

# Aislamiento de microorganismos oligotróficos degradadores de hidrocarburos en la Bahía de Cartagena, Colombia

## *Isolation of oligotrophic microorganisms oils degraders in the Bay of Cartagena, Colombia*

Fecha de recepción: 2012-02-03 / Fecha de aceptación: 2012-08-10

Diana María Quintana-Saavedra <sup>1</sup>, Melody Cabrera <sup>2</sup>, Gustavo Tous Herazo <sup>3</sup> y Gustavo Echeverry <sup>4</sup>

<sup>1</sup> **Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe (CIOH).** Laboratorio de Microbiología. Barrio El Bosque, Isla de Manzanillo, Escuela Naval "Almirante Padilla" Cartagena, Bolívar, Colombia. Tel: +57 (5) 669 41 04 ext. 5107. Correo electrónico: diana.quintana@dimarmil.co/dianamariaq@gmail.com

<sup>2</sup> **Facultad de Bacteriología.** Universidad de San Buenaventura. Correo electrónico: cristy267@hotmail.com

<sup>3</sup> **Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe (CIOH).** Laboratorio de Microbiología. Barrio El Bosque, Isla de Manzanillo, Escuela Naval "Almirante Padilla" Cartagena, Bolívar, Colombia. Tel: +57 (5) 669 41 04. Correo electrónico: GTous@dimar.mil.co

<sup>4</sup> **Facultad de Bacteriología.** Universidad de San Buenaventura. Correo electrónico: Gustavo.echeverry@gmail.com

**Quintana-Saavedra, D.M., Cabrera, M., Tous, G. y Echeverry, G. 2012.** Aislamiento de microorganismos oligotróficos degradadores de hidrocarburos en la Bahía de Cartagena, Colombia. Bol. Cient. CIOH (30):3-12.

## RESUMEN

La Bahía de Cartagena, uno de los principales puertos en el Caribe colombiano, se caracteriza por tener un elevado tránsito marítimo, el cual representa un alto grado de exposición a contaminación por agua con mezcla de hidrocarburos procedentes de las embarcaciones que transitan en este puerto o a través de derrames ocasionales de embarcaciones menores que afectan el ecosistema estuarino. En este estudio, realizado en marzo de 2010, se recolectaron muestras de agua de mar, en nueve estaciones a tres profundidades en la columna de agua (superficie, medio y fondo). Los resultados obtenidos registraron que las estaciones donde se encontró mayor biodegradación con mayor crecimiento, emulsificación y turbidez, se encuentran cercanas a zonas vulnerables de contaminación por hidrocarburos, como: Ecopetrol-S, Ecopetrol-Fondo, Boya 19-S, B27-S, B27-M, B30-S, B30-M y Sociedad Portuaria.

Los microorganismos identificados fueron clasificados a través de la composición de su pared celular mediante tinción de Gram, en la cual se estableció que la microbiota dominante en las muestras aisladas eran Gram negativos, con forma bacteriana bacilar, coco bacilar y cocoides compatibles con los géneros *Pseudomonas* sp. y *Bacillus subtilis*. No obstante, se observaron bacilos y cocos Gram positivos compatibles con el género *Staphylococcus* sp. en menor proporción, provenientes generalmente de las partes más profundas de la columna de agua.

Mediante este estudio se logró el aislamiento de microorganismos nativos de la bahía, con capacidad de degradar petróleo crudo como fuente de energía, en aras de conformar un cepario de microorganismos biodegradadores que puedan ser empleados por la Autoridad Marítima Nacional, como alternativa biotecnológica que permita la aspersión de microorganismos sobre manchas de hidrocarburos, lo cual requerirá a futuro de ensayos controlados a escala de laboratorio, para su posterior escalamiento a campo como potencial respuesta de contingencia frente a derrames de crudo en la Bahía de Cartagena.

**Palabras clave:** biodegradación, hidrocarburos, agua de mar, emulsión y bacterias.

## ABSTRACT

The Bay of Cartagena is one of the main ports in the Colombian Caribbean Sea and it is characterized by a high maritime transit, which represents a high degree of exhibition contamination by seawater of well coming from the boats that journey in this port. These waters are characterized by a high content in oil remainders that get to affect the estuarino ecosystem. Water samples were collected in 9 stations to three depths in the water column (surface, means and bottom). The obtained results registered that the stations where a greater growth, emulsification and turbidity was are near vulnerable zones of contamination by hydrocarbons, like: ECOPEtrol-S, ECOPEtrol-Bottom, and Buoy 19-S, B27-S, B27-M, B30-S, B30-M and Harbor Society.

The identified microorganisms were classified through the composition of their cellular wall by means of dye of Gram, in which it settled down that microbiota dominant in the isolated samples was negative Gram, with bacillary bacterial form, the bacillary Coco and compatible with the *Pseudomonas* sp, sorts sp. and *Bacillus subtilis*. However, it was possible to be observed compatible bacilli and positive Gram cocco generally with the *Staphylococcus* sp sort in smaller proportion, originating of the deepest parts from sections of the water column.

Through this study we got isolating native microorganisms capable of degrading Bay crude oil as an energy source, in order to form a strain collection microorganisms which may be employed as an alternative for the biotechnological DIMAR like alternative of microorganisms on oil spills, which will require future controlled trials to laboratory scale for subsequent scaling to field as potential contingency response against oil spills in the Bay of Cartagena.

