cepas F9S y F10S1

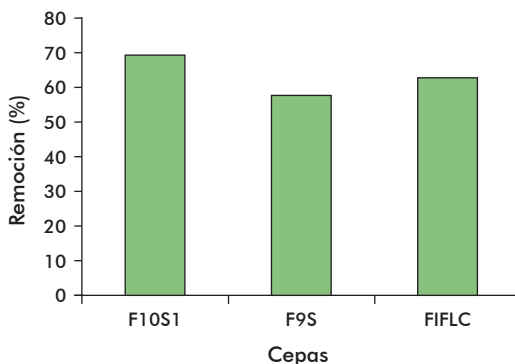


Figura 2. Porcentajes de remoción de hidrocarburos totales del petróleo crudo Mesa 30 de las cepas seleccionadas a los 45 días de cultivo en condiciones estáticas.

30. Roling WF, Milner MG, Jones DM, Fratepietro F, Swannell RP, Daniel F, et al. Bacterial community dynamics and hydrocarbon degradation during a field-scale evaluation of bioremediation on a mudflat beach contaminated with buried oil. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(5):2603-13.

31. Bordenave S, Goni-Urriza MS, Caumette P, Duran R. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(19):6089-97.

32. Miravet ME. Estudio de bacterias heterótrofas en el Golfo de Batabanó [dissertation]. La Habana: Universidad de La Habana; 1996.

33. Cerniglia CE. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation.* 1992;(2-3):351-68.

34. Dagher F, Deziel E, Lirette P, Paquette G, Bisailon JG, Villemur R. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Can J Microbiol.* 1997;43(4):368-77.

35. Whyte LG, Bourbonniere L, Greer CW. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(9):3719-23.

36. Hilyard EJ, Jones-Meehan JM, Spargo BJ, Hill RT. Enrichment, isolation, and phylogenetic identification of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from Elizabeth River sediments. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(4):1176-82.

37. Mukred AM, Hamid AA, Hamzah A, Wan Yusoff WM. Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water. *Online J Biol Sci.* 2008; 8(4):73-9.

38. Stringfellow WT, Aitken MD. Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar pseudomonads isolated from a creosote-contaminated soil. *Can J Microbiol.* 1994;40(6):432-8.

39. Noordman W, Bruseau M, Jassen D. Effects of rhamnolipid biosurfactants on removal of phenanthrene from soil. *Environ Sci Technol.* 1998;32(12):1806-12.

se observa una mayor disminución de los máximos y del fondo no resuelto de hidrocarburos con respecto a la cepa F1FLC.

A partir del análisis cromatográfico se calcularon las relaciones entre C17/pristano y C18/fitano tras los diferentes tratamientos y en la muestra control (Tabla 2).

Las fracciones de los hidrocarburos aromáticos monocíclicos y policíclicos se analizaron por espectroscopia FTIR (como se describió en materiales y métodos). Los perfiles, según los valores de la transmitancia (%) en función del número de ondas (cm^{-1}) obtenidos para las cepas F9S y F1FLC, se muestran en la figura 4. El perfil de la cepa F10S1 es semejante al de la cepa F9S (datos no mostrados). En cada una de las imágenes que conforman la figura se muestra el perfil de la muestra patrón y el de la cepa en discusión. Se incrementó la concentración de los grupos hidroxilos (OH^-) asociados ($3290\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$) en todos los tratamientos. La concentración de los grupos carboxílicos (ácidos carboxílicos) aumentó en los perfiles de todas las cepas (1680 cm^{-1}).

En este estudio se demostró la capacidad de las cepas bacterianas empleadas para degradar hidrocarburos por sí solas cuando se les suministran como fuente de carbono. Debido a que la determinación de los hidrocarburos fue solamente al final del ensayo (45 días), no se tienen datos para evaluar punto a punto el proceso de biodegradación; sin embargo, la literatura consultada y los resultados permiten hacer inferencias.

En sentido general, se espera que la biodegradación se produzca en mayor extensión en los hidrocarburos alifáticos, ya que estos suelen ser más susceptibles a la degradación que los aromáticos [35, 47, 48], y estos, más que las resinas y los asfaltenos [47, 48]. Los n-alcenos son los más propensos a la oxidación [35, 49]; sin embargo a los 45 días, no se diferenció el porcentaje de biodegradación de los saturados, los asfaltenos y los aromáticos monocíclicos.

