



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES**

**INFORME FINAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

**EFICIENCIA DE LAS BACTERIAS DEL MANGLAR DE  
TUMBES EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS  
CONTAMINADOS CON PETRÓLEO**

**RESPONSABLES:**

- Dr. Auberto Hidalgo Mogollón (Autor)
- Dra. Enedia G. Vieyra Peña (Coautor)
- Mg. Alberto Ordinola Zapata (Coautor)
- Ing. Beder E. Ramírez Segura (Coautor)
- Est. Percy Palacios Moran (Colaborador)
- Est. Joel Ordinola Madrid (Colaborador)

**2014**

## **Eficiencia de las bacterias del manglar de Tumbes en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo**

Auberto Hidalgo Mogollón<sup>1</sup>, Enedia G. Vieyra Peña<sup>2</sup>, Alberto Ordinola Zapata<sup>3</sup>, Beder E. Ramírez Segura<sup>4</sup>, Percy Palacios Moran<sup>5</sup> y Joel Ordinola Madrid<sup>6</sup>

### **RESUMEN**

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la capacidad de biodegradación de hidrocarburos del petróleo de cepas bacterianas aisladas en el manglar de la localidad de Puerto Pizarro, en el distrito, provincia y región Tumbes. Se aislaron 12 cepas de bacterias para evaluar tal capacidad. A cada cepa se le extrajo el ADN y se amplificó por PCR con iniciadores dirigidos al gen 16S ARNr y a genes específicos de enzimas oxigenas de hidrocarburos. Además se realizaron pruebas en cinco de las cepas aisladas para determinar la biodegradación de petróleo tanto a nivel de laboratorio como de campo. A nivel de laboratorio, las cepas fueron sometidas a crecimiento en medio mineral Bushnell Hass suplementado con petróleo como única fuente de carbono. A nivel de campo se realizó un ensayo durante 30 días adicionando de forma individual las cepas bacterianas sobre un suelo de manglar mezclado con petróleo crudo, determinando la cantidad de hidrocarburos totales (HT) presentes, tanto al inicio como al final del experimento. El análisis filogenético de las secuencias del gen 16S ARNr agruparon a las cepas aisladas dentro de los géneros: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Vibrio*. Las secuencias obtenidas con los iniciadores dirigidos a genes específicos no estuvieron relacionadas con genes del tipo oxigenasa de hidrocarburos. A nivel de laboratorio los tratamientos con las cepas individuales IGF2 (*Vibrio fluvialis*), IPF1 (*Acinetobacter venetianus*) y TcPF (*Arthrobacter mysorens*) mostraron un fuerte crecimiento en el medio mineral suplementado con petróleo. En el ensayo de campo la concentración inicial de HT fue de 9,621 %, llegando a disminuir hasta  $1,713 \pm 0,107$  % con la cepa IGF2, la cual tuvo una HT estadísticamente inferior a la del control negativo:  $3,038 \pm 0,142$  %. Los ensayos de biodegradación tanto en laboratorio como en campo demostraron que existen bacterias del manglar de Tumbes que tienen capacidad para degradar el petróleo.

**Palabras clave.** Biorremediación, contaminación por petróleo, bacterias del manglar.

---

<sup>1</sup>,<sup>2,3</sup> Profesores principales de la Universidad Nacional de Tumbes (UNT). <sup>4</sup> Estudiante del Doctorado en Ciencias Ambientales de la Escuela de Posgrado de la UNT. <sup>5</sup> Estudiantes de la Escuela de Ingeniería Pesquera de la UNT.

## Efficiency of the mangrove's bacteria of Tumbes in the bioremediation of contaminated soils with petroleum

Auberto Hidalgo Mogollón<sup>1</sup>, Eneida G. Vieyra Peña<sup>2</sup>, Alberto Ordinola Zapata<sup>3</sup>, Beder E. Ramírez Segura<sup>4</sup>, Percy Palacios Moran<sup>5</sup> y Joel Ordinola Madrid<sup>6</sup>

### ABSTRACT

An experiment was carried out in order to evaluate biodegradative ability of petroleum hydrocarbons of bacterial strains isolated from mangrove of Puerto Pizarro at Tumbes, 12 bacterial strains were isolated to evaluate such ability. DNA was extracted from each strain, and was amplified by PCR with primers targeting the 16S RNAr and to specific genes for oxygenic enzymes of hydrocarbons. Further, tests were performed on five of the isolated strains to determine the biodegradation of petroleum at laboratory and field. At the laboratory, the strains were subjected to growth in mineral medium Bushnell Hass, supplemented with petroleum, as sole carbon source. At the field testing was carried out for 30 days, adding individually bacterial strains on a mangrove soil mixed with crude petroleum, determining the amount of total hydrocarbons (HT) present both the beginning and the end of the experiment. Phylogenetic analysis of the sequences of the 16S RNAr gene grouped to the isolated strains with in those genres: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella* and *Vibrio*. The obtained sequences using primers directed to specific genes were not related to genes of the oxygenase type of hydrocarbons. At the laboratory the treatments with the individual strains IGF2 (*Vibrio fluvialis*), IPF1 (*Acinetobacter venetianus*) and TCFP (*Arthrobacter mysorens*) showed a strong growth in the mineral medium supplemented with petroleum. At the field level the initial concentration of HT was 9,621 %, reaching down to 1,713 ± 0,107 % with strain IGF2, which was statistically different according to the Duncan test ( $\alpha = 0,05$ ), what achieved by the negative control (3,038 ± 0,142 %). Biodegradation tests both in the laboratory and the field show that there are bacteria of the mangrove of Tumbes, which have the capacity to degrade petroleum.

**Keywords:** Bioremediation, petroleum pollution, bacteria of the mangrove.

---

<sup>1,2,3</sup>National University of Tumbes Teachers.  
<sup>5,6</sup> Graduate studies students.

<sup>4</sup>Postgraduate studies student.

## I. INTRODUCCIÓN

A pesar de su importancia económica, la actividad petrolera es una de las actividades humanas que causa grandes impactos sobre el medio ambiente. Si bien a nivel local solamente se han reportado daños ecológicos de menor magnitud, como los señalados por Austerhühle (2010), en el panorama mundial la contaminación por derrames de petróleo es mucho mayor ocasionando grandes daños a los ecosistemas frágiles, como son los marinos (Swannell, Lee and McDonagh 1996; Barth 2002; Hagerty and Ramseur 2011). Diversos estudios han demostrado que los procesos de biorremediación mediante la inoculación de cepas microbianas o también conocida como bioaumentación es un método eficiente y viable para la recuperación de estos ambientes contaminados, (Margesin and Schinner 2001; Benavides et al. 2006; Raiger y López 2009).

La biorremediación por bioaumentación, entendida ésta última como el incremento en los agentes descontaminantes, por ejemplo de bacterias degradadoras de petróleo, requiere como primer paso el aislamiento e identificación de las bacterias con potencial para la degradación de los hidrocarburos. El cultivo bacteriano en medios minerales como Bushnell Hass, suplementados con diferentes tipos de hidrocarburos es una técnica eficiente para el aislamiento y evaluación de cepas bacterianas capaces de utilizar a los hidrocarburos del petróleo como única fuente de carbono para su crecimiento celular (Rodríguez-Martínez et al. 2006; Pinto et al. 2008).