**Key words:** biodegradation, hydrocarbons, seawater, emulsion y bacteria.

## INTRODUCCIÓN

En Colombia se encuentran diferentes sistemas marino-costeros expuestos a diferentes problemas ambientales, es el caso del ecosistema acuático de la Bahía de Cartagena, en el departamento de Bolívar, cuya calidad de aguas se encuentra influenciada por la desembocadura del Canal del Dique, aguas residuales y contaminantes producto de actividades marítimas, encontrándose así expuesta a la presencia de diversos contaminantes de tipo orgánico e inorgánico, provenientes de diferentes fuentes [1]. Los efectos sobre la biota marina se subdividen en tres grupos: efectos letales, que provocan la muerte de las especies; subletales, que sin llegar a provocar la muerte, la ingestión de estos hidrocarburos, principalmente los

aromáticos policíclicos (HAP), puede llegar a producir trastornos genéticos, fisiológicos y bioquímicos en los organismos marinos, disminuyendo su viabilidad, y por último, efectos indirectos en la perturbación de los ecosistemas, al desencadenar cambios en la estructura de las comunidades ecológicas y sus interacciones [2].

Históricamente, la Bahía de Cartagena ha presentado niveles altos de hidrocarburos que superan el máximo permisible por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (Unesco) para aguas marinas y costeras no contaminadas (10µg/L) [1], cuya causa principal se presume sean residuos provenientes de las refinerías de petróleo, buques de carga y transporte, además de residuos industriales, aguas de sentinas con contenido residual, encontrándose así (Tabla I):

**Tabla I.** Registro histórico de concentración de hidrocarburos en la Bahía de Cartagena. (RedCAM, unidades µg/L).

Estación	2001	2002	2003	2004	2005	2006	Promedio
Frente a Base Naval	-----	1	7,26	0,17	0,24	-----	2,168
Frente a Isla Arena	MLD*	MLD	MLD	-----	-----	-----	MLD
Frente a CENIACUA	MLD	MLD	MLD	-----	-----	-----	MLD
Frente al emisario de ACUACAR-ENAP	21	61	4	-----	-----	-----	28,667
Boya de señalización N° 6-COTECMAR	11,23	15,5	3	-----	-----	-----	9,91
Boya roja N° 50 Frente al Muelle Oceanográfico	6,16	4,75	5,04	-----	-----	-----	5,317
Frente a Tierrabomba	5,26	2,4	4,55	-----	-----	-----	4,07
Desembocadura Canal del Dique	31,23	39	18,4	-----	-----	-----	29,543

\*MLD: Menor del Límite de Detección, no citado por la referencia [1].

La biodegradación es el proceso natural más importante para eliminar los hidrocarburos del petróleo presentes en el medio marino mediante la transformación de estos en oxígeno, dióxido de carbono y agua. Este proceso se lleva a cabo por microorganismos capaces de crecer y desarrollarse en el medio, usando dicha materia orgánica como sustrato y fuente de energía [3].

La inoculación directa de microorganismos degradadores de petróleo, principalmente bacterias, ha sido estudiada como una vía para disminuir las consecuencias nocivas de un derrame [4].

En el caso específico de compuestos derivados del petróleo que son vertidos de manera accidental dentro del agua, ha permitido el desarrollo potencial del crecimiento de diferentes

grupos de microorganismos con capacidad de metabolizarlos [5][6].

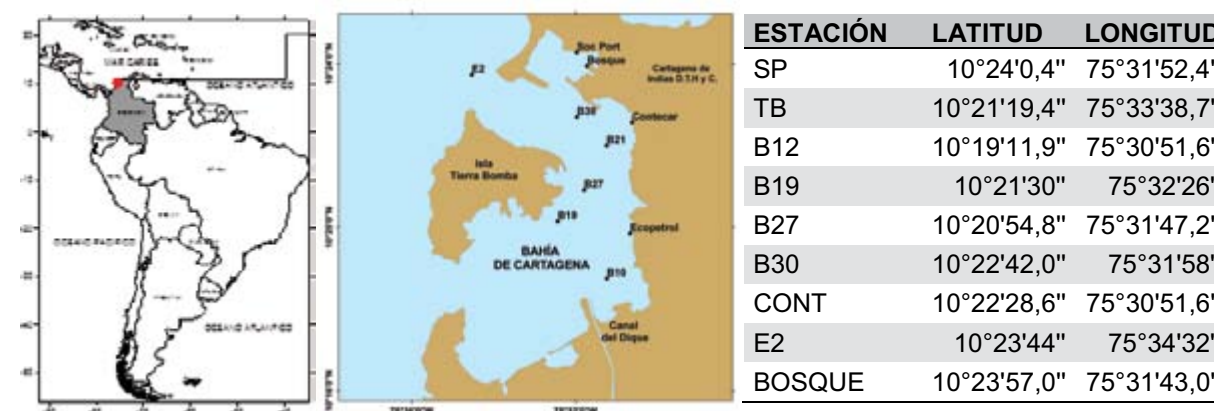
Se conoce que los microorganismos, en especial las bacterias, tienen la capacidad de utilizar los hidrocarburos alifáticos y aromáticos como fuente de carbono y energía, a través de diferentes rutas [8][9][10][11][12].

Estas características están siendo utilizadas como alternativa desde la biotecnología, para el control y la recuperación de los ecosistemas impactados por derrames de petróleo o derivados de hidrocarburos, siendo la degradación microbiana un proceso de descontaminación natural; éste puede acelerarse y/o mejorarse mediante la aplicación de tecnologías de biorremediación [11].