Los hidrocarburos alifáticos disminuyeron en comparación con los del control abiótico con referencia al fondo no resuelto (cicloalcanos, resinas y asfaltenos). Al comparar las relaciones C17/pristano y C18/fitano de las cepas con el control biológico, se observó que los valores de las cepas F10S1 y F9S habían disminuido notablemente (aproximadamente el 50%). Esta disminución de los isoprenoides indica la efectividad de la biodegradación; mientras que en la cepa F1FLC los valores son superiores a los del control abiótico.

Los espectros de la figura 4 muestran la mezcla de compuestos aromáticos presentes en los crudos tratados con cepas bacterianas. No hubo diferencias significativas entre ellos; aunque el aumento de los grupos carboxilos y de los grupos hidroxilos demuestra que han ocurrido procesos de oxidación biológica. El aumento de los fenoles y los fenóxidos puede estar relacionado directamente con la acumulación de compuestos por la degradación de las resinas y los asfaltenos.

Las tres cepas en estudio disminuyeron notablemente la concentración de los asfaltenos con respecto al control. Las cepas F10S y F9S indujeron los valores de concentración final más bajos, no mostraron diferencias significativas entre ellas y sí con la cepa F1FLC. La disminución de los niveles de asfaltenos observados en el crudo tratado con la cepa F9S pudo

Tabla 1. Concentración de las fracciones de los hidrocarburos saturados, los aromáticos I y II, las resinas y los asfaltenos a los 45 días de tratamiento

Tratamiento	Concentración (g/L)				
	Saturados	Aromáticos I	Aromáticos II	Resinas	Asfaltenos
Control	6.6336 ^c	6.2753 ^b	0.6703	0.6132	4.6265 ^c
F10S1	2.1010 ^a	2.0467 ^a	0.3034	0.5388	0.7298 ^a
F9S	3.2087 ^b	2.6790 ^a	0.4179	0.8530	0.9572 ^a
F1FLC	2.1367 ^b	2.3547 ^a	0.3169	0.5911	1.7778 ^b

* Letras diferentes en los valores numéricos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), según el método LSD de Fisher.

haber influido directamente en el aumento de la concentración de resinas. No obstante, la remoción de los hidrocarburos saturados y aromáticos monocíclicos mostró valores superiores al 50%, y la de los hidrocarburos aromáticos policíclicos estuvo cerca del 40%. En el tratamiento con la cepa F10S1 se observó una disminución de la concentración de todas las fracciones con respecto al control, y se registró el valor más bajo de concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, el segundo más bajo de los hidrocarburos asfaltenos, y el tercero más bajo el de las resinas, mientras los valores de remoción de los hidrocarburos saturados y los aromáticos monocíclicos estuvieron por encima del 65%.

En estas muestras no se detectaron los alcanos con menos de doce átomos de carbono. Narváez-Flores y

40. Goodwin KD, Tokarczyk R, Stephens FC, Saltzman ES. Description of toluene inhibition of methyl bromide biodegradation in seawater and isolation of a marine toluene oxidizer that degrades methyl bromide. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):3495-503.

41. Neumann G, Teras R, Monson L, Kivisaar M, Schauer F, Heipieper HJ. Simultaneous degradation of atrazine and phenol by *Pseudomonas* sp. strain ADP: effects of toxicity and adaptation. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(4):1907-12.

42. Melcher RJ, Apitz SE, Hemmingsen BB. Impact of irradiation and polycyclic aromatic hydrocarbon spiking on microbial populations in marine sediment for future aging and biodegradability studies. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(6):2858-68.