Muchas especies bacterianas involucradas en la biodegradación de los hidrocarburos han sido identificadas, algunos de los estudios realizados al respecto indican que varias especies de bacterias del género *Pseudomonas* poseen una alta capacidad para biodegradar diversos tipos de hidrocarburos; Das and Mukherjee (2006), han mostrado que *Pseudomonas aeruginosa* es una cepa degradadora de gran cantidad de sustratos como el n-hexadecano, mineralizando compuestos alifáticos en condiciones anaerobias, degradando hidrocarburos aromáticos y poli aromáticos siendo también productora de biosurfactantes, así también Grifoll et al. (1992), aislaron una cepa de *Arthrobacter* sp. y determinaron su capacidad para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), utilizando para ello un medio de cultivo con fluoreno como única fuente de

carbono y energía. Sabaté et al. (1999), aislaron la cepa bacteriana *Sphingomonas paucimobilis* JS5 capaz de biodegradar compuestos PAH alquilados, los cuales se caracterizan por ser más difíciles de degradar. De igual manera Correa, Colombo and Zachia (1999), aislaron a las especies bacterianas *Rhodococcus ruber* y *Rhodococcus erythropolis*, que además de degradar compuestos de hidrocarburos también producen biosurfactantes que permiten una mayor eficiencia en los procesos de biorremediación. En otra investigación Díaz, Grigson y Burgess (2002), aislaron una cepa de *Acinetobacter* sp. que es capaz de degradar diferentes fracciones de alcanos sobre todo a temperaturas de 41 a 44 °C, mientras que Churchill, Harper and Churchill (1999), aislaron una cepa de *Mycobacterium*, a partir de un sedimento contaminado con hidrocarburos, dicha cepa fue capaz de degradar hidrocarburos aromáticos cíclicos (PAH) así como un amplio rango de alcanos; por último Das and Mukherjee (2006), aislaron una cepa de *Bacillus subtilis*, a partir de un suelo contaminado con petróleo y demostraron mediante técnicas de bioaugmentación, la eficiencia de estas cepas para la biodegradación de petróleo crudo.

Los microorganismos anteriormente aislados, han servido como base para determinar diferentes rutas metabólicas de degradación de hidrocarburos; las investigaciones en este campo han experimentado un rápido crecimiento con el advenimiento de modernas técnicas moleculares tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han permitido identificar y caracterizar genes específicos de la degradación de hidrocarburos, así por ejemplo, Gibson et al. (1995), determinaron, en una cepa de *Pseudomonas* sp., una vía de dioxigenación y monoxigenación catalizadas por una enzima naftaleno dioxigenasa; Yen and Serdar (1988), a su vez, describieron dos vías de degradación de hidrocarburos, para la conversión de naftaleno a salicilato y para la transformación de salicilato a metabolitos centrales vía catecol, mediante los genes *nah*. En tanto que, Whyte, Greer and Innis (1996), utilizaron técnicas de PCR para la identificación de los genes *alkB*, *ndoB*, *todCl*, y *xylE*, en diferentes cepas de bacterias psicrófilas, con capacidad de biorremediación de hidrocarburos del petróleo.

Baldwin, Nakatsu, and Nies (2003), utilizaron técnicas de multiplex PCR y PCR en tiempo real para detectar los genes naftaleno di-oxigenasa en *P. putida* y

*Burkholderia* sp. así como los genes fenol mono-oxigenasa, tolueno di-oxigenasa y xileno mono-oxigenasa en *P. putida* y el gen bifenil di-oxigenasa en *P. pseudoalcaligenes* y *Rhodococcus* sp.

En otra investigación, Gomes et al. (2007), utilizaron PCR y electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), para estudiar bacterias de sedimentos del manglar a diferentes fuentes de contaminación por hidrocarburos aromáticos policíclicos, encontrando una amplia variedad de genes *ndo* implicados en la degradación de hidrocarburos.

Teniendo en cuenta estas y otras referencias, se desarrolló una investigación con el objetivo de evaluar la capacidad de biodegradación de hidrocarburos del petróleo de cepas bacterianas aisladas a partir de una zona del manglar de Puerto Pizarro, Tumbes.

## **II. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **2.1. Recolección de muestras de suelo**

Muestras de suelo, con su comunidad microbiana, fueron recolectadas en forma aleatoria, en un área de aproximadamente 100 m<sup>2</sup>, en la zona de playa contigua al desembarcadero de Puerto Pizarro. Durante el periodo de marea baja se ubicó zonas de la playa con presencia de residuos de combustibles, en las cuales se recolectaron cinco sub-muestras de 10 gramos de sedimento, de las zonas con mayor presencia de hidrocarburos. Cada muestra fue colocada en tubos falcon estériles de 15 ml, enrasada con agua del mismo lugar hasta el máximo volumen del recipiente para luego ser transportadas hasta el Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ingeniería Pesquera. Se recolectaron adicionalmente dos muestras de suelo de 2 kg cada una, de la misma zona muestreada, así como de un área de manglar cercana a la misma, para determinar la cantidad de hidrocarburos totales (HT) presentes, mediante análisis químico en el Laboratorio Labicer de la Universidad Nacional de Ingeniería en Lima.

### **2.2. Análisis y aislamiento microbiológico**

Las cinco sub-muestras recolectadas, fueron mezcladas y enrasadas con solución salina (0,85 % de NaCl) hasta 100 ml en un matraz estéril. El análisis microbiológico del suelo se realizó en placas petri, utilizando el medio de cultivo sólido R2A (marca Criterion, EE.UU), mediante el método de barrido, a partir de una dilución seriada de la muestra original desde 10<sup>0</sup> hasta 10<sup>-8</sup>, utilizando para ello 100 µl de cada dilución, así como un control negativo. El aislamiento de bacterias con capacidad de tolerar y degradar el petróleo fue desarrollado en el medio R2A suplementado con 30 µl de petróleo crudo (obtenido por donación de la empresa petrolera BPZ) por cada placa petri. Cada cepa bacteriana fue sometida a un proceso de purificación mediante siembras continuas en medio R2A utilizando la técnica de estría por agotamiento en placa. Las cepas bacterianas aisladas fueron almacenadas a 4 °C tanto en medio R2A (medio

sólido) como en medio líquido Luria Broth (LB) (marca Oxoid, Reino Unido) hasta su respectiva utilización.

### **2.3. Extracción de ADN**

El proceso de extracción de ADN de cada cepa bacteriana, se realizó a partir del 1 ml de cultivo bacteriano incubado por 24 horas y a temperatura ambiente en el medio Luria Broth. Se utilizó el protocolo de extracción de ADN bacteriano propuesto por Wilson (1997), consistente en digestión inicial a 37 °C por 1 hora, adición (a cada muestra) de 567 µl de solución buffer de tris-edta (TE) a pH 8,0 (10 mM de tris base grado molecular, marca Promega, EE.UU y 1 mM de EDTA.2Na di-hidratada, grado biología molecular marca Applichem, Alemania), 30 µl de dodecilsulfato sódico (SDS) (marca Promega, EE.UU) y 3 µl de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml, (marca Merck, Alemania). El segundo proceso de digestión fue realizado a 65 °C por 10 min adicionando a cada muestra 100 µl de solución 5M de NaCl (Merck, Alemania) y 80 µl de solución Bromuro de cetil tri-metil amonio (CTAB)/NaCl (10 % de bromuro de cetil tri-metil amonio, marca Calbiochem, Alemania en una solución de NaCl al 0,7 M). El proceso de purificación fue realizada inicialmente con 700 µl de una solución cloroformo/alcohol isoamil (24 partes cloroformo, marca Merck, Alemania y 1 parte de alcohol isoamil, marca Merck, Alemania) y una segunda purificación mediante una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamil (25 partes de fenol marca Invitrogen, EE.UU, 24 partes cloroformo y 1 parte de alcohol isoamil). Para la sedimentación del ADN se utilizó etanol frío al 95 % (Marca Fermont, México) y luego se incubó a -20 °C por 10 minutos en un congelador vertical (marca Bosch, Alemania). Se realizó un lavado posterior en etanol al 75 %. Finalmente, el *pellet* de ADN obtenido fue resuspendido en 100 µl de solución buffer TE previamente calentada a 65 °C. El producto obtenido fue tratado con 1 µl de RNAasa (marca Invitrogen, EE.UU) y luego conservado a -20 °C hasta su amplificación.