El Centro de Investigaciones Oceanográficas e Hidrográficas del Caribe (CIOH), de la Autoridad Marítima Nacional, desarrolla diferentes temáticas de investigación enmarcadas dentro de la Agenda Científica Centros de Investigación Dimar (2011-2018), el Plan Estratégico de Desarrollo (2011-2019) de Dimar y el artículo 5 del Decreto ley 2324 del 1984, buscando el desarrollo de la investigación científica marina y el aprovechamiento de los recursos del mar, tendientes a la preservación y protección del medio marino, a través de su línea de investigación en calidad del agua, proyectó evaluar los principales microorganismos que pudiesen biodegradar hidrocarburos asilados en la Bahía de Cartagena.

## ÁREA DE ESTUDIO

La Bahía de Cartagena se encuentra localizada al noreste de Suramérica, en el Caribe colombiano entre las latitudes 10°16' N y 10°26' N y las longitudes 75°36' W y 75°3'0 W. Está separada del Mar Caribe por la Isla de Tierrabomba, conformando una cuenca somera de 82 km<sup>2</sup> de extensión aproximada, con profundidades promedio y máxima de 16 y 26 m, respectivamente, que se comunica con el Mar Caribe a través de los canales de Boca Grande y Bocachica (Figura 1).



**Figura 1.** Ubicación de las estaciones evaluadas 1. SPRC: Sociedad Portuaria, 2. ECS Ecopetrol, 3. TB: Tierrabomba, 4. B12: Boya 12, 5. B19: Boya 19, 6. B27: Boya 27, 7. B30: Boya 30, 8. CONT: Contecar, 9. E2: Escollera, 10. MB: Muelles El Bosque. (Adaptado de [13]).

## METODOLOGÍA

El monitoreo realizado en 2010, abarcó nueve estaciones, tal como se señala en la Figura 1. En cada estación se tomaron muestras a tres profundidades de la columna, 1 m debajo de la superficie, 1 m arriba del fondo y a nivel medio. Las campañas de monitoreo se realizaron en marzo de 2010. Se recolectaron en total 27 muestras de agua, empleando para su recolección una botella Niskin de 5 L. El agua recolectada en la botella se subdividió en dos, una primera muestra de aproximadamente 400 ml para análisis microbiológico y una segunda para la evaluación fisicoquímica en tres recipientes de 1 L y de uno de 500 ml. Las muestras recolectadas fueron almacenadas en neveras y preservadas bajo lineamientos de una metodología estándar [12]. Las muestras del componente microbiológico se

procesaron por duplicado para cada una de las etapas.

La evaluación de las características fisicoquímicas se realizó bajo los protocolos de análisis [12] [13], cuya base metodológica se encuentra plasmada en los procedimientos técnicos del laboratorio del CIOH, las técnicas usadas para determinación de los parámetros fisicoquímicos incluyen las siguientes: para pH, potenciométrica; para nutrientes (amonio, nitrato, nitrito y ortofosfatos), espectrofotométrica; para sólidos suspendidos totales, gravimétrica; para oxígeno disuelto, el método de Winkler y para salinidad, conductividad.

El aislamiento de microorganismos degradadores se realizó bajo dos etapas: una de preenriquecimiento y otra de enriquecimiento, empleando petróleo crudo como fuente de carbono.

El preenriquecimiento se realizó en un medio líquido que contenía 0,9 mg/L de  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  más 1 % de petróleo crudo, siendo la sal la fuente de nitrógeno y fósforo [6], y el petróleo la fuente de carbono del medio. Este paso consistió en la adición de 1 ml de la muestra en 9 mL de caldo de preenriquecimiento la cual se incubó por 7 días a 37°C. Transcurrido este tiempo, se continuó con la etapa de enriquecimiento, tomando 1 mL del cultivo e inoculándolo en un Medio Mínimo de Sales (MMS), con un 1 % de petróleo crudo, estimulando así el crecimiento de los microorganismos que se recuperaron en la etapa anterior [6] [14].

Transcurridos 21 días de incubación, se realizaron aislamientos en agar nutritivo y en agar MMS + 1 % de petróleo crudo con el fin de registrar el crecimiento de las diferentes colonias de microorganismos degradadores y así comparar los morfotipos más predominantes.

Para el aislamiento en medio sólido se cultivó en agar nutritivo a partir de los cultivos líquidos, una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  de cultivo crecido en medio MMS + 1 % de petróleo crudo y se sembró masivamente con la ayuda de un asa de Drigalsky, esparciéndose homogéneamente en toda la placa. Se procedió a incubar por 24 horas a 30°C tiempo después del cual se evaluó macro y microscópicamente cada una de las colonias de microorganismos, de este modo se compararon la variedad de morfotipos y la dominancia de formas bacteriana. Los cultivos provenientes del aislamiento en Agar MMS (Medio Mínimo de Sales) + 1% de petróleo crudo, tras 21 días se sembraron por agotamiento en el medio, tomando la precaución de no arrastrar el petróleo. Con el fin de llegar a nivel de género, se realizaron pruebas bioquímicas a partir del crecimiento en medio sólido.