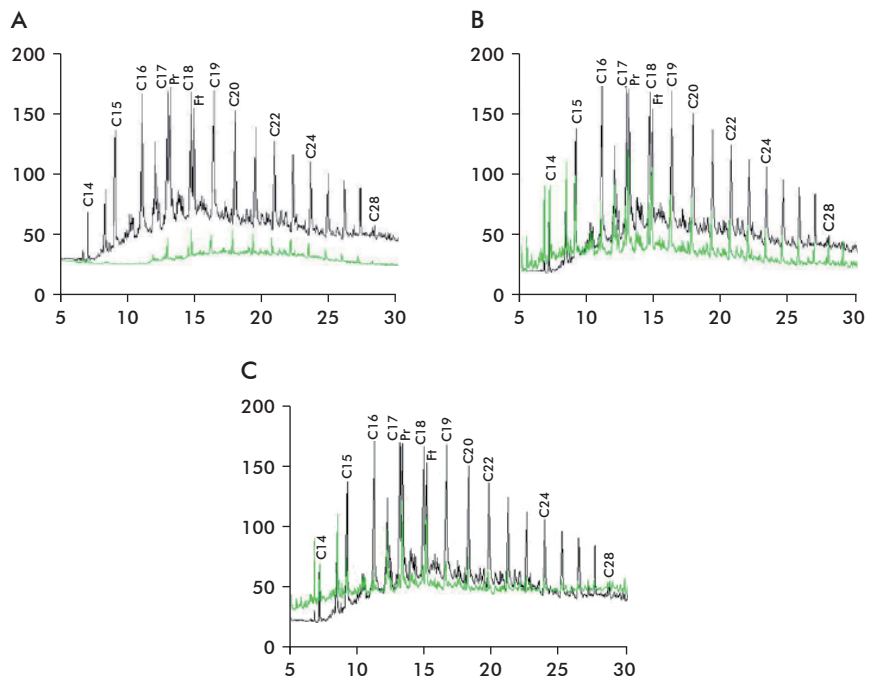


Figura 3. Perfiles cromatográficos del control abiótico y tratamiento de los n-alcenos del crudo Mesa 30 después de 45 días de tratamiento —Control abiótico; — Tratamiento. A) Cepa F9S; B) Cepa F10S1; C) F1FLC.

Tabla 2. Relaciones entre C17/pristano y C18/fitano para cada cepa

Cepas	C17/pristano	C18/fitano
Control	0.99	1.11
F1FLC	4.14	4.10
F9S	0.56	0.72
F10S1	0.49	0.64

cols. obtuvieron un resultado semejante en un estudio de la capacidad de bacterias aisladas de sedimentos marinos de degradar hidrocarburos [44]. Varios autores han señalado que los alifáticos de cadena corta se volatilizan en las primeras horas después de un derrame, y por sus propiedades son tóxicos para las bacterias [44, 50]. Se supone que la degradación de compuestos aromáticos no comienza hasta no haberse agotado las cadenas saturadas; sin embargo, se ha informado la degradación de compuestos aromáticos de bajo peso molecular antes que muchos compuestos saturados [51].

El análisis de estos resultados hace suponer que en los primeros 10 a 15 días ocurrió la degradación de las cadenas lineales de hasta 30 átomos de carbono y parte de los compuestos aromáticos de bajo peso molecular. En un análisis de los hidrocarburos, en este tiempo debieron observarse niveles de asfaltenos y resinas en los tratamientos prácticamente iguales a los del control, y una disminución notable en los saturados, y ligera en los aromáticos; estos últimos debieron comenzar a degradarse después de los 21 días. Ruberto y cols. encontraron diferencias significativas en la degradación de los aromáticos entre el control abiótico y los tratamientos a partir de los 20 días de comenzado el ensayo de bioaumentación y bioestimulación [52]. Narváez-Florez y cols. corroboraron este resultado al no obtener diferencias significativas entre la degradación observada en el control abiótico (3.6%) y el tratamiento con bacterias (3.5%) [44].

