

Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo

Rosa María Pérez Silva, Miladis I. Camacho Pozo, José Manuel Gómez Montes de Oca,* Arelis Ábalos Rodríguez, M. Viñas y Domingo Cantero Moreno.***

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba, Código Postal 90500, Cuba. Correo electrónico: rmaria@cebi.uo.edu.cu *Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de los Alimentos, Tecnología del Medio Ambiente, Universidad de Cádiz, España Código Postal 11510. Correo electrónico: josemanuel.montesdeoca@uca.es **Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona, España.

Recibido: 4 de abril de 2007. Aceptado: 18 de septiembre de 2007.

Palabras clave: petróleo, biodegradación, biorremediación, *Pseudomonas aeruginosa*, hidrocarburos.
Key words: oil, biodegradation, bioremediation, *Pseudomonas aeruginosa*, hydrocarbons.

RESUMEN. El conocimiento científico acerca del papel que desempeñan los microorganismos en el tratamiento de agentes contaminantes del medio ambiente como el petróleo, es esencial para prevenir y controlar los daños que puedan ocasionar los derrames o fugas de estos contaminantes. La degradación de petróleo es un proceso que puede ocurrir de forma natural por los microorganismos nativos de las zonas contaminadas aprovechando sus rutas metabólicas. Por esta razón, en estos momentos se prevé que los microorganismos pueden ofrecer esta posibilidad en tecnologías basadas en el uso de estos en la remediación de la contaminación ambiental por petróleo y sus derivados. En el presente trabajo, se estudió la biodegradación de petróleo por cepas aisladas de suelos contaminados con petróleo, mediante un aislamiento realizado por enriquecimiento secuencial utilizando petróleo Mesa 30/Puerto escondido (80 : 20) como única fuente de carbono y energía. Se aislaron 9 cepas bacterianas, cinco Gram negativas y cuatro Gram positivas, que fueron identificadas según el Manual Bergey's, 1994. Las pruebas bioquímicas evaluadas confirmaron que las cepas aisladas AT14, AT15, AT16, AT17 y AT18 corresponden a *Pseudomonas aeruginosa*. En este estudio, se seleccionó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18, por mostrar mayor crecimiento sobre petróleo como única fuente de carbono y energía al obtenerse 1,83 g/L de biomasa celular, lo que representa un 57 % de biodegradación de petróleo.

ABSTRACT. The scientific understanding about the role microorganisms carry out in the treatment of polluting agents of the environment as to oil, are essential to prevent or to control the damages that can cause the spills or flights of these. The degradation of oil is a process that can happen in natural form by native microorganisms of contaminated zone whenever they have the appropriate metabolic routes. For that reason in this moment to improve that the microorganisms can offer these possibilities to technologies based on the use in the remediation of the contamination are being developed. In the present work the biodegradation of petroleum by isolated strain of soil contaminated of petroleum was studied. The isolation was carried out by sequential enrichment using as carbon and energy source petroleum crude Mesa 30/Puerto Escondido (80 : 20). Nine bacterial strains were isolated, of which five were negative Gram and four positive Gram, which were identified by the Bergey's Manual, 1994. The biochemistry test confirmed that the isolated strains AT14, AT15, AT16, AT17 and AT18 belong to *Pseudomonas aeruginosa*. In this study the *Pseudomonas aeruginosa* AT18 was selected to show high growth in oil as one source of carbon and energy to obtain 1.83 g · L⁻¹ of cell biomass which represents 57 % of biodegradation of oil.

INTRODUCCION

La industria petroquímica es importante en toda sociedad, no obstante, la falta de un programa de protección ambiental hace que el medio se vuelva más frágil ante derrames de petróleo o mareas negras por el deterioro de oleoductos, descargas de efluentes contaminados, afloramientos naturales a través de las fisuras de la corteza terrestre y transporte y almacenamiento de este recurso natural.¹

Los dispersantes químicos utilizados para la remediación de los ambientes contaminados con petróleo, pueden causar un mayor impacto ecológico que el mismo derrame, por su toxicidad y recalcitrancia a la biodegradación.² Una mejor alternativa de solución es la biorremediación, tecnología emergente que aprovecha la capacidad metabólica de los microorganismos (levaduras, bacterias, hongos, microalgas), plantas y sistemas biológicos (enzimas) para degradar, biotrans-

Correspondencia:

Dra. Rosa María Pérez Silva

Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Patricio Lumumba sin número, Santiago de Cuba, Código Postal 90500, Cuba.

formar o hacer ambas cosas a estos contaminantes. Básicamente la biorremediación permite acelerar los procesos biodegradativos que de forma natural ocurren en los ecosistemas contaminados. Las comunidades microbianas en ecosistemas contaminados tienden a ser dominadas por aquellos organismos capaces de utilizar o de sobrevivir a compuestos tóxicos. Sin embargo, cuando las bacterias Gram negativas (Ej. *Pseudomonas aeruginosa*) dominan el sistema (como es frecuente en el caso de ambientes contaminados con hidrocarburos), el conocimiento derivado de los biomarcadores lipídicos se limita al estado nutricional o fisiológico de la comunidad bacteriana más que a su diversidad.

El estudio de la diversidad microbiana y de la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradadores, esta creciendo notablemente en el área de la ecología microbiana, lo cual ha permitido profundizar en el conocimiento acerca de la composición de las comunidades presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante los procesos de biodegradación, para determinar cuáles son los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar los hábitats contaminados. Asimismo, teniendo en cuenta que el metabolismo de sustratos orgánicos en sistemas naturales se produce mediante interacciones metabólicas complejas con la participación de microorganismos diferentes, es necesario estudiar las poblaciones microbianas presentes en el suelo de la forma más representativa posible. Sin embargo, la mayor parte de los microorganismos presentes en muestras ambientales no se pueden cultivar en medios de cultivo en el laboratorio (solamente un 0,1 a un 0,01 % son cultivables) y los que son cultivables pueden no ser representativos de la población presente en la muestra.³⁻⁶

Se ha estudiado, mediante técnicas moleculares la estructura y composición de comunidades microbianas asociadas a ambientes contaminados por crudos de petróleo;⁷⁻¹⁰ el uso de estas técnicas provee una apreciación clara de varias características importantes de las comunidades, específicamente la biomasa viable, la estructura de la comunidad y el estado nutricional o la presencia de respuestas a estrés en bacterias Gram negativas.