## RESULTADOS

Como resultado de la determinación del comportamiento de las condiciones fisicoquímicas en la Bahía de Cartagena, se pudo valorar la concentración de los nutrientes en la columna de agua, específicamente de fuentes de Nitrógeno y Fósforo, de los cuales se pudo establecer que su comportamiento cambia conforme la estación monitoreada. Es así como, las estaciones con mayor concentración de nitratos y ortofosfatos registraron en la Sociedad Portuaria y Ecopetrol, con picos de concentración para ortofosfatos en la Boya 19, superficie (0,4593 mg/L), de igual forma

para amonio en la Boya 27 medio (0,141 mg/L) y para nitratos (0,2346 mg/L); en Ecopetrol, superficie y para nitritos (0,0326 mg/L) en la Boya 19 medio. Dichas concentraciones pueden estar indicando un mayor aporte de aguas residuales domésticas en la bahía, proveniente del emisario submarino o aportes de carácter continental proveniente del Canal del Dique, el cual eleva los nutrientes presentes en los diferentes estratos de la columna de agua.

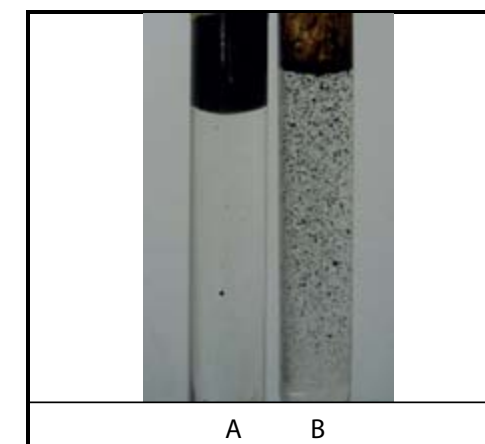
En términos de sólidos suspendidos totales (SST) y turbidez las estaciones que mostraron mayores niveles fueron Sociedad Portuaria, Ecopetrol, Boya 19 y Muelles El Bosque. El pH se comportó de manera homogénea en todas las estaciones excepto para la estación Sociedad Portuaria, superficie (6,4 u). Las concentraciones de oxígeno disuelto fluctuaron a lo largo de la bahía, siendo la estación Sociedad Portuaria la que registró los valores más bajos para este parámetro (superficie 3,45 mg/L, medio 3,53 mg/L y fondo 3,53 mg/L). Históricamente la bahía ha manejado concentraciones de oxígeno entre 2 y 8,7 mg/L [15], por tanto el hecho de registrar concentraciones inferiores a 5 mg/L indica que existen lugares en la bahía en donde se favorecen procesos anaeróbicos de degradación y por tanto complicaciones en el equilibrio del sistema acuático.

En términos de salinidad de la bahía, se registraron valores entre los 34 y 36, característicos de la época seca de marzo, que indica la influencia marina en la bahía y los bajos caudales del Canal del dique. La única estación que mostró una salinidad diferente fue la de Ecopetrol, superficie con 24,6. La temperatura promedio del agua de la bahía para el monitoreo realizado estuvo en 28,35 °C.

En términos de la evaluación de microorganismos biodegradadores, se encontró que las muestras inoculadas en los caldos de preenriquecimiento se formaron desde los primeros días de incubación hasta la incubación final, formando emulsiones agua-aceite tras la utilización del petróleo como fuente de carbono, estas emulsificaciones se forman por la acción de microorganismos sobre los hidrocarburos tanto alifáticos como aromáticos sujetos al ataque microbiano [8] [16]. Se conoce que muchas bacterias degradadoras de hidrocarburos son capaces de producir surfactantes/emulsificantes que les facilita la asimilación de estos sustratos insolubles [17], producto de un mayor contacto con el contaminante [18].

De hecho en un estudio realizado por [19], se encontró adicional a la emulsificación la turbidez del medio esta característica asociada al crecimiento microbiano, quienes aseveraron que "la turbidez es un indicador confiable del crecimiento microbiano en condiciones ricas de

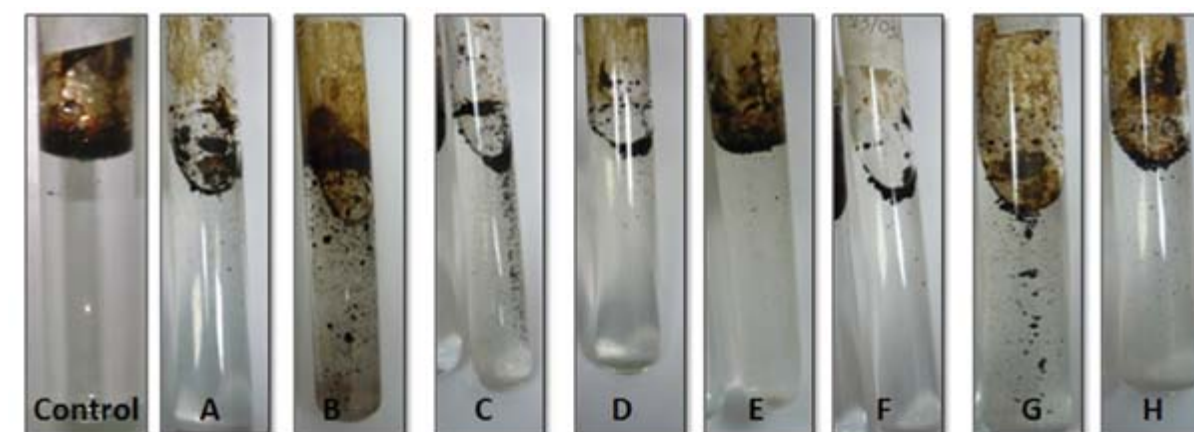
carbono". Los cultivos a los 21 días ya exhibían turbidez en dos estaciones, por lo que su proceso de adaptación fue mucho más rápido que el resto, quienes mostraron cierto grado de turbidez a los 42 días de incubación, disminuyendo así la tensión superficial.