## **2.4. Amplificación de los genes 16S ARNr y oxigenasas por PCR**

Se realizó la amplificación del gen 16S ARNr de las muestras de ADN extraído con la finalidad de identificar molecularmente las cepas aisladas. Para la amplificación se utilizaron los juegos de iniciadores reportados por Peu et al. (2006), además se realizaron pruebas de PCR dirigidas a los genes oxigenasa utilizando iniciadores reportados en publicaciones científicas así como diseñadas en esta investigación (tabla 1). Las pruebas de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l en un equipo termociclador (marca Biometra, Alemania). Los reactivos utilizados consistieron en 5  $\mu$ l de buffer de PCR (10X de concentración), 5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  (2,5 mM) y 0,5  $\mu$ l de taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l) (reactivos componentes del kit de PCR Taq DNA Polymerase recombinant, marca Thermo Fisher Scientific, EE.UU), 1  $\mu$ l de solución de deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) (10 mM) del mismo fabricante, 1  $\mu$ l de una solución de 20 pmol/ $\mu$ l de cada iniciador (sintetizados por Bioresearch Technologies, EE.UU), 35,5  $\mu$ l de agua ultra pura grado biología molecular (marca Aplichem, Alemania) y 1  $\mu$ l de ADN extraído. La programación del termociclador fue de 95 °C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos de amplificación, cada uno con una fase de desnaturalización de 94 °C por 30 segundos, una fase de hibridación por 30 segundos a la temperatura de hibridación específica para cada iniciador (tabla 1) y una fase de polimerización a 72 °C por 45 segundos; luego de los ciclos de amplificación se realizó un ciclo final de polimerización a 72 °C por 10 minutos. 10  $\mu$ l de cada uno de los productos obtenidos en las pruebas de PCR fueron mezcladas con 2  $\mu$ l de la solución buffer de electroforesis (10 mM Tris-HCl, 0,03 % azul de bromofenol, 0,03 % de cianol xileno FF, 60 % de glicerol y 60 mM EDTA, marca Thermo Fisher Scientific, EE.UU). La mezcla se cargó en un gel de agarosa al 2 % el cual fue teñido previamente con bromuro de etidio (0,006 % v/v) (marca Merck, Alemania), siendo sometido posteriormente a una migración electroforética a 80 V por 20 minutos en un equipo de electroforesis horizontal (marca Thermo Fisher Scientific, EE.UU) y finalmente observados en un transiluminador ultravioleta (marca H.W. Kassel).

Tabla 1. Secuencia de ADN y temperatura de hibridación (Th) de los Iniciadores utilizados.

Gen objetivo	Iniciador	Secuencia de ADN	Th (°C)	Referencia Bibliográfica
16S ARNr	F8	5'- AGAGTTTGATYMTGGCTCAG -3'	57	Peu, et al, 2006
	R1509	5'- GNTACCTTGTTACGACTT -3'		
Benceno di-oxigenasa	benA-F	5'- CCCGAATGTCGCGCGACTA-3	58	Gonçalves, et al. 2006
	benA-R	5'- TGTTGCGGGAGATCACGAT-3		
	BEN-F	5'- AGCGTCTGGGTAGTATAGAG-3'	55	Diseñados en la investigación
	BEN-R	5'- AGAAGGTACGTAGTGTCTGA-3'		
Naftaleno di-oxigenasa	NAH-F	5'- CAAAARCACCTGATTYATGG-3'	52	Baldwin, Nakatsu and Nies. 2003
	NAH-R	5'- AYRCGRGSGACTTCTTTCAA-3'		
	NAF-F	5'- ATGGCTTCATCTAYGGTTGC-3'	55	Diseñados en la investigación
	NAF-R	5'- TGTCAGCCTTCTGCTT-3'		
Tolueno di-oxigenasa	TOD-F	5'- ACCGATGARGAYCTGTACC-3'	58	Baldwin, Nakatsu and Nies. 2003
	TOD-R	5'- CTTCGGTCMAGTAGCTGGTG-3'		
	TOL1-F	5'- CGAGAASAACGAYTAYTACA-3'	55	Diseñados en la investigación
	TOL1-R	5'- TGGCRGCKTAATTCCAGT-3'		
Xileno mono-oxigenasa	TOL-F	5'- TGAGGCTGAACTTTACGTAGA-3'	55	Baldwin, Nakatsu and Nies. 2003
	TOL-R	5'- CTCACCTGGAGTTGCGTAC-3'		
Bifenil di-oxigenasa	BPH1-F	5'- GGACGTGATGCTCGAYCGC-3'	55	Baldwin, Nakatsu and Nies. 2003
	BPH1-R	5'- TGTTSGGYACGTTMAGGCCCAT-3'		
Fenantreno	FEN-F	5'- TAAGCTTAAAAACCATCAGA-3'	55	Diseñados en la investigación
	FEN-R	5'- ACTTGAATCCCTAACTCATC-3'		
Etilbenceno	etebAC-F	5'- ACGCACAGCTACTCGTTGCTT-3'	55	Gonçalves, et al. 2006
	etebAC-R	5'- CCGTGCACTTCACATTCGAT-3'		

## 2.5. Secuenciación y análisis de secuencia nucleotídica.

Una alícuota de 15 µl de los productos de la PCR (amplicones) que resultaron positivos a la presencia de genes objetivo, en los diferentes ensayos de PCR fueron secuenciados con los mismos iniciadores que sirvieron a la amplificación en el caso de los genes oxigenasa de hidrocarburos y en el caso de los productos obtenidos del gen 16S ARNr, se utilizaron los iniciadores universales:

F518: 5'-CCAGCAGCCGCGGTAATACG-3' y

R800: 5'-TACCAGGGTATCTAATCC -3',

Los amplicones conjuntamente con los iniciadores utilizados fueron colocados en tubos eppendorf de 0,2 ml, etiquetados adecuadamente y colocados en una caja, para luego ser enviados para ser secuenciados en la Empresa Macrogen (Maryland, USA).

Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas en el programa informático MEGA 5. La identificación de las cepas bacterianas así como de los productos obtenidos con los iniciadores específicos a los genes oxigenasa de hidrocarburos fue realizada por comparación de las secuencias nucleotídicas y las secuencias almacenadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante la herramienta de análisis Basic Local Alignment Tools (BLAST) que se halla en el web site del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

## **2.6. Ensayos de biorremediación.**

Las pruebas en laboratorio para determinar la capacidad de utilizar los hidrocarburos del petróleo como una única fuente de carbón fue realizado por triplicado considerando 5 cepas representativas de forma individual de las bacterias asiladas, una mezcla de las 5 cepas bacterianas y 1 control negativo. Cada unidad experimental fue cultivada en 50 ml del medio mineral Bushnell Hass Broth (marca Microgen, India ) complementado con 500 µl de petróleo crudo como única fuente de carbono a temperatura ambiente por 6 días con agitación constante en 200 rpm en un equipo Shaker (marca Labnet, EE.UU). El crecimiento fue monitoreado diariamente por observación directa del cambio de coloración en el medio de cultivo. Las pruebas de campo fue realizado en un ensayo por triplicado en 21 cajones de madera instalados en un área de la Facultad de Ingeniería Pesquera cercana al manglar (Figura 1), los cuales contenían suelo de manglar mezclado con petróleo crudo. Cada cajón tuvo instalado 2 baldes de 16 l que contenían agua del estero en recirculación con la finalidad de mantener siempre húmedo el sustrato. A cada cajón (exceptuando los correspondientes al control) se le agregó cada 3 días 50 ml de un cultivo bacteriano de las mismas cepas consideradas en el experimento de laboratorio, durante 30 días. Los cajones correspondientes al control recibieron el mismo volumen del medio de cultivo estéril, durante el mismo periodo de tiempo. La

determinación de la cantidad de Hidrocarburos Totales presentes tanto al inicio como al final del experimento, fue realizado mediante el análisis químico de 2 kilogramos de suelo de cada unidad experimental en el Laboratorio Labicer de la Universidad Nacional de Ingeniería en Lima.



Figura 1. Ensayo de biorremediación de suelo de manglar contaminado con petróleo. a) Disposición de los cajones conteniendo el sustrato contaminado con petróleo, se aprecia los baldes para abastecimiento y recojo del agua, b) Vista del sustrato húmedo contenido en uno de los cajones.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Hidrocarburos totales del suelo muestreado

Los análisis realizados reportaron un 6,391 % de concentración de hidrocarburos totales presentes en la zona a partir del cual se recolectó la muestra de suelo junto con su respectiva comunidad bacteriana, mientras que el suelo de la zona de manglar próxima al punto de muestreo presentó una concentración de hidrocarburos totales de 2,005 %.

#### 3.2. Aislamiento microbiológico

El cultivo en el medio R2A de la dilución  $10^{-3}$  mostró un crecimiento adecuado para el análisis microbiológico del suelo, contabilizándose en total 110 colonias lo cual representó  $2,2 \times 10^6$  UFC/g de bacterias heterótrofas totales presentes en la muestra de suelo. En el medio R2A suplementado con petróleo crecieron en total 40 colonias que representan  $8,0 \times 10^5$  UFC/g de las cuales se aislaron 13 cepas de acuerdo a sus características morfológicas (tabla 2).

Tabla 2. Cepas bacterianas aisladas a partir del suelo del manglar de Puerto Pizarro.

Código de cepa	Colonia			Cantidad
	Color	Forma	Tamaño	
BMRt	Blanca	Redonda	Mediana	11
TMIart	Transparente	Irregular	Mediana	1
FMI	Fosforescente	Irregular	Mediana	1
RPF	Fosforescente	Redonda	Pequeña	2
IGF1	Fosforescente	Irregular	Grande	1
IPF1	Fosforescente	Irregular	Pequeña	8
BPR1	Blanca	Redonda	Pequeña	1
IGF2	Fosforescente	Irregular	Grande	7
IPF2	Fosforescente	Irregular	Pequeña	1
BPR2	Blanca	Redonda	Pequeña	4
laPF	Fosforescente	Irregular	Pequeña	1
TcPF	Fosforescente	Concéntrica	Pequeña	1
IPF4	Fosforescente	Irregular	Pequeña	1
			<i>Total</i>	40

### 3.3. Identificación molecular basado en la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr

Los ensayos de PCR para el gen 16S ARNr realizado sobre el ADN extraído de las 13 cepas bacterianas aisladas, permitieron obtener una banda de amplificación del mismo tamaño que el control positivo (C+), el cual es de aproximadamente de 1500 pares de base (pb) y que corresponde al tamaño esperado del amplicón de acuerdo a los iniciadores utilizados para este gen, así mismo no se observó ningún tipo de amplificación en el control negativo (C-) (figura 2). Estos resultados indican que tanto el ADN extraído como las condiciones de PCR fueron adecuados.



Figura 2. Productos de PCR amplificados con los iniciadores específicos del gen 16S ARNr en las cepas aisladas.

En el proceso de secuenciación de los productos de PCR, se logró determinar la secuencia de nucleótidos del gen 16S ARNr de 12 cepas bacterianas aisladas. La calidad de la secuencia nucleotídica obtenida de la cepa IGF1 fue deficiente, pues presentó muchos nucleótidos no determinados (N) por lo que fue descartada. El alineamiento en BLAST permitió identificar a 11 de las cepas aisladas con un porcentaje de similitud alto comprendido entre 99 y 100 % (tabla 3). La secuencia del gen 16S ARNr obtenida de la cepa laPF demostró que está relacionada con *Bacillus licheniformis* (Número de accesoión: JN366791.1), sin embargo su porcentaje de similitud: 94 %, fue demasiado bajo como para determinar que esta es la especie de la cepa aislada.

Tabla 3. Identificación de las cepas degradadoras de hidrocarburos aisladas según el porcentaje de similitud de su secuencia nucleotídica del gen 16S ARNr determinada usando el programa BLAST

N°	Cepa	Tamaño de secuencia (pb)	Identidad	Porcentaje de similitud	N° de accesión
1	IPF1	1457	<i>Acinetobacter venetianus</i>	99	AB859738.1
2	BMRt	1472	<i>Bacillus aryabhatai</i>	100	KC934850.1
3	TcPF	1446	<i>Arthrobacter mysorens</i>	99	AJ639831.1
4	FMIIt	1482	<i>Exiguobacterium profundum</i>	99	AY745848.1
5	IGF2	1473	<i>Vibrio fluvialis</i>	99	JQ650110.1
6	BPR1	1465	<i>Shewanella algae</i>	100	JQ799124.1
7	BPR2	1463	<i>Enterobacter</i> sp.	99	GQ284538.1
8	laPF	1458	<i>Bacillus licheniformis</i>	94*	JN366791.1
9	IPF2	1458	<i>Acinetobacter</i> sp.	99	JN228279.1
10	IPF4	1458	<i>Pseudomonas mendocina</i>	99	JF513150.1
11	RPF	1473	<i>Vibrio fluvialis</i>	100	JQ650110.1
12	TMIart	1474	<i>Bacillus</i> sp.	99	GU905014.1

\* El porcentaje de similitud (94 %) fue demasiado bajo como para poder realizar la identificación de la cepa laPF.

### 3.4. Amplificación y secuenciación de los genes oxigenasa

En las pruebas de PCR para detectar y caracterizar el gen benceno di-oxigenasa se obtuvieron 2 productos de amplificación de aproximadamente 800 pb con el juego de iniciadores benA-F y benA-R en las muestras de ADN de las cepas IGF2 e IPF4 (figura 3). Sin embargo la secuenciación de estos productos solo resultó posible para la cepa IPF4 con una secuencia editada de 602 pb. El análisis en BLAST de la secuencia obtenida resultó tener una similitud de 88 % con una región de ADN de una cepa de *Pseudomonas mendocina*.