La selección de microorganismos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros

ricos en petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y supervivencia de cepas tolerantes a elevadas concentraciones de petróleo. Los resultados de estas pruebas confirman la selección de las cepas más tolerantes y adaptadas, dependiendo de estas el éxito en las siguientes etapas de tratamiento tanto de suelos como de aguas contaminadas con petróleo.¹¹

En la industria del petróleo, la presencia de compuestos pesados constituye un problema tanto para la extracción, como para la transportación y refinación, siendo mayores los daños al medio ambiente, lo que implica disminución del beneficio económico reportado por los petróleos con estas características.¹² En este caso, se encuentra la mayoría de los petróleos cubanos. Existen bacterias indígenas del petróleo capaces de utilizarlo para su crecimiento y mantenimiento, conocidas como bacterias degradadoras de hidrocarburos. Dentro de ellas, se encuentran las del género *Pseudomonas*, que se caracterizan por su versatilidad metabólica. Su función es convertir sustratos habitualmente no degradables en metabolitos fácilmente asimilables o que puedan ser atacados por enzimas codificadas cromosómicamente.

Es por ello que el presente trabajo tuvo como objetivos fundamentales aislar e identificar cepas bacterianas con capacidad para biodegradar fracciones de petróleo y seleccionar la de mayor capacidad biodegradadora como una alternativa para la solución de los problemas de contaminación generados por este mineral en la industria petrolera cubana.

MATERIALES Y METODOS

Origen y toma de las muestras

Las muestras fueron tomadas de suelos contaminados con petróleo en los alrededores del primer reservorio del sistema de tratamiento de residuos en la Refinería del Petróleo “Hermanos Díaz” en Santiago de Cuba, las cuales fueron conservadas en frascos ámbar estériles y procesados dentro de las 24 h de su colecta.

Aislamiento y selección de cepas degradadoras de petróleo

El aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de petróleo se llevó a cabo por el método de enriquecimiento secuencial, empleando como fuente de carbono y energía crudo de petróleo Mesa 30/Puerto Escondido (Fig. 1).

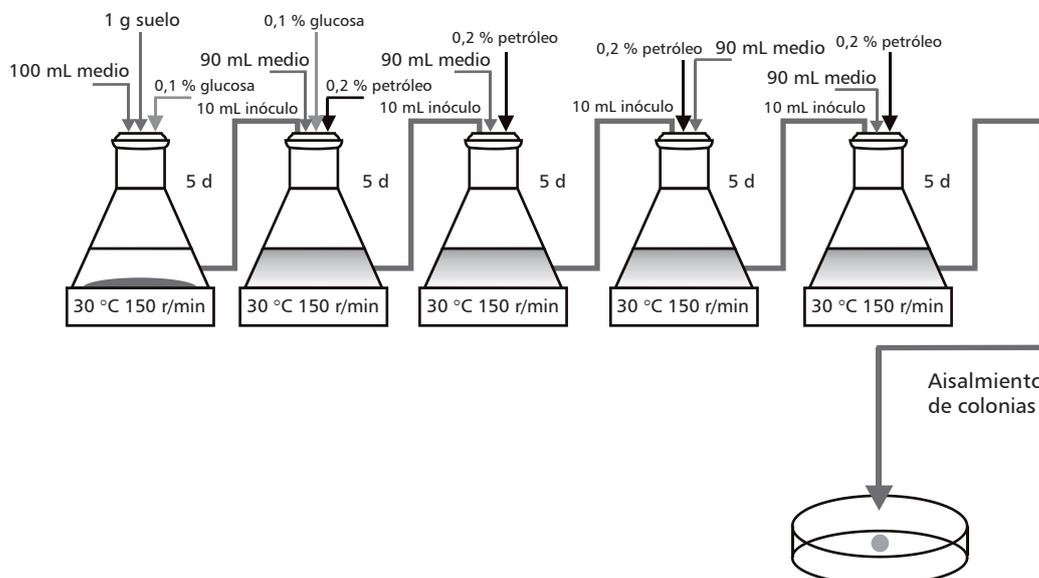


Fig. 1. Esquema del sistema de enriquecimiento secuencial para el aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de petróleo a partir de suelos contaminados con crudo.

El enriquecimiento se realizó empleando medio mineral modificado del medio diseñado por Zajic y col.¹³ compuesto por ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): KH_2PO_4 0,05; NH_4Cl 0,1; K_2HPO_4 0,1; KH_2PO_4 0,05; KCl 0,01; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; CaCl_2 0,001; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001. Además, se le adicionaron 0,05 mL de una disolución de oligoelementos de composición porcentual: B (0,026), Cu (0,05), Mn (0,05), Mo (0,006) y Zn (0,07). Como fuente de carbono se utilizó petróleo intermedio (Mesa 30/Puerto Escondido) 0,2% (v/v). Los componentes del medio fueron esterilizados en autoclave a 120 °C durante 20 min. Las disoluciones de oligoelemento fueron esterilizadas a través de un filtro de 0,22 $\mu\text{mol/L}$. En 50 mL de este medio, se preparó el pre-inóculo de 24 h de incubación, 1 mL de inóculo del cultivo a una longitud de onda de 600 nm equivale a una densidad óptica (DO) aproximadamente igual a 2 ($\text{DO}_{600\text{ nm}} \approx 2$).

Para la selección de las cepas degradadoras de petróleo, se realizó la evaluación de su crecimiento en placas que contenían petróleo como única fuente de carbono y energía.