**Figura 2.** Presencia de turbidez y emulsificación en los cultivos de enriquecimiento con 1 % de PC tras 21 días de incubación: **A.** Tubo control. **B.** Tubo con inoculo.

Las estaciones donde se encontró una mayor emulsificación y turbidez, se encuentran cercanas a zonas vulnerables de contaminación por hidrocarburos, como: Ecopetrol-S, Ecopetrol-Fondo, Sociedad Portuaria-Medio y Sociedad Portuaria-Fondo, y la estación Muelle El Bosque-Medio y Fondo, lugares que se encuentran expuestos a contaminación por hidrocarburos, atribuidas al vertimiento de residuos de sentinas, lubricantes quemados, residuos de combustibles o derrames ocasionales que aportan residuos de hidrocarburos a la Bahía de Cartagena [21].

Se evidenció también mayor emulsificación en estaciones como las boyas estuarinas B19-S, B 27-S, B27-M y B27-F (figuras 2 y 3). Siendo estas estaciones áreas que han estado expuestas o que tiene riesgo de serlo, se sabe que los residuos procedentes de las refinerías en la columna de agua pueden llegar a extenderse desde 200 m a un kilómetro, desde el punto de descarga y, en consecuencia, puede reflejarse en la calidad de sus aguas, así como en la estructura de su comunidad [20].



**Figura 3.** Presencia de turbidez en muestras EC-S (A), EC-M (B), SPRC-M (c.), SPRC-F (D.), B30-S (E), B30-F (F), B27-S (G), B27-F (I) y B19-S (H), luego de 21 días de incubación.



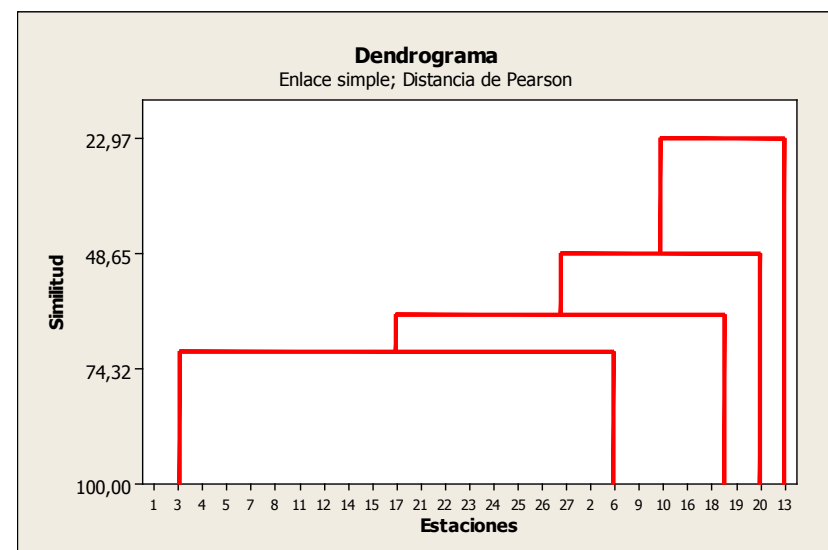
Como parte del proceso de evaluación de las cepas, en caldo líquido se observó que las colonias que crecieron biosurfactaron el petróleo empleado y exhibieron una tonalidad color café, con la formación de finas gotas de grasa pequeñas y finas, previamente reportadas por [6] [19], al ser cultivadas en placa.

Las colonias encontradas en agar nutritivo mostraron varios morfotipos, donde predominó la presencia de colonias con consistencias cremosas elevadas, convexas planas y cremosas, con colores blancos, crema o amarillas, en otros casos transparentes. Esta misma heterogeneidad en las características macroscópicas en medio sólido fue observada por [19]. En su estudio, donde hallaron colonias del tipo puntiforme, circulares y alargadas, márgenes lisos e irregulares, convexas y planos; de colores transparentes, amarillos, rosados y blancos.

Buscando establecer la relación entre los morfotipos encontrados versus la estación en la que se tomó la muestra se realizó un análisis de agrupamiento, empleando como coeficiente de similitud el de Pearson, se trabajó con un nivel de confianza del 95 %.

En el dendograma generado a través del programa estadístico Minitab (Figura 4) se aprecia que la mayoría de microorganismos hallados corresponden a Gram negativos (74 %) en formas bacilares, tras 21 días de incubación. En algunas estaciones (2, 6, 9, 10 y 16) se observaron tanto bacilos Gram positivos como bacilos Gram negativos.

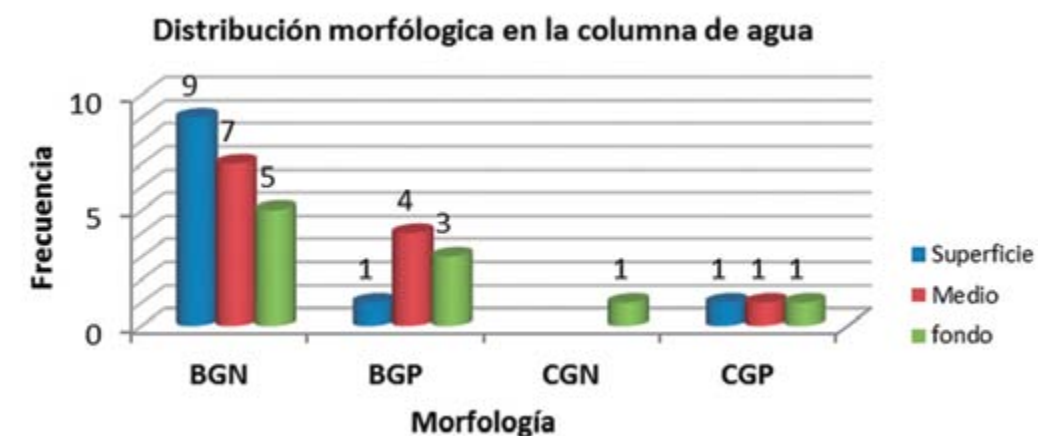
Sin embargo, en estaciones como 18 y 19 sólo se observan cocos Gram negativos, en las estaciones 20 y 13 cocos Gram positivos y Gram negativos.