Al comparar la velocidad y el tiempo de inicio de la degradación de la fracción de los asfaltenos con la de los saturados y los aromáticos, serían significativas las características del hábitat de donde han sido aislados los microorganismos, o sea, la adaptación ambiental. Sin embargo, los complejos enzimáticos para degradar las fracciones más pesadas no se inducen hasta que se han degradado las fracciones más ligeras, por el principio de economía celular (regulación metabólica). Contrario a esto, Joseph y cols. describieron que los microorganismos aislados de la Bahía de Cárdenas, en Matanzas (Cuba), degradaban mejor un crudo pesado (como el crudo Varadero) que uno ligero (como el crudo Pina) [49]. Estos autores supusieron que se debió a la adaptación de los microorganismos a la contaminación crónica de su hábitat de origen. El petróleo Varadero es más asfáltico, mientras que el crudo Pina está constituido principalmente por hidrocarburos saturados de cadenas menores de 18 átomos de carbono. La biodegradación de los asfaltenos no solo ocurre mediante los mecanismos clásicos de oxidación que son más eficientes, también ocurren los mecanismos de α -oxidación y ω -oxidación, donde los compuestos intermediarios son más largos, por lo que el proceso de biodegradación requiere más tiempo [23]. Otros autores han descrito que la biotransformación de resinas y asfaltenos da lugar a la acumulación de derivados más sencillos como los saturados y los aromáticos, e incrementan los valores de las concentraciones de estas fracciones [53, 54].

Las generaciones bacterianas en los cultivos debieron ajustar su metabolismo luego del agotamiento de los sustratos menos complejos (saturados lineales y aromáticos de bajo peso molecular). Los mecanismos de regulación del metabolismo probablemente indujeron un cambio enzimático para la degradación de com-