Una vez aisladas las cepas, se procedió a estudiar sus capacidades biodegradadoras. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de biodegradación con crudo de petróleo. Cada una de las cepas aisladas se incubaron en erlenmeyers de 100 mL (capacidad nominal) con 20 mL de medio mineral y 0,02 % (p/v) de crudo de petróleo y 0,5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de extracto de levadura. Se inocularon 100 μL de resuspensión de las cepas, a una turbidez equivalente de 0,9 unidades de absorbancia a 600 nm. Se utilizaron controles abióticos (sin inóculo). Los cultivos se incubaron en agitación horizontal a 150 r/min, 30 °C y en oscuridad durante 15 d. Además, se realizaron ensayos de crecimiento de las cepas aisladas, en placas con medio salino y naftaleno considerando que en la fracción aromática del petróleo utilizado es el compuesto más abundante. La actividad se evaluó midiendo el halo de degradación.

Determinación del crecimiento bacteriano

Para la determinación de la población microbiana, se utilizó el método de recuento directo en microscopio óptico (Olympus BH-2), mediante la cámara de Neubauer. La visualización de las muestras del cultivo obtenido en el enriquecimiento secuencial para el aislamiento de cepas degradadoras de hidrocarburos, se prepararon llevando a cabo tinciones de Gram, técnica de tinción diferencial que permite clasificar las bacterias en Gram positivas y negativas, según el tipo de coloración que adquieran y se observaron las preparaciones en el microscopio óptico Olympus BH-2.¹⁴

Análisis del crudo de petróleo

El crudo de petróleo residual de medios y controles fue extraído con diclorometano (5 x 10 mL) por extracción líquido-líquido en muestras duplicadas. Los extractos fueron secados con sulfato de sodio anhidro, concentrado en un evaporador rotacional y posteriormente, secados con una corriente suave de nitrógeno para su análisis del modo siguiente:

Columna cromatográfica. Todos los extractos fueron fraccionados, resuspendidos en 1 mL de diclorometano y cargados en una columna de vidrio (30 X 1 cm de diámetro) rellena con 10 g por cada 5 % de alúmina con agua desactivada (70 a 230 mallas, Merck). La fracción total de hidrocarburos del petróleo (TPH) fue obtenida por elusión con 100 mL de diclorometano.

CG-FID. La biodegradación de compuestos saturados de las fracciones de TPH fueron verificadas por cromatografía gaseosa con detector de ionización de

llama (GC-FID) en cromatógrafo de gases Termoquest Trace 2000. Los componentes fueron separados sobre una columna capilar DB5 (25 m por 0,32 mm (i.d.) con película de 0,25 μm). La temperatura fue llevada a 35 °C por dos minutos y entonces programada para 310 °C a una velocidad de 4 °C \cdot min⁻¹. La temperatura final fue mantenida por 10 min, las del detector y el inyector fueron de 320 y 290 °C respectivamente. El flujo del gas helio fue de 1,1 mL \cdot min⁻¹ y el volumen de inyección fue de 1 μL .

Identificación de microorganismos

El aislamiento de las cepas se realizó por siembra en estrías sobre placas de agar triptona soja (TSA), a partir de un banco de diluciones seriadas, las cepas se identificaron utilizando pruebas bioquímicas clásicas para determinar el género y la especie según el Manual Bergey's.¹⁴ Las cepas obtenidas fueron depositadas en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CCEBI), Universidad de Oriente, Santiago de Cuba e identificando a cada una de ellas mediante un código.

Identificación molecular de *Pseudomonas aeruginosa*

Aislamiento de ácidos nucleicos por calor: extractos celulares hervidos.

Para la obtención del ácido desoxirribonucleico (ADN) total a partir de la cepa microbiana seleccionada (*Pseudomonas aeruginosa* AT18), se utilizó una estrategia basada en la lisis por calor de extractos celulares, un cultivo de 12 h en 5 mL LB, a partir de cultivo puro con dodecilsulfato-proteínasa K (SDS) y tratamiento con BCTA (bromuro de cetiltrimetilamonio).¹⁵ El producto de la reacción de polimerización de nucleótido obtenida del PCR fue determinada en ambas direcciones usando cebadores universales con un juego de reactivos de secuenciación de ADN. En todas las experiencias se utilizaron 50 μL de volumen de reacción con 1,25 unidades de AmpliTaq Gold Polimerasa (Perkin-Elmer, Alemania), 10 mmol/L de Tris HCL (pH 9,0); 50 mmol/L de KCL; 1,5 mmol/L MgCl_2 ; desoxinucleosido trifosfato a una concentración de 200 $\mu\text{mol/L}$; 0,5 $\mu\text{mol/L}$ de cada cebador y 1 $\mu\text{mol/L}$ de ADN molde. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems). Para construir la librería de clones recombinantes con insertos que contenían casi la totalidad del gen que codifica para el 16S ARNr de la cepa microbiana, se utilizaron cebadores F27 y R1488¹⁵⁻¹⁶ y los cebadores F341-GC y R907,^{15,17} empleando para ello el programa II de PCR. El producto de la reacción de secuenciación fue analizado con secuenciador de ADN Modelo 34700 (Perkin-Elmer). La secuencia del gen que codifica para el 16S ARNr fue alineada con la secuencia publicada en la Base de Datos GenBank usando BLASTn 2,2.1,¹⁸ FASTA 3¹⁹ y RDP,²⁰ alineada y comparada con el programa de computación.