**Figura 4.** Dendrograma de asociación en morfotipos con cada estación en la Bahía de Cartagena luego de 21 días de incubación. **1.** SPRC-S. **2.** SPRC-M. **3.** SPRC-F. **4.** EC-S. **5.** EC-M. **6.** EC-F. **7.** T/BOMBA S. **8.** B12S. **9.** B12M. **10.** B12F. **11.** B19S. **12.** B19M. **13.** B19F. **14.** B27S. **15.** B27M. **16.** B27F. **17.** B30S. **18.** B30M. **19.** B30F. **20.** CONTS. **21.** CONTM. **22.** CONF. **23.** E2S. **24.** E2M. **25.** MBS. **26.** MBM. **27.** MBF.

A través de pruebas bioquímicas se determinó que los microorganismos aislados son compatibles con los géneros *Pseudomonas sp.*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus sp* en menor proporción, habitantes de la columna de agua [22] [23]. A través de los resultados se observó una estratificación en la cual los microorganismos Gram negativos se ubicaron en la superficie de la columna, contrario a los bacilos Gram

positivos, cocos Gram negativos y cocos Gram positivos. En este sentido, se sabe que a medida que se desciende en la columna de agua, la distribución cambia y se favorece especialmente en estratos cercanos a nivel del fondo bacilos Gram positivos, así como cocos Gram positivos, correspondientes a géneros como *Bacillus* (Figura 5), [6] [24], *Micrococcus* [10], *Rhodococcus* [25], *Mycobacterium* y *Micrococcus* [10].



**Figura 5.** Distribución bacteriana en la columna de agua en estaciones de la Bahía de Cartagena. BGN: Bacilos Gram Negativos; BGP: Bacilos Gram Positivos; CGN: Cocos Gram Negativo, y CGP: Cocos Gram Positivos.

Teniendo en cuenta que los ecosistemas marino-costeros poseen diferentes respuestas conforme a la concentración de nutrientes del sistema, se encontró que en el caso de la Bahía se registraron picos de concentración para ortofosfatos en la Boya 19 Superficie (0,4593mg/L); para amonio en la Boya 27 Medio (0,141 mg/L); para nitratos (0,2346 mg/L) en Ecopetrol Superficie, y para nitritos (0,0326 mg/L) en la Boya 19 Medio. Este aspecto es un indicador de la capacidad que tiene el sistema para permitir el crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos y de esta forma contribuir a la autodepuración del sistema [26] [27]; por tanto, en caso de que se requiera aplicar estrategias de biorremediación se recomienda realizar ensayos de laboratorio con las cepas aisladas y formular el medio de cultivo conforme a la naturaleza del ecosistema [28] [29].

## DISCUSIÓN

La importancia de conocer las características fisicoquímicas de la Bahía de Cartagena radica en conocer las condiciones iniciales del medio en el que crecen los diferentes microorganismos con capacidad biodegradadora de hidrocarburos, de forma tal que se pueda simular dichas condiciones en futuros procesos biotecnológicos.

Los parámetros fisicoquímicos evaluados fueron comparados con los resultados encontrados por [15], para las mismas estaciones de este estudio, quienes registraron que para

la época seca la concentración de nitritos en promedio estuvo en 0,022 mg/L, con mínimos de 0,01 mg/L y máximos de 0,135 mg/L. Sin embargo, los datos registrados en la presente investigación muestran que este parámetro estuvo más elevado, lo cual podría estar asociado a descargas de origen doméstico dentro de la Bahía, dentro de las cuales la principal es la del emisario submarino (10°22'59,8"N y 75°31'42,0"W); sin embargo, la presencia de esta forma del nitrógeno, favorece la población de microorganismos presentes de forma que se pueda biodegradar de forma natural diferentes tipos de contaminantes [35].

Mediante el trabajo desarrollado por Sherill y Sailer, citado en [6], determinaron que existe una mayor capacidad de degradación de hidrocarburos como el fenantreno por parte de microorganismos provenientes de reservorios que recibían residuos tanto industriales como urbanos, comparados con un reservorio sin contacto con estos desechos. Estos mecanismos de adaptación incluyen un previo enriquecimiento selectivo *in situ* y cambios genéticos, resultando en un incremento neto de bacterias que asimilan los hidrocarburos así como aumento en el conjunto de genes catabólicos de hidrocarburos en dicha comunidad, todo esto dentro de un ambiente contaminado [16].

En tal sentido y teniendo en cuenta que en un ecosistema acuático los microorganismos que metabolizan hidrocarburos están ampliamente distribuidos [10], se explica porque se observó turbidez y emulsión en las muestras de diferentes

estaciones en la Bahía, dentro de las cuales La Escollera 2S, estación que a pesar de estar alejada de zonas puntuales de contaminación por hidrocarburos, mostró degradación del hidrocarburo.