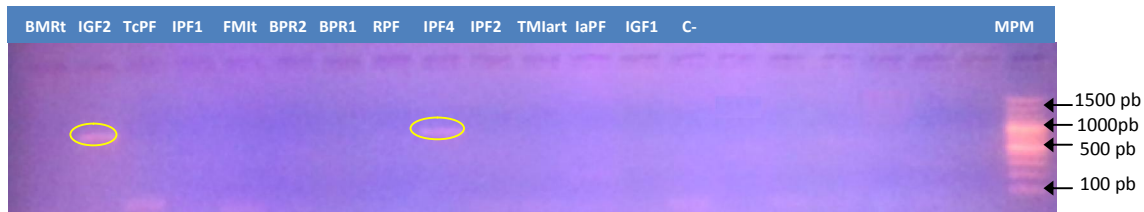


Figura 3. Productos de PCR amplificados con los iniciadores específicos del gen benceno di-oxigenasa en las cepas aisladas. Se observan 2 bandas fluorescentes correspondientes a un producto de aproximadamente 800 pb

El uso del juego de iniciadores etebAC-F y etebAC-R para la detección y caracterización por PCR del gen etilbenceno di-oxigenasa produjo la amplificación de 2 productos de aproximadamente 850 pb, en las muestras de ADN de las cepas IGF2 y RPF (figura 4). Con la secuenciación de estos productos fue posible obtener una secuencia editada de aproximadamente 570 pb en ambas muestras. El análisis en BLAST de las secuencias obtenidas tanto de la cepa IGF2 así como la cepa RPF resultaron tener una similitud de 85 y 87 % respectivamente con una región de ADN de una cepa de *Vibrio furnessii*.

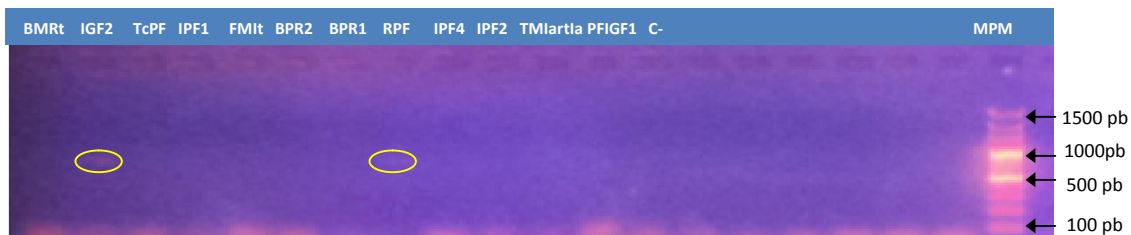


Figura 4. Productos de PCR amplificados con los iniciadores específicos del gen etil-benceno di-oxigenasa en las cepas aisladas. Se observan 2 bandas fluorescentes de aproximadamente 850 pb correspondientes a las cepas IGF2 y RPF

En las pruebas de PCR para detectar y caracterizar el gen bi-fenil di-oxigenasa se obtuvo un producto de amplificación de 200 pb, con el juego de iniciadores BPH1-F y BPH1-R en la muestra de ADN de la cepa IPF4 (figura 5). El proceso de secuenciación de este producto, permitió obtener una secuencia editada de 168 pb, cuyo análisis en BLAST resultó tener una similitud de 95 % con una región de ADN de una cepa de *Pseudomonas mendocina*.





Figura 5. Producto de PCR amplificado con los iniciadores específicos del gen bi-fenil di-oxigenasa en las cepas aisladas. Se observa una banda fluorescente con un tamaño aproximado de 200 pb correspondiente a la cepa IPF4

El uso del juego de iniciadores NAF-F y NAF-R para la detección y caracterización por PCR del gen naftaleno di-oxigenasa produjo la amplificación de tres productos con tamaños entre 450 y 1100 pb, en las muestras de ADN de las cepas BMRt, BPR1 y IGF2 (figura 6). Con el proceso de secuenciación de estos productos fue posible obtener una secuencia editada de aproximadamente 427, 555 y 623 pb respectivamente, para las cepas BMRt, BPR1 y IGF2. El análisis en BLAST de las secuencias obtenidas permitió determinar que el producto amplificado de la cepa BMRt tuvo una similitud de 97 % con una región de ADN de una cepa de *Bacillus megaterium*, el producto amplificado de la cepa BPR1 tuvo una similitud de 73 % con una región de ADN de una cepa de *Shewanella violacea* y el producto amplificado de la cepa IGF2 tuvo una similitud de 75 % con una región de ADN de una cepa de *vibrio furnessii*.

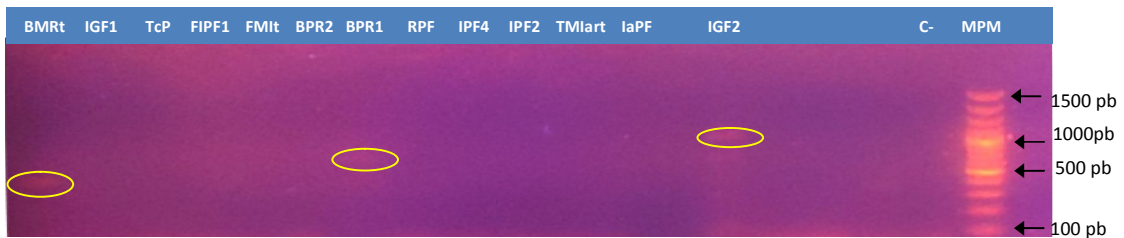


Figura 6. Productos de PCR amplificados con los iniciadores específicos del gen naftaleno di-oxigenasa en las cepas aisladas. En la figura se observa 3 productos de amplificación, con tamaños entre 450 y 1100 pb, correspondientes a las cepas BMRt, BPR1 y IGF2

El juego de iniciadores TOL1-F y TOL1-R utilizados para la detección y caracterización por PCR del gen tolueno di-oxigenasa produjo la amplificación en siete de las muestras de ADN estudiados, sin embargo las cepas IGF2, TcPF y BPR2 presentaron dos bandas de diferente tamaños en la misma reacción por lo que solo se consideró la secuenciación de los productos de PCR obtenidos de las muestras IPF1, IPF2, RPF y FMIIt (Figura 7). En el proceso de secuenciación fue posible obtener una secuencia editada de aproximadamente 390, 788 y 846 pb para las cepas IPF1, IPF2 y FMIIt respectivamente, mientras que la muestra RPF produjo una secuencia no interpretable. El análisis en BLAST de las secuencias obtenidas permitió determinar que el producto amplificado de la cepa IPF1 tiene una similitud de 74 % con una región de ADN de una cepa de *Acinetobacter sp.*, la secuencia del producto amplificado de la cepa IPF2 tiene una similitud de 85 % con una región de ADN de una cepa de *Acinetobacter baumannii* y la secuencia obtenida de la cepa FMIIt tiene una similitud de 98 % con una región de ADN de una cepa de *Exiguobacterium sp.*

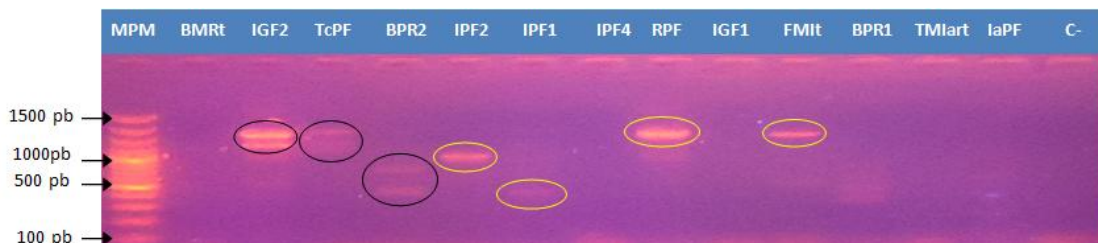


Figura 7. Productos de PCR amplificados con los iniciadores específicos del gen tolueno di-oxigenasa en las cepas aisladas. Se observa bandas fluorescentes con tamaños entre 400 a 1300 pb, correspondiente a las cepas IGF2, TcPF, BPR2, IPF1, IPF2, RPF y FMIIt. Nótese la presencia de doble banda fluorescente en la muestras IGF2, TcPF y BPR2, indicando 2 productos de amplificación.