Análisis de la superficie celular

Para visualizar la superficie celular una vez finalizado el período de incubación, se procedió al análisis de los cultivos celulares por Microscopía Electrónica Secuencial (SEM), las muestras se centrifugaron, después se depositaron sobre un portaobjeto rectangular de vidrio, pretratado con poli-L-lisina durante 20 min. Para el proceso de fijación se utilizó glutaraldehído 2,5 % en disolución estabilizadora de cacodilato de sodio 3-hidrato (0,1 mol \cdot L⁻¹, pH = 7,2), dejándose actuar durante 1 h. Para retirar el glutaraldehído, se añadió cacodilato

(0,1 mol · L⁻¹, pH = 7,2) sin llegar a tocar la muestra. Se realizaron dos lavados de 10 min. Luego, se realizó la fijación con OsO₄ 1 % (disolución estabilizadora de cacodilato 0,2 mol · L⁻¹ de OsO₄ 2%) durante 1 h. Finalmente, se realizó el secado con acetona (50, 70, 90 y 100%) durante 20 a 30 min. Se deshidrató y se secó por el método del punto crítico, se recubrió con una capa fina de oro mediante el sistema de pulverización catódico (Jeol JFC-1100) y la observación se realizó en un microscopio electrónico FIE Quanta-200 marca Philips.

Biodegradación de petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* AT18 (CCEBI 1044)

La biodegradación de petróleo por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18 (CCEBI 1044) se estudió en un período de 20 d (480 h) y se dio seguimiento cada 5 d (120 h) empleando como medio de cultivo el medio mineral descrito anteriormente. Para ello, se inocularon en matraces erlenmeyers estériles de 300 mL, 100 mL de medio mineral y un 2% (v/v) de una suspensión celular de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 (DO_{600nm} ≈ 2) obtenido del pellet centrifugado (10 min, 5 000 r · min⁻¹) en fase exponencial. El medio de cultivo fue preparado a partir de disoluciones concentradas de cada uno de sus componentes, esterilizadas durante 20 min a 120 °C y 101 325 Pa (1 atm). Como fuente de carbono se utilizó 0,2 % (v/v) del crudo de petróleo Mesa 30/Puerto escondido (80 : 20), procedente de la planta refinadora de petróleo "Hermanos Díaz". El medio se ajustó en todos los casos a siete unidades de pH con NaOH 2 mol/L. Los cultivos fueron incubados durante 480 h en un agitador orbital a 150 r · min⁻¹ y 30 °C.

RESULTADOS Y DISCUSION

Aislamiento e identificación de las cepas aisladas

Se conoce que las bacterias son el grupo microbiano más versátil en la biodegradación de hidrocarburos; el 96 % de las aisladas de medios líquidos (lagos, ríos y lagunas) presentan capacidad de crecer y emulsificar hidrocarburos derivados del petróleo,²¹ y el enriquecimiento del medio favorece esta actividad. Entre los géneros más estudiados destacan bacterias del género *Pseudomonas* y *Bacillus*. Estos géneros pueden crecer en las interfaces y producir exopolímeros para adherirse. Algunas, también utilizan estructuras celulares superficiales específicas como los *pili* y las fimbrias.²² Otras bacterias producen tensoactivos y bioemulsificantes que disminuyen la tensión superficial entre el petróleo y el medio acuoso, facilitando el acceso microbiano a

la fuente de carbono insoluble para su degradación.²³ Así, en la biodegradación de hidrocarburos, se utilizan bacterias con elevada capacidad degradativa, entre estas: *Brevibacterium*, *Spirillum*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Micrococcus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus*, etc.²⁴

Del enriquecimiento realizado, se aislaron 9 cepas bacterianas, de las cuales cinco fueron Gram negativas y cuatro Gram positivas. Se escogieron las cepas de bacterias Gram negativas para el estudio en la degradación del petróleo Mesa 30/Puerto Escondido, las cuales presentaron morfología bacilar y olor dulzón característico del género *Pseudomonas*. A partir de estos resultados, se procedió a la identificación, utilizando diferentes ensayos clásicos presuntivos y confirmativos (Tabla 1).

La aparición del color rojo, indicó la fermentación de la lactosa en el Agar McConkey por la bacteria, medio de cultivo donde se favorece, además, el crecimiento de bacterias Gram negativas.

La permanencia de coloración roja (básico) en el medio Kligler, indicó la no fermentación de glucosa y lactosa y la ausencia de puntos negros en el medio indicó la no producción de gas (H₂S).

Al observar diariamente los tubos hasta los catorce días, en la prueba O/F, el viraje de color azul verdoso a amarillo, indica que el microorganismo ha producido acidez a partir del azúcar, se consideró como +/-, es decir, que el microorganismo actúa sobre la glucosa de forma oxidativa (O) mientras que no presenta actividad fermentativa (F), lo que presume el aislamiento de cepas de *Pseudomonas sp.* al poseer esta bacteria un metabolismo oxidativo.

La pigmentación del medio del cultivo King A y B indicó la producción de un pigmento sideróforo de color azul (piocianina) y de un pigmento amarillo verdoso (pioverdina). La capacidad para producir pigmentos como pioverdina (fluoresceína) y piocianina es una característica importante para la identificación de especies de *Pseudomonas*. Algunas de ellas elaboran sólo fluoresceína (ej. *P. fluorescens*) y otras ambos pigmentos (ej. *P. aeruginosa*). La piocianina solamente es producida por *Pseudomonas aeruginosa*.

El ensayo citocromo-oxidasa pone de manifiesto la presencia de esta enzima con la aparición de una coloración púrpura sobre la línea de inoculación. *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo capaz de producir esta enzima.

Tabla 1. Pruebas bioquímicas para la identificación de cepas de *Pseudomonas. Aeruginosa*.

