

DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES POR BACTERIAS MARINAS AISLADAS DE SEDIMENTOS EN EL CARIBE COLOMBIANO

DETERMINATION OF THE ABILITY TO DEGRADATE PERSISTENT ORGANIC COMPOUNDS BY MARINE SEDIMENT BACTERIA ISOLATED IN THE COLOMBIAN CARIBBEAN

Martha L. Gómez^{1,3}, Claudia Hurtado^{1,4}, Jenny Dussán^{2,5}, Juan P. Parra^{1,6}, Silvia Narváez^{1,7}.

Resumen

Se aislaron 82 cepas bacterianas a partir de muestras de sedimento del Caribe colombiano, capaces de tolerar los contaminantes orgánicos persistentes en ambientes aeróbicos. De estas cepas, 64 sobrevivieron las condiciones de laboratorio, 43 se aislaron a partir de medios de cultivos enriquecidos con plaguicidas organoclorados (DDT y Aldrin) y 21 de medios enriquecidos con hidrocarburos (Crudo y ACPM). Las cepas fueron sometidas a un proceso de selección con el fin de escoger bacterias competitivas para constituir cultivos mixtos y evaluar su capacidad de degradación de hidrocarburos (ACPM) y plaguicidas organoclorados (DDT). Los resultados obtenidos muestran que el cultivo mixto crecido en presencia de hidrocarburos (CMH) fue capaz de degradar el 68,61% de la fracción de los n-alcenos del ACPM en 21 días. El cultivo bacteriano desarrollado en presencia de plaguicidas organoclorados (CMO), transformó un 68,8% de DDT a DDD en 60 días. Un 23,54% de la degradación de hidrocarburos alifáticos y un 29,1% de DDT, fue debido a factores abióticos. Las cepas se identificaron mediante la amplificación del gen 16s rRNA, encontrando en el CMO bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Brevibacillus* y *Pseudomonas*, y en el CMH microorganismos correspondientes a los géneros *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Ralstonia*. Las cepas evaluadas presentan potencial en la degradación de COP y a futuro pueden ser empleadas como una herramienta estratégica de biorremediación.

Palabras clave: biodegradación, bacterias marinas, hidrocarburos, organoclorados, *Bacillus*, *Pseudomonas*.

Abstract

82 native marine bacterial strains capable to tolerate persistent organic compounds under aerobic conditions were isolated from sediment samples from the Colombian Caribbean. Sixty-four (64) of these bacterial strains survived in laboratory conditions, 43 were isolated on medium enriched with organochlorinated pesticides (DDT and aldrin) and 21 strains from medium enriched with hydrocarbons (crude oil and diesel fuel). The 64 bacterial strains underwent a selection process with the purpose of choosing competitive bacteria to constitute mixed bacterial cultures and evaluate their ability to degrade hydrocarbons (Diesel fuel) and organochlorinated pesticides (DDT). Outcomes show that mixed bacterial culture grown on medium with hydrocarbons (CHM) was able to degrade in 68.61% of the n-alkanes fraction in the diesel fuel after 21 days. Bacterial culture grown on medium with pesticides (CMO), transformed a 68.8% DDT to DDD in 60 days. A 23.54% of the aliphatic hydrocarbon degradation and 29.1% of DDT, were due to abiotic factors. The strains were identified by the amplification of the gene 16s rRNA, finding in the CMO bacteria of genera *Acinetobacter*, *Brevibacillus*, and *Pseudomonas*, and the CMH microorganisms corresponding to the genera *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, and *Ralstonia*. Strains examined had potential in the degradation of COP and they can be used like a strategic tool of bioremediation in the future.

Key words: biodegradation, chlorinate pesticides, hydrocarbons, marine bacteria, *Bacillus*, *Pseudomonas*.

Recibido: abril de 2006; aceptado: noviembre de 2004.

¹ Programa Calidad Ambiental Marina. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras-(INVEMAR). Punta Betin, Santa Marta (Magdalena), Colombia.

² Centro de Investigaciones Microbiológicas. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.

Correos electrónicos: ³ <mlgomez@invemar.org.co>; ⁴ <clahusan@yahoo.com>;

⁵ <jdussan@uniandes.edu.co>; ⁶ <juanpablo@invemar.org.co>; ⁷ <snarvaez@invemar.org.co>.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos persistentes (**COP**) son compuestos ambientalmente estables, liposolubles, semivolátiles y tóxicos; bioacumulables y biomagnificables a lo largo de la cadena trófica. Dentro de este grupo de contaminantes se encuentran los plaguicidas, de los cuales el de mayor polémica a nivel mundial ha sido el **DDT** (1,1,1-Tricloro-2,2 bis-[p-clorofenil] etano), puesto que su uso extensivo generó una acumulación en los ecosistemas a pesar de haber sido prohibida su aplicación en países desarrollados durante los setenta y en Colombia hasta la década de los noventa (Grimalt et al., 2001; Marín et al., 2004). Además de los plaguicidas, se encuentran los hidrocarburos del petróleo que en concentraciones de 0,1-10 mg/l son perjudiciales para los organismos marinos. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (**HAP**) son los de mayor importancia al ser considerados altamente carcinogénicos (Penet et al., 2004).