Diferentes estudios han mostrado en términos de la capacidad degradadora de hidrocarburos que existe predominancia de morfología bacilares Gram negativas, donde de once cepas seleccionadas horizontalmente que utilizaron como fuente de carbono petróleo crudo, solo tres presentaban respuesta positiva al Gram y el resto eran Gram negativas [6] [16] [25].

Uno de los estudios realizados en el Estuario de Thames en el Reino Unido, aislaron en su totalidad bacterias en forma de bacilo Gram negativas, dentro de los que se encontraba la *Alcanivorax* [36].

Algunos géneros Gram positivos aislados de los mares capaces de degradar hidrocarburos son *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Micrococcus* y cianobacterias [6] [10].

En el medio marino se ha reportado que la mayoría de especies son bacilos Gram negativos, como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* y *Flavobacterium*, así como también *Vibrios* propias únicamente del agua salada, [16] y bacterias autóctonas del medio marinos, como las *Alcanivorax*, *Thalassolituus* y *Cycloclasticus*, importantes en los procesos de biodegradación durante los derrames de crudo y géneros que están tomando mucha importancia actualmente, sobretodo el primero, por producir biosurfactante y tener como fuente de carbono únicamente los alcanos y aromáticos, lo que lo hace incapaz de crecer en presencia de azúcares [10, 30, 31, 32, 35].

## CONCLUSIONES

A través de los resultados encontrados en este estudio, en los cuales se estableció el comportamiento y tipo de microorganismos blanco, así como las zonas donde hubo mayor degradación y emulsificación de petróleo (Ecopetrol-S, Ecopetrol-Fondo, B19-S, B27-S, B27-M y B27-F), en estas zonas la mayoría de los microorganismos presentes en el cultivo de enriquecimiento fueron compatibles con los géneros *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus sp* y *Bacillus subtilis*, constituyéndose en la microbiota dominante en las muestras aisladas.

Asimismo, se determinó que aislar microorganismos de agua estuarina bajo preenriquecimiento selectivo favorece la adaptación al hidrocarburo, permitiendo así una mejor adaptación de las bacterias, que luego beneficia su adaptabilidad tras ser inoculadas en un medio de enriquecimiento, con un tiempo de aclimatación más corto evidenciado por la formación de turbidez generada en el medio tras 21 días de inoculación.

Es así que para Dimar, a través del CIOH, es importante realizar estudios que permitan potencializar los procesos de investigación y soporte técnico en investigación científico-marina enfocada en el aislamiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos, en el ámbito de la preservación y conservación del medio ambiente marino y fomento de la investigación, establecidos bajo el MARPOL73/78, convenio internacional para prevenir la contaminación por buques del 17 febrero de 1978 Anexo I.

## LITERATURA CITADA

- [1] RedCAM. (2009). Troncoso, W., L. Vivas, J., Sánchez, L., Echeverry y Parra J., Diagnóstico y Evaluación de la Calidad Ambiental Marina en el Caribe y en el Pacífico Colombiano. Red de Vigilancia para la Conservación y Protección de las Aguas Marinas y Costeras de Colombia – Informe técnico. Invemar. Santa Marta, 185 pp.
- [2] Freire, J. y Labarta, U. (2003). El Prestige: Impactos sobre los recursos y ecosistemas marinos. *En*: La Huella del Fuel. Ensayos sobre el "Prestige". Ed. Fundación Santiago Rey Fernández-Latorre (A Coruña), pp. 104-1351-28.
- [3] Bergueiro, J. R. y Domínguez, F. (1996). "Evaporación y mezclas de hidrocarburos". Editorial Bilbilis. Pp. 348.
- [4] Lee, K. y Tremblay, G. (1995). "Biorremediación of oiled beach sediments. Assessment of inorganic and organic fertilizers, evolving technologic" *Oil spill Conference*: pp. 107-112.
- [5] Tang, K., Baskaran, V. y Nemati, M. (2009). *An overview of microbiology, biokinetics and their role in petroleum and mining industries. En: Biochemical Engineering Journal.* (44) 73-94.
- [6] Narváez-Flórez, S., Gómez, M. y Martínez, M. (2008). Invemar, Bol. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-Invemar 63 Selección de Bacterias con Capacidad Degradadora de Hidrocarburos Aisladas a Partir de Sedimentos del Caribe Colombiano. *Investigaciones Marinas y Costeras.* 37 (1) 61-75 Santa Marta, Colombia.
- [7] Atlas M. (1981). *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective, Microbiological Reviews,* 45(1), 180-209.
- [8] Leahy, J., y Colwell, R. (1990). *Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. In: Biodegradation,* 54(3), 305-315.
- [9] Harayama, S., Kishira, H., Kasai, Y y Shutsubo, K. (1999). *Petroleum biodegradation in marine environments. In: Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology,* 1, 63-70.
- [10] Jonathan D., Van Hamme., Singh A. y Owen P. Ward. (2003). *Recent Advances in Petroleum Microbiology. Microbiology Molecular Biology Reviews. December* 67 (4) 503-549.
- [11] Canals, M. V. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis Doctoral. Universidad de Barcelona. *En: Microbiología (Madrid).*
- [12] APHA-AWWA-WEF- (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22st Edition.* p 9-66 9222D.
- [13] Parsons-Maita y Lalli C,M. (1984). *A Manual of Chemical and Biological Methods for Sea wáter Analysis,* Primera Edición, reprinted 1985,1989 with corrections, Gran Bretaña.
- [14] Echeverri, G., Manjarrez G., Paba G y Cabrera M. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas.8 (13): 1-120.
- [15] Cañón, M., Tous, G., López, K., López, R. y Orozco, F. (2007). Variación espaciotemporal de los componentes fisicoquímico, zooplanctónico y microbiológico en la Bahía de Cartagena. *En: Boletín Científico CIOH No. 25:* 120-130.
- [16] Harayama S., Kishira H., Kasai Y Shutsubo K. (1999). *Petroleum biodegradation in marine environments. Journal Molecular Microbiology Biotechnology.* Ago. 1(1):63-70.
- [17] Batista, S. B., Munteer, A. H., Amorim, F., y Tótola, M. (2006). *Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. In: Bioresource technology,* 97(6), 868-75. doi: 10.1016/j.biortech.2005.04.020.
- [18] Araujo, I., Gómez, A., Barrera, M., Angulo N., Morillo G., Cárdenas, C y Herrera, L. (2008). Surfactantes Biológicos en la Biorremediación de agua contaminadas con crudo liviano. *En: Interciencia,* 33, (004), 245-250.
- [19] Rivera-Cruz, M.C., Ferrera-Cerrato, R., Volke-Haller, V., Fernández-Linares L. y Rodríguez-Vázquez, R. (2002). *Adaptation and Selection of Autochthonous Microorganisms in Culture Media Enriched with Crude Petroleum. In: Terra,* 20, 423-434.
- [20] Wake, H. (2005). *Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. In: Estuarine, Coastal and Shelf Science,* 62, 131-140.
- [21] Garay, J. (2004). *National Program of Research, Evaluation, Preservation, Reduction and Control of Sea and Land Base Marine Pollution-PNICM. Plan of action 2004 -2014. Institute of Marine and Coastal Research Jose Benito Vives De Andrei-INVEMAR,* Santa Marta, 128 pp.