Ensayos	AT14	AT15	AT16	AT17	AT18
Colonias (TSA)	Lisas, opacas	Rugosas, opacas	Grisáceas	Lisas, opacas	Lisas, opacas
Gram	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-	Bacilo G-
McConkey	+	+	+	+	+
Kligler	Básico	Básico	Básico	Básico	Básico
Motilidad	+	+	+	+	+
Citocromo-oxidasa	+	+	+	+	+
O/F	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
Catalasa	+	+	+	+	+
Hidrólisis de la gelatina	+	+	+	+	+
King A y King B	Azul	Azul	Azul	Azul	Azul
Crecimiento a 42 °C	+	+	+	++	+++

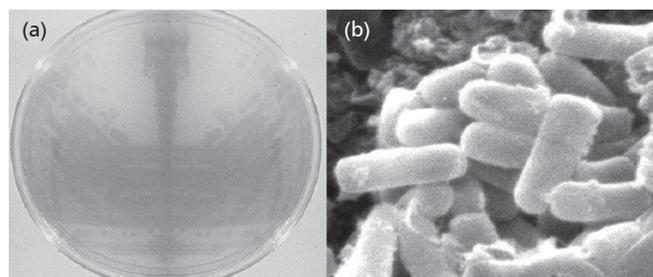


Fig. 2. (a) Bacilo Gram negativo piocianico o de pus azul de *Pseudomonas aeruginosa* AT18, crecida en placa de TSA a 37 °C (Foto digital realizada con Cámara Digital Acer de 6 Mpixel). (b) Bacilo recto o ligeramente curvo se observaron en imagen de Microscopia Electrónica Secuencial de Barrido de *Pseudomonas aeruginosa* AT18 cultivada en TSA a 37 °C realizado en FIE Quanta-200 marca Philips con magnificación de 10 000x a 20,00 kV.

La positividad de otros ensayos como: la prueba de la catalasa, hidrólisis de la gelatina, motilidad y crecimiento a 42 °C, que demuestran, la hidrólisis del peróxido de hidrógeno, en H₂O y O₂; la presencia de enzimas proteolíticas que licúan la gelatina (gelatinasas); la difusión del crecimiento a los lados de la línea de inoculación, indicando que el microorganismo es móvil (presencia de flagelos) y el crecimiento óptimo a esta temperatura, respectivamente, demuestran la presencia de *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 1).

El género *Pseudomonas* está constituido por bacilos Gram negativos, móviles por flagelación polar. Se encuentra normalmente en el suelo y son patógenos oportunistas en animales, plantas y humanos. Entre los microorganismos del género *Pseudomonas* degradadores de hidrocarburos, se encuentra la especie *aeruginosa*, conocida como bacilo piocianico o de pus azul (Fig. 2a); pertenece a la familia Pseudomonadaeae, subgrupo de las fluorescentes, ya que producen pigmentos verde amarillentos solubles en agua.²⁵ Es un bacilo recto o ligeramente curvado (Fig. 2b), Gram negativo, con olor dulce y aromático debido a la producción de trimetilamina. *Pseudomonas aeruginosa* causa al hombre distintos problemas, pero esta bacteria también tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Así, se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar alcanos de cadena ramificada, produce biosurfactantes que son útiles para la limpieza de aguas contaminadas con hidrocarburos y además posee la capacidad de absorber metales pesados tales como Pb, Cr y Zn.²⁶⁻²⁷ Cuando, estas bacterias se adhieren a una superficie, las células se diferencian por

formar microcolonias cubiertas por una matriz extracelular que eventualmente llegan a constituir una película. Las bacterias que forman la biopelícula tienen un metabolismo distinto a las células que crecen en medios líquidos, uno de las diferencias más aparentes es su disminuida sensibilidad a antibióticos y otros agentes tóxicos.

La identificación taxonómica, finalmente confirmó que las cepas AT14, AT15, AT16, AT17 y AT18 (Tabla 1), pertenecen a la especie de *Pseudomonas aeruginosa*, que tiene un papel importante en la biodegradación de hidrocarburos. Leahy y Cowel,²⁸ indicaron que los microorganismos degradadores de hidrocarburos más importantes, tanto en aguas como en suelos son: *Pseudomonas* sp., *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium* y *Nocardia*; Así, además Marc Viñas²⁹ encontró en un consorcio microbiano AM, a partir de suelos contaminados con gasoil, tres cepas del género *Pseudomonas*, las que se encuentran dentro de un grupo importante de bacterias degradadoras de petróleo y sus derivados s.³⁰ Este consorcio es capaz de degradar diferentes familias de hidrocarburos de un crudo de petróleo pertenecientes a la fracción saturada y la aromática.³¹⁻³²

Selección de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* degradadora de hidrocarburos

Para la selección de la cepa de *P. aeruginosa* degradadora de hidrocarburos se utilizó su crecimiento sobre petróleo como única fuente de carbono y energía. Todas las cepas mostraron crecimiento (Tabla 2), siendo *Pseudomonas aeruginosa* AT18 la que mayor crecimiento mostró, al obtenerse 1,83 g · L⁻¹ de biomasa celular. Sobre la base de este resultado se seleccionó la cepa AT18 para los ensayos de biodegradación.

La especie *Pseudomonas aeruginosa*, se encuentra entre las de mayor resistencia a ambientes agresivos con capacidad nutricional para mineralizar gran variedad de hidrocarburos del petróleo. Se describe con capacidades para degradar tanto compuestos alifáticos como aromáticos y poliaromáticos en condiciones aerobias, microaerófilas y desnitrificantes.³³⁻³⁴

Sobre esa base, se consideró oportuno realizar un ensayo de crecimiento en placas con medio salino y naftaleno para evaluar la degradación de la fracción aromática del petróleo que es de las más complejas de degradar (Tabla 2). Este ensayo permitió detectar la capacidad degradadora de naftaleno por las cepas aisladas, el cual forma parte de los hidrocarburos aromáticos, específicamente de los policíclicos (HAPs). Estos últimos son los de mayor toxicidad y al mismo tiempo, los más recalcitrantes a los métodos convencionales de remediación. Se

Tabla 2. Crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sobre petróleo y sobre medio salino con naftaleno durante 120 h de incubación.