El Caribe colombiano, es una región que presenta un alto grado de contaminación por COP debido a las actividades industriales, agrícolas, domésticas, portuarias y de transporte (Marín et al., 2004). Existen diferentes mecanismos que permiten llevar a cabo procesos de autodepuración de los ecosistemas marinos y costeros con respecto a los contaminantes tóxicos, dentro de éstos se destacan: los hidrodinámicos (dilución por el transporte advectivo y turbulento), fisicoquímicos (precipitación, formación de sustancias insolubles, oxidación fotoquímica, entre otros), bioquímicos (nitrificación, fosfatización, y biotransformación parcial o total) y biológicos (asimilación, bioconcentración y bioacumulación) (Aislabie et al., 1997). La utilización de técnicas de biorremediación son herramientas efectivas para el tratamiento de residuos tóxicos, debido a su bajo costo e impacto limitado en el medio ambiente (Xu y Obrad, 2004). Bacterias como *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. putida* han sido

reportadas por su capacidad de transformar una amplia gama de sustancias recalcitrantes, en cultivos puros o mixtos, estos últimos denominados consorcios (Aislabie et al., 1997).

En el presente estudio se determinó la capacidad de degradar dos COP, DDT e hidrocarburos del ACPM, por cultivos mixtos conformados a partir de bacterias aisladas de sedimentos del Caribe colombiano que históricamente presentaron un alto grado de contaminación por estas sustancias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fase de campo. Teniendo en cuenta las zonas impactadas en el Caribe colombiano por COP según reportes Marín et al. (2004), se seleccionaron ocho estaciones de muestreo en los departamentos de Bolívar, Córdoba, Magdalena y Sucre. En cada estación se recolectaron 500 g de sedimento a una profundidad de 15 cm, se colocaron en papel aluminio previamente tratado con hexano y se transportaron al laboratorio en bolsas plásticas con sello hermético a 4 °C. Posteriormente se realizó la cuantificación de COP, aislamiento, caracterización y selección bacteriana.

Determinación de COP en sedimentos. A partir de cada muestra de sedimento se determinó la concentración de Organoclorados Totales (**OCT**) e Hidrocarburos Aromáticos Totales (**HAT**), siguiendo los métodos de extracción y medición de hidrocarburos y plaguicidas organoclorados en sedimentos descritos por Garay et al. (2003). El sedimento se caracterizó por el método granulométrico de McManus (1988) y de forma paralela, se determinó el contenido de humedad por diferencia de masa perdida durante el calentamiento a 105 °C por 48 horas.

Aislamiento de bacterias tolerantes a COP. 50 g de sedimento se añadieron en una solución de 450 ml de agua marina estéril, esta mezcla se agitó en un *shaeker* orbital a 180 rpm por 15 min,

posteriormente se decantó por un periodo de 10 min (**Solución A**). Para el aislamiento de bacterias tolerantes a plaguicidas organoclorados (DDT y Aldrin) 1 ml del sobrenadante de la solución A se resuspendió en 9 ml de Medio Mínimo de Sales (**MMS1**) suplementado con plaguicidas organoclorados. El MMS1 contenía FeSO_4 (4,67 mg/l), KH_2PO_4 (0,45 g/l), K_2HPO_4 (0,9 g/l), NaCl (0,9 g/l), $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l), $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g/l), H_3BO_3 (0,4 mg/l), ZnSO_4 (0,24 mg/l), $\text{MnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,6 mg/l), CuSO_4 (0,32 mg/l), $\text{Na}_2\text{MO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,2 mg/l), extracto de levadura (1 g/l) y Aldrin o DDT (300 ng/l). Los medios se incubaron a 35 °C y agitación de 180 rpm cada 12 horas por cuatro días. Se realizaron trasposos (1 ml) a MMS1 cada cuatro días hasta completar 12 días de crecimiento bacteriano.