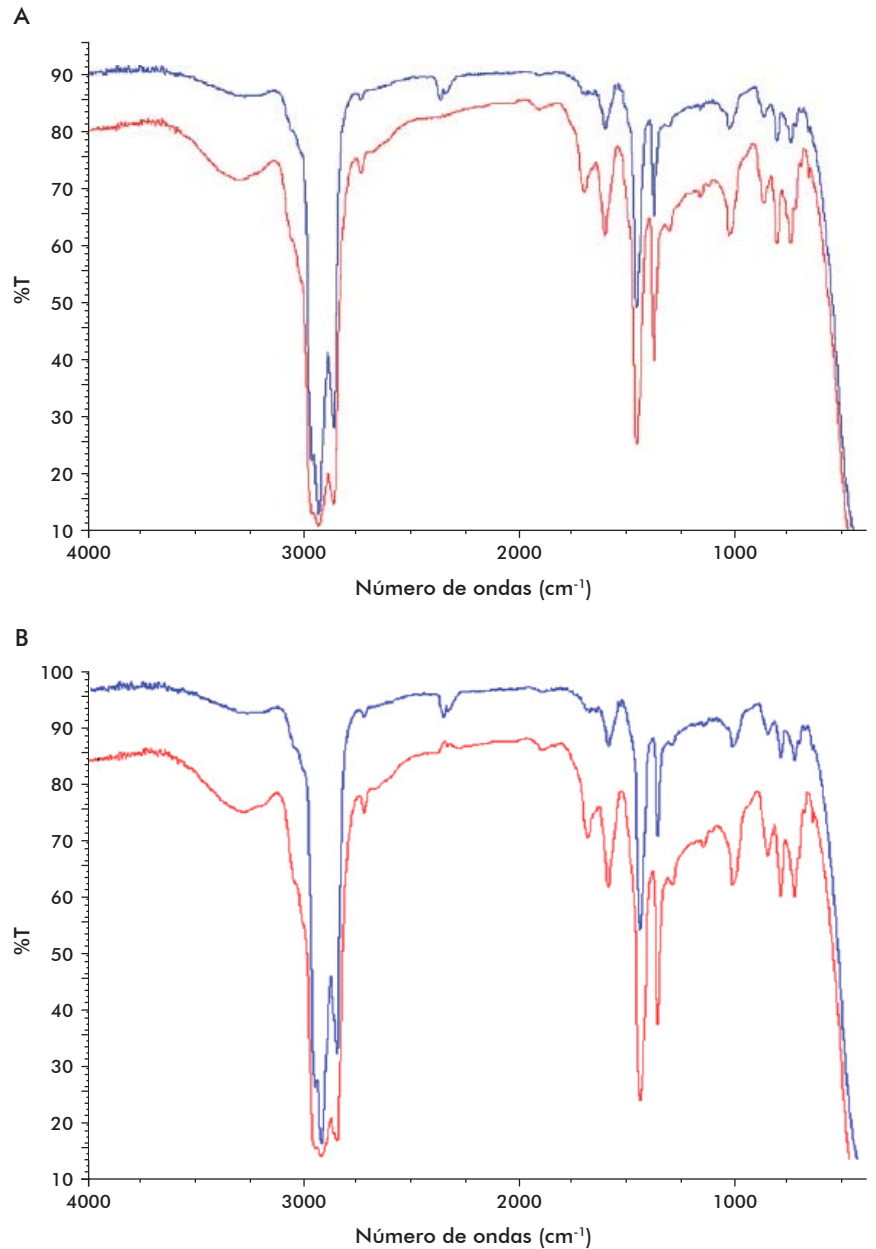


Figura 4. Espectro FTIR del control abiótico y de los tratamientos de las fracciones de hidrocarburos monoaromáticos y poliaromáticos del crudo Mesa 30 después de 45 días de tratamiento: —Control abiótico; —Procedimiento. A) Procedimiento A, cepa F9S A; B) Procedimiento B, cepa F1FLC. %T- Porcentaje de transmitancia.

puestos más complejos. La mineralización de estos compuestos no fue completa, sino que se acumularon como metabolitos intermediarios en forma de cadenas lineales y compuestos aromáticos. Por tanto, la bacteria enzimática debió variar en función de las fluctuaciones de las concentraciones de los diferentes compuestos.

Conclusiones

Se aislaron 33 cepas bacterianas hidrocarbonoclastas de las costas de Felton (Holguín, Cuba), que se identificaron como miembros de los géneros *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Acineobacter*, *Marinomonas*, *Kurthia* y *Azothobacter*.

43. Ramos JL, Duque E, Rodríguez-Herva JJ, Godoy P, Haidour A, Reyes F, et al. Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J Biol Chem.* 1997;272(7):3887-90.

44. Narváez-Florez S, Gómez ML, Martínez MM. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe colombiano. *Bol Invemar.* 2008; 37(1):61-75.

45. LaGrega MD, Buckingham PL, Evans JC, Environmental Resources Management group. *Hazardous waste management.* 2nd ed. Boston: McGraw-Hill; 2001. p. 7-23.

Las cepas *Alcaligenes sp.* F10S1; *Bacillus sp.* F9S y *Bacillus sp.* F1FLC removieron del 55 al 80% de los hidrocarburos a los 45 días de tratamiento. Las fracciones con mayor porcentaje de degradación fue-

ron los asfaltenos, los aromáticos monocíclicos y los saturados. Con las cepas *Alcaligenes sp.* F10S1 y *Bacillus sp.* F9S se obtuvieron los mejores resultados de degradación de la fracción asfáltica.

46. Van Hamme JD, Singh A, Ward OP. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(4):503-49.

47. Song HG, Wang X, Bartha R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl Environ Microbiol.* 1990;56(3): 652-6.

48. León N, Infante C, Arias M, Marquez M, Gorrin A. Biodegradability of Venezuela crude oils. SPE International conference on health, safety, and environment in oil and gas exploration and production, 1998 June 7-10, Caracas, Venezuela.

49. Joseph IN, Capo MC, Bellota M, Ramos Y, Ramos I, Fuentes M. Aislamiento y selección

de microorganismos degradadores de hidrocarburos en la plataforma cubana. *Ciencias Biológicas.* 1994;27:137-48.

50. Solano-Serena F, Marchal R, Casaregola S, Vasnier C, Lebeault JM, Vandecasteele JP. A Mycobacterium strain with extended capacities for degradation of gasoline hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(6):2392-9.

51. Venosa A, Zhu X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Sci Technol Bull.* 2003;8:163-78.

52. Ruberto L, Vñazquez S, y Mac Cormack W. Effectiveness of the natural bacterial flora, bioestimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Int Biodeter Biodegr.* 2003;52(2):115-25.

53. Young LY, Cerniglia CE, editors. *Microbial Transformation and degradation of toxic organic chemicals.* Nueva York: Willy-Liss; 1995.

54. Araujo I, Gómez A, Barrera M, Angulo N, Morillo G, Cárdenas C, et al. Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. *Interciencia.* 2008; 33(4):245-50.

Recibido en octubre de 2010. Aprobado en enero de 2012.