Cepa	Crecimiento	
	Petróleo Biomasa (g · L ⁻¹)	Medio salino con naftaleno. Halo de degradación.
AT14	0,39 ± 0,02	-
AT15	0,66 ± 0,04	-
AT16	0,78 ± 0,03	+
AT17	1,09 ± 0,06	++
AT18	1,83 ± 0,1	+++

(-) no existencia de halo. (+) halo ≥ 0,5 cm. (++) halo ≥ 0,5 cm ≤ 1,0 cm. (+++) halo ≥ 1,0 cm.

ha descrito una gran variedad de géneros bacterianos degradadores de HAPs, que incluyen: *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Xanthomonas*, según la base de datos publicada por la Universidad de Michigan, que reúne cepas degradadoras de moléculas orgánicas. Es necesario un buen conocimiento y control de la eliminación de los HAPs en los ecosistemas terrestres y acuáticos por los microorganismos para aplicarlo a tecnologías de biorremediación.

Como se observa en la tabla 2, las cepas AT14 y AT15 no crecen sobre naftaleno; mientras que las cepas AT16, AT17 y AT18 mostraron crecimiento positivo sobre la fuente de carbono. El halo de degradación en la cepa *P. aeruginosa* AT18 fue el de mayor diámetro ($\Phi > 1$ cm), el cual se debe a la ruptura del anillo y formación de los intermediarios de oxidación.

Dado los resultados (Tabla 2), se seleccionó la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18 para el estudio de biodegradación de hidrocarburos, a la cual se le realizó el análisis de secuencias del gen que codifica para el 16S ARNr y análisis de los ácidos grasos, cuyos resultados demostraron que la cepa aislada es 100 % *Pseudomonas aeruginosa*, con un total de 1 482 pares de bases según BLASTN.¹⁷

Degradación de petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* AT18 (CCEBI 1044)

La degradación del crudo de petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* AT18, se estudió durante 480 h de incubación. Ella es capaz de crecer sobre petróleo como única fuente de carbono y energía (Fig. 3), con lo que se alcanza $0,93 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomasa celular a los 420 h de cultivo. La figura 4 muestra un crecimiento diáuxico, característico de la asimilación de dos o más fuentes de carbono.³⁵ La primera fase de crecimiento se inicia entre las 24 y 36 h de incubación hasta las 72 h, tiempo en el que se alcanza $0,31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomasa celular. En las 36 h que duró esta primera fase, la velocidad específica de crecimiento (μ) fue de $3,5 \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$. Finalmente, se observa una segunda fase exponencial entre las 96 y 480 h de incubación con una μ de $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ y $0,95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de biomasa celular.

Se observó que a medida que aumenta el tiempo disminuye la velocidad de crecimiento. Este hecho sugiere una mayor complejidad de las fracciones de petróleo que comienzan a degradarse en las diferentes fases de crecimiento.

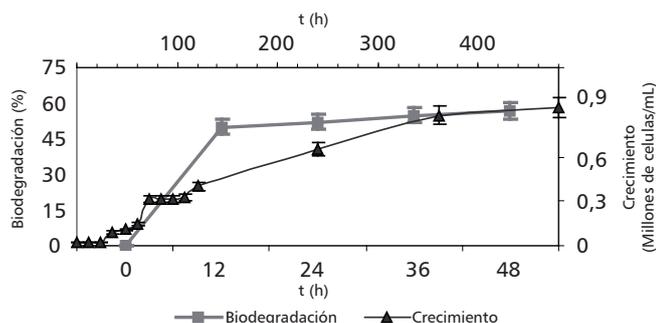


Fig. 3. Cinética de la biodegradación de petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* AT18.

En la primera etapa, se deben degradar las fracciones más sencillas del crudo: n-alcenos y parafinas de cadenas cortas, las cuales se incorporan por oxidaciones sucesivas a través de la β -oxidación.³⁶ Los hidrocarburos alifáticos son los que se degradan con la mayor rapidez, se oxidan sus moléculas y se incrementa su solubilidad. La mayoría de los microorganismos convierten el n-alceno al correspondiente alcohol terminal por medio de mono-oxigenasas, la cual hidroliza el carbono terminal mayoritariamente mediante la utilización del átomo de una molécula de oxígeno como aceptor terminal de electrones.³² Esto explica que la velocidad de crecimiento diáuxico que presenta *Pseudomonas aeruginosa* AT18 sobre petróleo (Fig. 3) puede deberse a las características de este sustrato (mezcla compleja crecimiento en esta primera fase sea 10 veces mayor que en la segunda fase exponencial, en la cual presumiblemente se degraden las fracciones más pesadas (isoprenoides, alcanos de cadenas largas de más de 20 átomos de carbono, cicloalcanos y aromáticos). Varios estudios reportan biodegradación de los hidrocarburos aromáticos y n-alcenos bajo condiciones aeróbicas.³⁷⁻³⁹

De acuerdo con el comportamiento de los porcentajes de biodegradación de petróleo a las 120, 240, 360 y 480 h de cultivo por la cepa *Pseudomonas aeruginosa* AT18 (Fig. 3), se pudo constatar que se incrementa del 50 % a las 120 h al 57 % a las 480 h de cultivo, siendo el incremento pequeño, el cual disminuye a medida que aumenta el tiempo de incubación, resultado este que se corresponde con el consumo de petróleo ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) en los diferentes tiempos analizados (Tabla 3).

La mayor degradación de petróleo tuvo lugar a las 120 h de incubación (50 %), para finalmente, alcanzar una actividad biodegradativa de ($57 \pm 2,5$) % a las 480 h de incubación (Fig. 3). La disminución de la cantidad promedio de petróleo por día puede deberse a la inhibición por toxicidad de la fuente de carbono, a la degradación incompleta y a compuestos tóxicos que se formen como resultado de la degradación del parental.³⁸ *Pseudomonas aeruginosa* AT10 degradó en 20 d de incubación solo el 50 % de la fracción alifática del crudo ligero Casablanca.⁴⁰

El perfil cromatográfico de la muestra (b), mostró una marcada diferencia con el cromatograma control [Fig. 4(a)] *Pseudomonas aeruginosa* AT18 degradó toda la fracción alifática de los alcanos e isoprenoides comprendida entre C_8 y C_{40} [Fig. 4(b)]. La degradación de los n-alcenos, ocurre aeróbicamente por oxidaciones sucesivas de las moléculas hasta la formación de ácido carboxílico correspondiente, el cual es incorporado directamente en la β -oxidación. La vía oxidativa más común es la oxidación terminal: alcano (C-C) — alcohol (C-OH) --- aldehído (C=O) --- ácido carboxílico (COOH) ---- β oxidación.⁴¹⁻⁴²

CONCLUSIONES

Después de haber analizado todas las muestras recogidas de los suelos contaminados con petróleo de la Refinería "Hermanos Díaz", se obtuvieron 9 cepas

Tabla 3. Consumo de petróleo por *Pseudomonas aeruginosa* AT18.