Para el aislamiento de bacterias tolerantes a hidrocarburos (crudo y ACPM) se tomó 1 ml del sobrenadante de la solución A en 9 ml de caldo de preenriquecimiento ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,9 mg/l) con crudo o ACPM al 1%. Los caldos se incubaron a 35 °C y agitación de 180 rpm cada 12 horas por siete días. Después de este tiempo se tomó 1 ml de cada caldo de preenriquecimiento y se adicionó a 9 ml de Medio Mínimo de Sales (**MMS2**) suplementado con hidrocarburos. El MMS2 contenía $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (60 mg/l), NaHCO_3 (125 mg/l), KNO_3 (70 mg/l), NH_4Cl (70 mg/l), KH_2PO_4 (100 mg/l), $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (10 mg/l), $\text{MnCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (7 mg/l), ZnSO_4 (1,5 mg/l) y crudo o ACPM (1% v/v). Finalizado el periodo de incubación (siete días) se realizó un trasposo (1 ml) a MMS2 y se incubó por siete días bajo las mismas condiciones.

Finalizados los tiempos de incubación, se determinó el crecimiento de bacterias tolerantes por medio de recuento en placas de agar nutritivo (Rodríguez et al., 1999). A partir de los recuentos se realizó el aislamiento, caracterización macroscópica y microscópica de las cepas.

Selección de cepas. Con el objeto de seleccionar bacterias competitivas para los ensayos de

degradación se realizaron pruebas de selección horizontal (**SH**) y Concentración Mínima Inhibitoria (**CMI**), donde se evaluó la capacidad de las cepas de tolerar los compuestos organoclorados (DDT y aldrin) e hidrocarburos petrogénicos (ACPM y Crudo), además de crecer en un rango de ACPM del 1-10% v/v y DDT de 400-2.000 ng/l.

Ensayos de degradación. Los ensayos estuvieron constituidos por un tratamiento y un control abiótico por cada contaminante a evaluar, con tres replicas cada uno. En el ensayo de organoclorados el tratamiento contenía MMS1 con una concentración de DDT de 1.600 ng/l y el cultivo bacteriano mixto, mientras el control abiótico estaba compuesto de MMS1 con DDT (1.600 ng/l). Se realizaron recuentos de Unidades Formadoras de Colonias (**UFC**) cada cinco días, durante 60 días y la cuantificación de compuestos organoclorados por cromatografía de gases con detector de captura de electrones en los días 0, 20, 40 y 60.

Para el ensayo de hidrocarburos, el tratamiento estuvo conformado por medio MMS2 adicionado con ACPM (2% v/v) y el cultivo bacteriano mixto, mientras el control abiótico sólo contenía MMS2 con ACPM (2% v/v). Se realizaron recuentos de UFC cada tres días, durante 21 días y cuantificación de hidrocarburos por cromatografía de gases acoplada a un detector de masa en los días 0, 10 y 21.

El cultivo mixto de cada ensayo de degradación estuvo conformado por las cepas provenientes de las pruebas de selección, en una concentración final de 10^5 células/ml. Los ensayos se mantuvieron a una temperatura de incubación de 30 °C y 180 rpm cada 12 horas. El procedimiento para extracción, fraccionamiento y cuantificación de contaminantes se realizó de acuerdo a los procedimientos descritos por Garay et al. (2003).

Porcentaje de degradación. El porcentaje de degradación se estableció por medio de la diferencia de los porcentajes de remoción del tratamiento y el

control abiótico en el tiempo inicial y final del ensayo. La diferencia en las concentraciones fue empleada para calcular el porcentaje de remoción y

degradación de organoclorados e hidrocarburos de acuerdo con Gómez (2003), Palittapongarnmin et al. (1998) y Sharma y Pant (2000):

$$\% \text{ Remoción Contaminante} = 1 - \left(\frac{\text{Concentración. final}}{\text{Concentración. inicial}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

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

Identificación de cultivos bacterianos mixtos usando la secuencia del Gen 16S rDNA. Las cepas conservadas a -80°C fueron activadas y cultivadas en medio líquido a 30°C durante 15 horas. Un volumen de $50\ \mu\text{l}$ de cada cultivo se llevó a 100°C por 15 min, posteriormente se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min; $2\ \mu\text{l}$ del sobrenadante (DNA) se utilizaron para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando las siguientes concentraciones para la mezcla de reacción: MgCl_2 25 mM; dNTPs 10 mM; cebadores (primers) U1 y U2 $10\ \mu\text{M}$; Tag polimerasa $5\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$, buffer 10X. Los cebadores utilizados para la amplificación del gen 16S rDNA fueron U1-5'CCAGCAGCCGCGGTAATAGG3' y U2-5'ATCGG(C/T)TACCTTGTTACGACTTC3'. El programa para la amplificación fue el siguiente: Desnaturalización inicial a 94°C por 3 min; luego 25 ciclos de 94°C a 45 seg, seguido de una temperatura máxima de 55°C por 45 seg y 72°C por 45 seg; finalizando con una extensión de 72°C por 7 min. La amplificación fue realizada en un termociclador I cycler Bio-Radâ.