- [22] Franklin, M.P., McDonald, I.R., Bourne, D.G., Owens, N.J., Upstill-Goddard, R.C. y J.C. Murrell. (2005). *Bacterial diversity in the bacterioneuston (sea surface microlayer): the bacterioneuston through the looking glass*. *In: Environmental Microbiology*, 7(3), 723-736.
- [23] Mendoza, Y., Pérez, G., y G. Lugiayo. (2002). Bacterioplancton de aguas oceánicas al norte de Cuba: distribución espacial. *En: Revista Investigaciones Marinas*, 23(1), 27-34.
- [24] Nair, D., Ferna, F. J., y García, E. (2008). *Isolation and Characterization of Naphthalene-Degrading Bacteria from Sediments of Cadiz Area (SW Spain)*. *In: Environmental Toxicology*, 576-582.
- [25] Tapilatu, Y., Acquaviva, M., Guigue, C., Miralles, G., Bertrand, J., P. Cuny. (2010). *Isolation of alkane-degrading bacteria from deep-sea Mediterranean sediments*. *In: Letters in Applied Microbiology*, 50, 234-236.
- [26] Bartha R. y R. Atlas. (1971). *Degradation and mineralization of petroleum in sea water: Limitation by nitrogen and phosphorous*. *In: Biotechnology and Bioengineering*, 14(3) 309-318.
- [27] Head, I.M. y R.P. Swannell. (1999). *Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats*. *In: Current Opinion in Biotechnology*, 234-239.
- [28] Mckew, B.A., Coulon, F., Yakimov, M.M., Denaro, R., Genovese, M., Smith, C.J., Osborn, A.M., Timmis, K.N. y T.J. McGenity. (2007). *Efficacy of intervention strategies for bioremediation of crude oil in marine systems and effects on indigenous hydrocarbonoclastic bacteria*. *In: Environmental Microbiology*, 9, 1562-1571.
- [29] Quintero, P. y J.K. Camacho. (2009). Biorremediación de Aguas de la Bahía de Tumaco Contaminadas con Hidrocarburos Utilizando Consorcios Nativos. Centro de Control de la Contaminación CCCP. Proyecto interno.
- [30] Hara, A. y K. Syutsubo. (2003). *Alcanivorax which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation*. *In: Environmental Microbiology*, 5, 746-753.
- [31] Gerdes, B., Brinkmeyer, R., Dieckmann, G. y E. Helmke. (2005). *Influence of crude oil on changes of bacterial communities in Arctic sea-ice*. *In: Arctic*, 53, 129-139.
- [32] Cui, Z., Lai, Q., Dong, C., y A. Shao. (2008). *Biodiversity of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from deep sea sediments of the Middle Atlantic Ridge*. *In: Environmental Microbiology*, 10, 2138-2149.
- [33] Gertler, C., Gerdts, G., Timmis, K.N. y P.N. Golyshin. (2009). *Microbial consortia in mesocosm bioremediation trial using oil sorbents, slow-release fertilizer and bioaugmentation*. *In: System*, 69, 288-300.
- [34] McKew, B., Coulon, F., Osborn, A., Timmis, K. y McGenity. (2007). *Determining the identity and roles of oil-metabolizing marine bacteria from the Thames estuary, UK*. *January 9 (1): 165-176*.
- [35] Gómez, S, Gutiérrez, D., A.M., Hernández, Zulay, C., Losada, M. y P. Mantilla (2008). Actores bióticos y abióticos que condicionan la Biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *En: Publicación Científica en Ciencias Biomédicas- ISSN: 1794-2470 Vol.6 No. 9 Enero-Junio 101-212*.