Tiempo (h)	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$
120	$2,04 \pm 0,12$	$0,41 \pm 0,12$
240	$2,19 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,06$
360	$2,34 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,02$
480	$2,43 \pm 0,01$	$0,12 \pm 0,01$

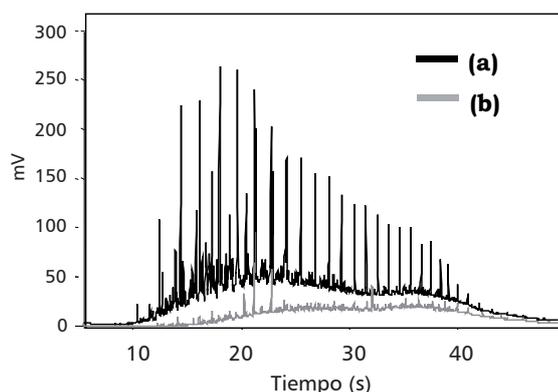


Fig. 4. Cromatograma del crudo de petróleo Mesa 30/Puerto Escondido: antes (a) y después (b) del tratamiento con *Pseudomonas aeruginosa* AT18 durante 480 h de incubación.

bacterianas, cinco Gram negativas y cuatro cepas Gram positivas y se escogieron las bacterias Gram negativas para el estudio de degradación del petróleo Mesa 30/Puerto Escondido (80 : 20).

La población bacteriana Gram negativa aislada estuvo representada por el género *Pseudomonas* y las cepas AT14, AT15, AT16, AT17 y AT18 fueron de la especie *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria capaz de utilizar una enorme variedad de compuestos orgánicos como sustratos para crecer, capacidad que le permite colonizar nichos y ambientes inhóspitos en los que son escasos los nutrientes y que otros organismos no pueden asimilar. Las cepas aisladas fueron capaces de crecer sobre petróleo como única fuente de carbono y energía, siendo la *Pseudomonas aeruginosa* AT18, la que mostró mayor crecimiento sobre petróleo al lograr llevar a cabo su biodegradación hasta un 57 %.

BIBLIOGRAFIA

1. Wedel R. *et al.* Bacterial degradation of petroleum hydrocarbon in groundwater, in situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in California. **Water Science in Technology**, **20**, 501, 1988.
2. Sirvins A. y Tramier B. La biodegradación de los hidrocarburos. **Mundo Científico**, **54**, 46, 1993.
3. Amann R.I., Ludwig W. and Schleifer K.H. Phylogenetic Identification and In situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. **Microb. Rev.**, **59**, 143, 1995.
4. Head I.M., Saunders J.R. and Pickup R.W. Microbial evolution, diversity and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. **Microb. Ecol.**, **35**, 1, 1998.
5. Delong E.F. Microbial population genomics and ecology: the road ahead. **Environ. Microbiol.**, **6**, 875, 2004.
6. Torvick V., Ovreas L. and Thingstad T.F. Prokaryotic Diversity- Magnitude, Dynamics and controlling Factors. **Science**, **296**, 1064, 2003.
7. Zengler K *et al.* Cultivation the uncultured. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **99**, 1581, 2002.
8. Macnaughton S.J., Stephen J.R., Venosa A.D., Davis G.A, Chang Y.J. and White D.C. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. **Appl. Environ. Microbiol.**, **65**, 3566, 1999.
9. Colores G.M., Macur R.E., Ward D.M. and Inskeep W.P. Molecular analysis of surfactant-driven microbial population shifts in hydrocarbon-contaminated soil. **Appl. Env. Microbiol.**, **66**, 2959, 2000.
10. Roling-Wilfred F.M *et al.* Robust hydrocarbon degradation and dynamics of bacterial communities during nutrient-enhanced oil spill bioremediation. **Appl. Env. Microbiol.**, **68**, 5537, 2002.
11. Rivera Cruz M.C., Ferrera-Cerrato R., Volke V., Rodríguez R. y Fernández L. Adaptación y selección de microorganismos

autóctonos medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo. **Terra**, 423-434, 2002.