### 3.5. Ensayos de biorremediación.

Las pruebas en laboratorio permitieron observar diferentes patrones de crecimiento de las cepas bacterianas en el medio de cultivo Bushnell Hass Broth suplementado con petróleo. Los tratamientos con las cepas individuales IGF2, IPF1 y TcPF, tuvieron un fuerte crecimiento el cual fue determinado por una mayor turbidez del medio al final del experimento (Figura 8). El tratamiento M5, que contiene a la mezcla de las cinco cepas de bacterias estudiadas tuvo un

crecimiento similar a las tres cepas mencionadas anteriormente. La cepa FMIt presentó crecimiento débil, mientras que no se observó crecimiento en la cepa BMRt cuya turbidez y color del medio fue casi transparente manteniéndose de similar forma al control negativo.



Figura 8. Matraces conteniendo cultivo de bacterias en medio Bushnell Hass Broth suplementado con petróleo. Se aprecia de derecha a izquierda control negativo (C-), cepas BMRt, FMIt, IPF1, IGF2, TcPF y mezcla de las 5 cepas anteriores (M5), los matraces IGF2, IPF1, TcPF y M5 muestran mayor turbidez indicando un mayor crecimiento bacteriano, La cepa FMIt presentó menor turbidez y menor crecimiento bacteriano, mientras que no se observó turbidez en el matraz con cepa BMRt y el control negativo.

El experimento de biorremediación a nivel de campo inició con una concentración promedio de hidrocarburos totales de 9,621 %. A los 30 días de iniciado el experimento, todos las unidades experimentales mostraron una marcada disminución (Tabla 4) inclusive el control negativo que alcanzó  $3,038 \pm 0,142$  %, la cual de acuerdo a la prueba de Duncan ( $\alpha = 0,05$ ) fue estadísticamente similar al valor  $2,523 \pm 0,126$  % obtenido por el tratamiento con la cepa BMRt pero diferente a los otros tratamientos. La mayor disminución en la concentración de hidrocarburos totales correspondió al tratamiento con la cepa IGF2 que alcanzó  $1,713 \pm 0,107$  % y que fue estadísticamente similar a los tratamientos con las cepas TcPF, IPF1, FMIt y M5 el cual correspondió al consorcio de las cinco cepas bacterianas. Al final del proceso, las propiedades organolépticas de color y olor del suelo mejoraron considerablemente hasta tener las características cercanas a un suelo normal (Figura 9).

Tabla 4. Concentración porcentual de hidrocarburos totales en el suelo a los 28 días de iniciado el experimento según tratamiento.

Tratamientos	Repeticiones			Promedio $\pm$ desv. estándar
	1	2	3	
Control negativo	3,222	3,017	2,876	3,038 $\pm$ 0,142a*
BMRt	2,622	2,602	2,345	2,523 $\pm$ 0,126ab
TcPF	2,148	2,575	1,810	2,178 $\pm$ 0,313bc
IPF1	1,470	2,082	2,960	2,171 $\pm$ 0,612bc
FMIIt	1,706	1,393	2,400	1,833 $\pm$ 0,421bc
M5	1,825	1,734	1,669	1,743 $\pm$ 0,064c
IGF2	1,633	1,864	1,642	1,713 $\pm$ 0,107c

\* Letras iguales representan valores estadísticamente similares de acuerdo a la prueba de Duncan con  $\alpha = 0,05$ .



Figura 9. Mejora en las características de color del suelo del manglar. A la izquierda se aprecia un cajón conteniendo suelo con evidente presencia de hidrocarburos al inicio de la biorremediación. A la derecha se aprecia el mismo cajón al finalizar la misma, mostrándose un terreno aparentemente sin hidrocarburos.

#### IV. DISCUSIÓN

En la presente investigación fue posible aislar e identificar molecularmente, de una zona del manglar de Puerto Pizarro con presencia de hidrocarburos, las siguientes cepas bacterianas: *Acinetobacter venetianus*, *Acinetobacter sp.*, *Arthrobacter mysorens*, *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Exiguobacterium profundum*, *Pseudomonas mendocina*, *Shewanella algae* y 2 cepas adicionales de *Vibrio fluvialis*.

Varios de estas bacterias han sido identificadas a nivel de género como bacterias con capacidad de biodegradación de hidrocarburos en trabajos previos, como por ejemplo *Acinetobacter* ha sido reportado degradadora de hidrocarburos por (Gómez 2011), degradadoras de alcanos (Díaz, Grigson y Burgess 2002) y de alifáticos (Acuña et al. 2010). El género *Arthrobacter* ha sido relacionada con la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos como el flureno (Grifoll et al. 1992), así como de hidrocarburos aromáticos más complejos como el 4-nitrofenol (Jain, Dreisbach and Spain 1994). En el caso del género *Bacillus* se ha reportado a *Bacillus subtilis* como una especie biodegradadora de petróleo crudo (Das and Mukherjee 2006).

El género *Pseudomonas*, es uno de los géneros más reportados como biodegradadores de hidrocarburos, así se ha señalado a *P. aeruginosa* como degradadora de hidrocarburos aromáticos y poli aromáticos y productora de biosurfactantes. (Fan, Qing and Kwang 2003; Das and Mukherjee 2006), a *P. putida* como degradadora de hidrocarburos alifáticos (Acuña et al. 2010), naftaleno (Park et al. 2004), benceno, clorobenceno y triclorobenceno (Gómez 2011), así como otros hidrocarburos aromáticos policíclicos (Kästner, Breuer and Mahro 1998) y a *P. fluorescens* como degradadora de naftaleno y fenantreno (Ortega-Calvo and Saiz-Jiménez 1998; Rockne et al. 2000).

En tanto que en el caso del género *Vibrio*, West et al. (1984), aislaron cepas marinas de *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio fluvialis*, con capacidad para degradar fenantreno, así también Geiselbrecht et al. (1996), aislaron un grupo de bacterias relacionadas a *Vibrio splendidus* con capacidad para degradar naftaleno y fenantreno. Del mismo modo Hedlund y Staley (2001) aislaron una cepa de *Vibrio cyclotrophicu* con capacidad para degradar a los PAH. Otro de los géneros

encontrados durante la investigación es *Enterobacter*, al respecto este género se encuentra citado como degradador de hidrocarburos alifáticos (Acuña et al. 2010), con capacidad para metabolizar hidrocarburos n-alcanos (Koma et al 2001) y poliaromáticos (Toledo et al. 2006).