12. Pineda-Flores G., Mesta-Howard A.M. Petroleum asphaltens: generated problematic and posible biodegradation mechanisms **Rev. Latinoamericana de Microbiología**, **43**, 143, 2001.
13. Zajic J.E., Guignard H. and Gerson DF. Properties and biodegradation of bioemulsifier from *Corynebacterium hydrocarbonoclastus*. **Biotechnol. Bioeng.**, **19**, 1303, 1977.
14. Bergey's. Manual of Determinative Bacteriology, 9th Ed., Williams and Wilkins, USA. 1994.
15. Wilson K. Preparation of genomic DNA of bacteria. En: F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Scidman J.A, Smith and Struhl K., editors. Current Protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, New York, 241-242, 1987.
16. Edwards U., Rogall T., Blocker H., Emde M. and Bottger E.C. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, **17**, 7843, 1989.
17. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing. **Nucleic Acid Tech. Bact. Syst.**, 115, 1991.
18. Altschul S.F *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLASDT: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Res.**, **25**, 3389, 1997.
19. Pearson W.R. and Lipman D.J. Improved tools for biological sequence analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, **85**, 2444, 1988.
20. Maidak B.L. *et al.* The RDP (Ribosomal Database Project) continues. **Nucleic Acids Res.**, **28**, 173, 2000.
21. Dejonghe W., *et al.* Synergistic degradation of linuron by bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading Variovorax strain. **Applied and Environmental Microbiology**, **69**, 1532, 2003.
22. Merino F. Estudio de microorganismos productores de emulsificantes de petróleo. UNMSM, Lima-Perú, (Tesis para optar por el título de magíster, 1998.
23. Atlas R. and Bartha R. The microbiology of aquatic oil spills. **Adv. Appl. Microbiol.**, **22**, 225, 1977.
24. White K.L. Jr. An overview of immunotoxicology and carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Carcinogenesis Reviews**, **4**, 163, 1986.
25. Langwaldt J.H. and Puhakka J.A. On-site biological remediation of contaminated groundwater a review. **Environ. Pollut.**, **107**, 187, 2000.
26. Abalos A., Viñas M., Sabate J., Manresa A. and Solanas A. Enhanced biodegradation of casa blanca oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. **Biodegradation**, **15**, 249, 2004.
27. Hussein H., Farag S., Kandill K. and Moawad H. Tolerance and uptake of heavy metals by *Pseudomonas*. **Process Biochemistry**, **40**, 955, 2005.
28. Leahy J. and Colwell R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, **3**, 305, 1990.
29. Viñas M. Biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos: caracterización química, microbiológica y ecotoxicológica. Facultat de Biología, Departament de Microbiologia, Universitat de Barcelona-España (Tesis en opción del título de Doctor), 2005.
30. Van Hamme J.D., Singh A. and Ward O.P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, **67**, 503, 2003.
31. Abalos A., Viñas M., Sabate J., Manresa M.A. and Solanas A.M. Enhanced biodegradation of Casablanca Crude Oil by a Microbial Consortium in presence of a Rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. **Biodegradation**, **15**, 249, 2004.
32. Viñas M., Grifoll M., Sabate J. and Solanas A.M.. Biodegradation of a crude oil by three microbial consortia of different origins and metabolic capabilities. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, **28**, 252, 2002.
33. Whyte L.G., Bourbonnière L. and Greer C.W. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotropic *Pseudomonas* strain possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) caabolic pathways. **App. Env. Microbiol.**, **63**, 3719, 1997.

34. Chayabatra Ch. and Ju L.K. Degradation of n-hexadecane and its metabolites by *Pseudomonas aeruginosa* under microaerobic and anaerobic denitrifying conditions. **Appl. Env. Microb.**, **66**, 493, 2000.
35. Schlegel H.G. General microbiology. 7a Ed. Cambridge University Press, 224-249 and 446-464, 1993.
36. Maier R.M. Bioavailability and its importance to bioremediation. Chapter in: Bioremediation, (J.J. Valdes, ed.) Kluwer Academic Publisher Norwell MA., 59-78, 2000.
37. Erickson M., Swartling A. and Dalhammar G. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid-phase micro-extraction and GC-MS. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **50**, 129, 1998.
38. Gallego L.R., Laredo J., Llamas J.F., Vázquez F., and Sánchez J. Bioremediation of diesel - contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, **12**, 325, 2002.
39. Salminen J.M., Tuomi P.M., Suortti A.M. and Jørgensen K.S. Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. **Biodegradation**, **15**, 29, 2004.
40. Solanas A.M., Pares R., Bayona J.M. & Albaiges J. Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial cultures. **Chemosphere**, **13**, 593, 1984.
41. Harayama S., Kishira H., Kasai Y and Kasuaki S. Petroleum biodegradation in marine environments. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, **1**, 63, 1999.
42. Maier R., Pepper I. and Gerba C. Microorganisms and organic pollutants. In Environmental Microbiology, Academic Press ed., 363-400, 2000.



ALMA MATER

15. Escuela Internacional de Verano en Ciencia y Tecnología de los Materiales

Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales
Universidad de la Habana
7 al 18 de julio de 2008, Ciudad de La Habana, Cuba.

La 15. Escuela Internacional de Ciencia y Tecnología de Materiales se llevará cabo en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales de la Universidad de la Habana, Cuba, del 7 al 18 de julio de 2008.

Este instituto fue creado en 1985 con el nombre de Instituto de Materiales y Reactivos, en estos 24 años de creado ha hecho una contribución importante a la Ciencia de Materiales del país, siendo sede del programa doctoral y de maestría en dicha especialidad.

La Escuela en esta ocasión contará con los cursos siguientes:

- 1) Obtención de metales.
Coordinador: Dr Guillermo Samalea.
Participación del profesor Fathi Habashi, Canadá.
- 2) Mediciones eléctricas y magnéticas de materiales electrocerámicos.
Coordinador: Dr. Francisco Calderón. Se espera la participación de profesores de la red internacional de ferroléctricos.
- 3) Nuevas aplicaciones del procesado láser de materiales.
Coordinador: Dr. Luis Ponce. Con la participación de profesores de España y México.
- 4) Procesos de corrosión en climas tropicales insulares.
Coordinador: Dr. Francisco Corvo. Se espera la participación de profesores de México.
- 5) Estimación práctica de la incertidumbre en Química Analítica.
Coordinador: Dr. Manuel Álvarez Prieto.
- 6) Miscelas: obtención y caracterización química y estructural.
Coordinador: Prof. Louis Charles Menorval (Francia)

Comité Organizador

Dr. Carlos Rodríguez Castellanos
Dr. Ernesto Estévez Rams
Dr. Gerardo Rodríguez Fuentes
Dra. Beatriz Concepción Rosabal
Sra. Lisette Navarrete Quesada

Contactos y correspondencia

Sra. Lisette Navarrete Quesada, E-mail: Lisette:lise@imre.oc.uh.cu
Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales, Universidad de la Habana, Calzada de Zapata entre Calles G y Mazón, El Vedado, Ciudad de La Habana. Código Postal 10400, Cuba. Teléfonos: (537) 870 7666; 870 5707. Fax: (537) 879 4651.