De las 12 cepas aisladas en la presente investigación, 10 de ellas han sido reportado al menos a nivel de género como bacterias degradadoras de hidrocarburos, sin embargo 2 de las cepas: *Exiguobacterium profundum* y *Shewanella algae* no han sido reportadas previamente como degradadoras de hidrocarburos, pero en esta investigación han mostrado capacidad de sobrevivir en un medio mineral con hidrocarburos.

La amplificación y posterior secuenciación del gen 16S ARNr en todas las cepas aisladas garantizó la existencia de ADN de buena calidad para los ensayos de PCR dirigido a genes oxigenasa específicos. Sin embargo a pesar que para este trabajo se utilizaron iniciadores que reconocen el gen de las subunidad  $\alpha$  de diferentes enzimas oxigenasa de hidrocarburos, las secuencias detectadas no estuvieron relacionadas con los genes reportados a la fecha como genes oxigenasa de hidrocarburos. Es posible que las enzimas implicadas en la degradación de hidrocarburos analizados en este trabajo, no se hayan detectado porque son diferentes a las reportadas, o tengan modificaciones importantes a nivel de genes. Los bajos niveles de similitud en la secuencia de genes oxigenasa generalmente ha sido uno de los problemas mayormente reportados para amplificación de estos genes como lo reportan Baldwin, Nakatsu and Nies (2003), Kasai et al. (2003) y Gomes et al. (2007).

Además es importante tener en cuenta que el diseño de iniciadores se realizó con la escasa información sobre genes oxigenas de hidrocarburos, disponible en dicho momento, en la base de datos del GenBank; sin embargo, la diversidad genética entre las bacterias es en general mucho mayor que la que se encuentra almacenada actualmente en las bases de datos genómicas, lo que podría explicar la baja similitud entre las secuencia nucleotidicas obtenidas en esta investigación y las correspondientes secuencias de los genes oxigenasas almacenadas en la base de datos del GenBank.

En la presente investigación se observó a nivel de campo, que la cepa que produjo la mayor disminución en la concentración promedio de hidrocarburos

totales fue IGF2 (*Vibrio fluvialis*) que disminuyó el HT desde 9,621 % hasta 1,713 ± 0,107 %, este resultado concuerda con la experiencia realizada por Geiselbrecht et al. (1996), quienes encontraron que *Vibrio* spp tuvo un crecimiento mayor sobre un medio con hidrocarburos que otras cepas de *Cycloclasticus* spp.

Esto muestra que *Vibrio* es capaz de mantener un crecimiento acelerado, probablemente debido a un aprovechamiento más eficiente de los hidrocarburos totales lo que explicaría porque fue capaz de reducir en mayor grado los niveles de HT en el presente proyecto. La disminución de HT observado en el control negativo, se podría deber a la acción de la microbiota del suelo (Swanell, Lee y McDonach 1996; Deley 2010; Gómez 2011) así como también a factores físicos como la luz y la temperatura, los que contribuyen a la evaporación, fotooxidación, emulsión, dispersión y biodegradación de los hidrocarburos (Leahy y Colwell, 1990; Brakstad y Bonaunet 2006; Olguín, Hernandez y Sanchez-Galvan 2007). Esta acción natural se vio reforzada con la adición de las cepas bacterianas aisladas ya que claramente se pudo observar (Tabla 4) que todos los tratamientos tuvieron un rendimiento mayor al control negativo, sobre todo por las cepas IGF2 (*Vibrio fluvialis*), FMIt (*Exiguobacterium profundum*), IPF1 (*Acinetobacter venetianus*) y TcPF (*Arthrobacter mysorens*).

La capacidad que tienen las bacterias aisladas para degradar los hidrocarburos del petróleo se ve reforzada también en los resultado obtenidos en las pruebas de laboratorio, donde se observó que las cepas IGF2 (*Vibrio fluvialis*), IPF1 (*Acinetobacter venetianus*) y TcPF (*Arthrobacter mysorens*) tuvieron un crecimiento en el medio mineral Bushnell Haas suplementando con petróleo como única fuente de carbono. Al respecto Rivera et al. (2000) y Benavides et al. (2006) señalan que los microorganismos que son aislados de suelos receptores de derrames recientes y crónicos de petróleo crudo, y que tienen un crecimiento abundante en medios microbiológico enriquecidos con petróleo, son considerados degradadores de petróleo.

Estos resultados sugieren que en el suelo del manglar de Puerto Pizarro, Tumbes, existen bacterias que tienen la capacidad de degradar los hidrocarburos del petróleo y lo utilizan como fuente de carbono para su desarrollo celular. La presencia de este tipo de bacterias, permitiría inferir que el área de suelo estudiado tendría cierta capacidad natural para enfrentarse a perturbaciones

externas relacionadas con la contaminación por petróleo (Swannell, Lee and McDonach 1996; Gómez 2011).

Ante un posible escenario negativo de contaminación del suelo del manglar de Puerto Pizarro, la recuperación natural de este suelo, se vería incrementado con la aplicación de la técnica de bioaumentación mediante la inoculación de las cepas aisladas que presentaron mayor actividad durante este trabajo de investigación, dado que se ha demostrado que el uso de bacterias nativas hacen que la bioaumentación sea mucho más eficiente para acelerar la recuperación de ambientes contaminados (Margesin and Schinner 2001; Benavides et al. 2006; Raiger y López 2009).



## V. CONCLUSIONES

1. Se aislaron e identificaron molecularmente 12 cepas de bacterias asociadas a un suelo de manglar contaminado con petróleo las cuales pertenecen a los géneros *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Exiguobacterium*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Shewanella* y *Vibrio*.
2. Se determinó mediante cultivo en medio mineral suplementado con petróleo, que las cepas bacterianas IGF2 (*Vibrio fluvialis*), IPF1 (*Acinetobacter venetianus*), FMIt (*Exiguobacterium profundum*) y TcPF (*Arthrobacter mysorens*) tienen la capacidad para degradar y utilizar los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono.
3. Se determinó que el uso de las cepas IGF2 (*Vibrio fluvialis*), IPF1 (*Acinetobacter venetianus*), FMIt (*Exiguobacterium profundum*) y TcPF (*Arthrobacter mysorens*) mediante el método de bioaumentación mejora el proceso de biorremediación de un suelo de manglar contaminado con petróleo.
4. Los iniciadores utilizados bajo las condiciones de PCR desarrollados durante este trabajo no son adecuados para detectar y amplificar genes del tipo oxigenasa de hidrocarburos en las cepas que han sido aisladas.
5. El presente trabajo constituye el primer reporte de aislamiento e identificación molecular de bacterias asociadas al manglar de Puerto Pizarro, Tumbes, que tienen capacidad para biodegradar los hidrocarburos del petróleo.
6. El método de bioaumentación se presenta como una buena alternativa para recuperar el suelo del manglar ante una posible contaminación por el derrame de petróleo, generando un beneficio ambiental.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, A., G. Pucci, M. Morales y O. Pucci. 2010. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30:29-36.
- Austermühle, S. 2010. *Historia de derrames de petróleo en el Perú*. Lima, Perú: ONG Grupo Mundo Azul. <http://peru.mundoazul.org/cero-contaminación/petróleo-el-peligro-negro/accidentes-y-derrames-de-petroleo/derrames-de-petroleo-en-el-peru/>
- Baldwin, B., C. Nakatsu and L. Nies. 2003. Detection and enumeration of aromatic oxygenase genes by multiplex and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 69 (3): 3350–3358.
- Barth, H. 2002. *The 1991 Gulf War Oil Spill: Its ecological effects and recovery rates of intertidal ecosystems at the Saudi Arabian Gulf coast - results of a 10-year monitoring period*. Regensburg, Alemania: Universidad de Regensburg.
- Benavides, J., G. Quintero, A. Guevara, D. Jaimes, S. Gutiérrez y J. Miranda. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova Publicación Científica* 4(5):1-116
- Brakstad, O. and K. Bonaunet. 2006. Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0–5 °C) and bacterial communities associated with degradation. *Biodegradation*. 17: 71-82.
- Churchill, S., J. Harper and P. Churchill. 1999. Isolation and characterization of a Mycobacterium species capable of degrading three- and four-ring aromatic and aliphatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (2):549-552. <http://aem.asm.org/content/65/2/549.full.pdf>
- Correa, F., L. Colombo and M. A. Zachia. 1993. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de Microbiología* 30 (3): 231-236. <http://www.scielo.br/pdf/rm/v30n3/0008-003.pdf>
- Das, K., and A. Mukherjee. 2006. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India.

- Bioresour Technol.* 98(7): 1339-45. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406002446>
- Deley, A. 2010. *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo del campamento sachá 161 utilizando el hongo Pleurotus ostreatus*. Tesis de Ingeniero en Biotecnología Ambiental, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Díaz, M., S. Grigson y J. Burgess. 2002. Uso de un consorcio bacteriano extremo-halotolerante para la biodegradación de crudo en ambientes salinos. *Revista Colombiana de Biotecnología* 4(1): 36-42. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/download/30087/30282::pdf>
- Fan, C., X. Qing and J. Kwang. 2003. Aerobic denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* monitored by online NAD(P)H Fluorescence. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11): 6715-6722.
- Geiselbrecht, A., R. Herwig, J. Deming and J. Staley. 1996. Enumeration and phylogenetic analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading marine bacteria from Puget Sound sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (9):3344-3349
- Gibson, D., S. Resnick, K. Lee, J. Brand, D. Torok, L. Wackett, M. Schocken and B. Haigler. 1995. Desaturation, dioxygenation, and monooxygenation reactions catalyzed by naphthalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp. strain 9816-4. *J. Bacteriol.* 177 (10): 2615-21.
- Gomes, N., L. Borges, R. Paranhos, F. Pinto, E. Krögerrecklenfort, L. Mendonza and K. Smalla. 2007. Diversity of *ndo* genes in mangrove sediments exposed to different sources of polycyclic aromatic hydrocarbon pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (22): 7392–7399
- Gómez, A. 2011. *Evaluación de la actividad y la diversidad bacteriana con potencial biorremediador asociada a diferentes profundidades en el suelo del morro de Moravia mediante análisis de secuencias del Gen 16s rDNA*. Tesis de maestría en biotecnología, Universidad Nacional de Colombia.
- Goncalves, H., H. Hara, D. Miyazawa, J. Davies, L. Eltis and W. Mohn. 2006. Transcriptomic Assessment of Isozymes in the Biphenyl Pathway of

- Rhodococcus* sp. Strain RHA1. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 (9): 6183–6193.
- Grifoll, M., M. Casellas, J. Bayona and A. Solanas. 1992. Isolation and characterization of a fluorene-degrading bacterium: identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (9): 2910–2917.
- Hagerty, L. and J. Ramseur. 2011. *Deepwater Horizon Oil Spill: Highlighted Actions and Issues*. Washington, USA: Congressional Research Service.
- Hedlund, P. and J. Staley. 2001. *Vibrio cyclotrophicus* sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51:61–66
- Jain, R., J. Dreisbach and C. Spain. 1994. Biodegradation of p-nitrofenol via 1,2,4-benzenetriol by an *Arthrobacter* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 60(8):3030
- Kasai, Y., K. Shindo, S. Harayama, y N. Misawa. 2003. Molecular characterization and substrate preference of a polycyclic aromatic hydrocarbon dioxygenase from *Cycloclasticus* sp. strain A5. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:6688–6697.
- Kästner, M., M. Breuer and B. Mahro. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH degrading bacteria introduced into soil. *Applied and Environmental Microbiology* 64(1): 359-362.
- Koma, D., F. Hasumi, E. Ymamamoto, T. Ohta, S. Chung and M. Kubo. 2001. Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. *J. Biosci. Bioeng.* 91:94-96.
- Leahy, J., and R. Colwell 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol Rev.* 54(3):305-315
- Margesin, R., and F. Schinner. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:650–663
- Olguín, J., M. Hernández y G. Sánchez-Galván 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23 (3):139-154

- Ortega-Calvo, J., and C. Saiz-Jiménez. 1998. Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by a *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (8): 3123-3126.
- Park, W., C. Jeon, H. Cadillo, C. DeRito and E. Madsen. 2004. Survival of naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 in naphthalene-amended soils: toxicity of naphthalene and its metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 429-435.
- Peu, P., H. Brugere, A. Pourcher, M. Kerouredan, J. Godon, J. Delgenes, y P. Dabert. 2006. Dynamics of a pig slurry microbial community during anaerobic storage and management. *Applied and Environmental Microbiology.* 72(5): 3578-3585.
- Pinto, A., D. M. Bonotto, D. de Franceschi, M. P. Santos and J. Contiero. 2008. Biodegradability of commercial and weathered diesel oils. *Braz J Microbiol.* 39(1): 133–142. doi: 10.1590/S1517-838220080001000028
- Raiger, L. y R. López. 2009. Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Revista Química Viva* 3(8): 146-161.
- Rivera, M., R. Ferrera, V. Volke, R. Rodríguez y L. Linares. 2000. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra.* 20: 423-434.
- Rockne, K., J. Chee-Sanford, R. Sanford, P. Brian, T. James and S. Staley. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 66(4):1595-1601.
- Rodríguez-Martínez, E. M., E. X. Pérez, C. W. Schadt, J. Zhou and A. A. Massol-Deyá. 2006. Microbial Diversity and Bioremediation of a Hydrocarbon-Contaminated Aquifer (Vega Baja, Puerto Rico). *Int J Environ Res Public Health* 3(3): 292–300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3807524/>
- Sabaté, J., M. Grifoll, M. Viñas and A. Solanas. 1999. Isolation and characterization of 2-methyl-phenanthrene utilizing bacterium: identification of ring cleavage metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52:704-712.
- Swannell, R., K. Lee and M. McDonagh. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Review.* 60(2): 342-365.

- Timmis, K. 2002. *Pseudomonas putida*: a Cosmopolitan opportunist par excellence. *Environ. Microbiol.* 4: 779-781.
- Toledo, F., C. Calvo, B. Rodelas and J. González-López. 2006. Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities. *Syst. Appl. Microbiol.* 29:244-52.
- West, P., G. Okpokwasili, P. Brayton, D. Grimes and R. Colwell. 1984. Numerical taxonomy of phenanthrene degrading bacteria isolated from the Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 988-993.
- Whyte, L., C. Greer and W. Innis. 1996. Assessment of the biodegradation potential of psychrotrophic microorganisms. *Can J. Microbiol.* 42(2): 99-106
- Wilson, K. 1997. *Current protocols in molecular biology*. Townsville, Australia: Australian Institute of Marine Science.
- Yen, K. and C. Serdar. 1988. Genetics of naphthalene catabolism in pseudomonas. *Crit. Rev. Microbiol.* 15(3): 247-68