Los productos de la PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 0,7%; para determinar el peso molecular de las muestras se usó el marcador High Mass Ladder de Invitrogen. Se purificó el amplificado, a partir de $20\ \mu\text{l}$ de reacción, con el kit de purificación Wizard de Promega resuspendiendo en $15\ \mu\text{l}$ de agua libre de Dnasas a 70°C . El gel fue fotografiado en el centro de

documentación Chemidoc utilizando el programa Quantity one 4,5 Bio-Radâ.

Para la secuenciación de los amplificados del gen 16S se utilizó una concentración de primers de 2,5X, buffer 5,0 iniciador de secuencia U2 $10,0\ \mu\text{M}$. El volumen de ADN y agua adicionados se calculó independientemente para cada muestra con base en la concentración del ADN obtenido. La cantidad óptima de ADN en la reacción de PCR por secuenciación fue estandarizada en 40 ng. El volumen final de reacción fue de $10\ \mu\text{l}$. La secuenciación fue realizada en un Prism 310 ABI (Ream y Field, 1999).

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización de bacterias tolerantes a COP. Un total de 82 aislamientos fueron obtenidos de los medios con organoclorados e hidrocarburos, de los cuales 64 sobrevivieron a las condiciones de laboratorio, 43 se aislaron a partir de medios de cultivo enriquecidos con plaguicidas organoclorados (DDT $300\ \text{ng/l}$ y aldrin $300\ \text{ng/l}$) y 21 a partir de hidrocarburos (Crudo 1% y ACPM 1%).

La estación Terminal de ECOPETROL, en el departamento de Bolívar, presentó la mayor concentración de compuestos organoclorados totales ($3,74\ \text{ng/g}$) e hidrocarburos aromáticos

totales (2.161,53 $\mu\text{g/g}$), seguida por la estación Muelle de Cabotaje Puerto de Santa Marta con 3,46 ng/g y 82,76 $\mu\text{g/g}$. Los recuentos promedio de microorganismos tolerantes a organoclorados

e hidrocarburos por gramo de sedimento húmedo oscilaron en un rango de $3,6 \times 10^7$ - $1,0 \times 10^9$ UFC/g y 1×10^5 - $2,6 \times 10^8$ UFC/g respectivamente (tabla 1).

Tabla 1. Porcentaje de lodo, concentración de Compuestos Organoclorados Totales (COT) e Hidrocarburos Aromáticos Totales (HAT), número de morfotipos y recuentos bacterianos en las muestras de sedimento colectadas la región Caribe [(1) = valores promedio del número de bacterias tolerantes por gramo de sedimento húmedo; ND = no detectable]

Departamento	Estación	% lodos	N.º morfotipos aislados	COT (ng/g)	UFC/g medio DT ₍₁₎	UFC/g medio Aldrin ₍₁₎	HAT ($\mu\text{g/g}$) ACPM ₍₁₎	UFC/g medio CRUDO ₍₁₎	
Magdalena	Muelle de cabotaje Puerto Santa Marta	19	8	3,46	$3,3 \times 10^8$	$1,3 \times 10^8$	82,76	$6,0 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$
	Frente Río Gaira	71	14	ND	$3,4 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	1,89	$1,7 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
	Frente Río Sevilla	51	2	—	—	—	—	—	—
	Boca Río Manzanares	1	17	1,34	$2,1 \times 10^8$	$2,2 \times 10^8$	0,35	$1,7 \times 10^7$	$2,6 \times 10^8$
Bolívar	Terminal de ECOPEPETROL	68	10	3,74	$2,2 \times 10^8$	$9,6 \times 10^7$	2.161,53	$8,2 \times 10^7$	$5,9 \times 10^7$
	Desembocadura Canal de Dique	7	8	0,30	$3,3 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	0,61	$2,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
Sucre y Córdoba	Boya de ECOPEPETROL	51	13	0,27	$2,8 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	1,3	$1,0 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
	Frente Bahía Cispatá	100	10	ND	$5,6 \times 10^7$	$1,9 \times 10^8$	4,9	$1,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^6$

Ensayo de degradación de hidrocarburos. El cultivo mixto conformado por nueve cepas bacterianas provenientes de las pruebas de selección presentó una disminución de

hidrocarburos alifáticos en términos de n-alcános del 92,15%. Por factores abióticos se removió el 23,54% y por el cultivo bacteriano el 68,61% en 21 días (tabla 2).

Tabla 2. Porcentaje de remoción y degradación de ACPM y DDT en los ensayos de degradación

Tratamiento	% remoción		% biodegradación	
	ACPM	DDT	ACPM	DDT
Cultivo bacteriano mixto	92,1	97,9	68,6	68,8
Control abiótico	23,5	29,1	—	—

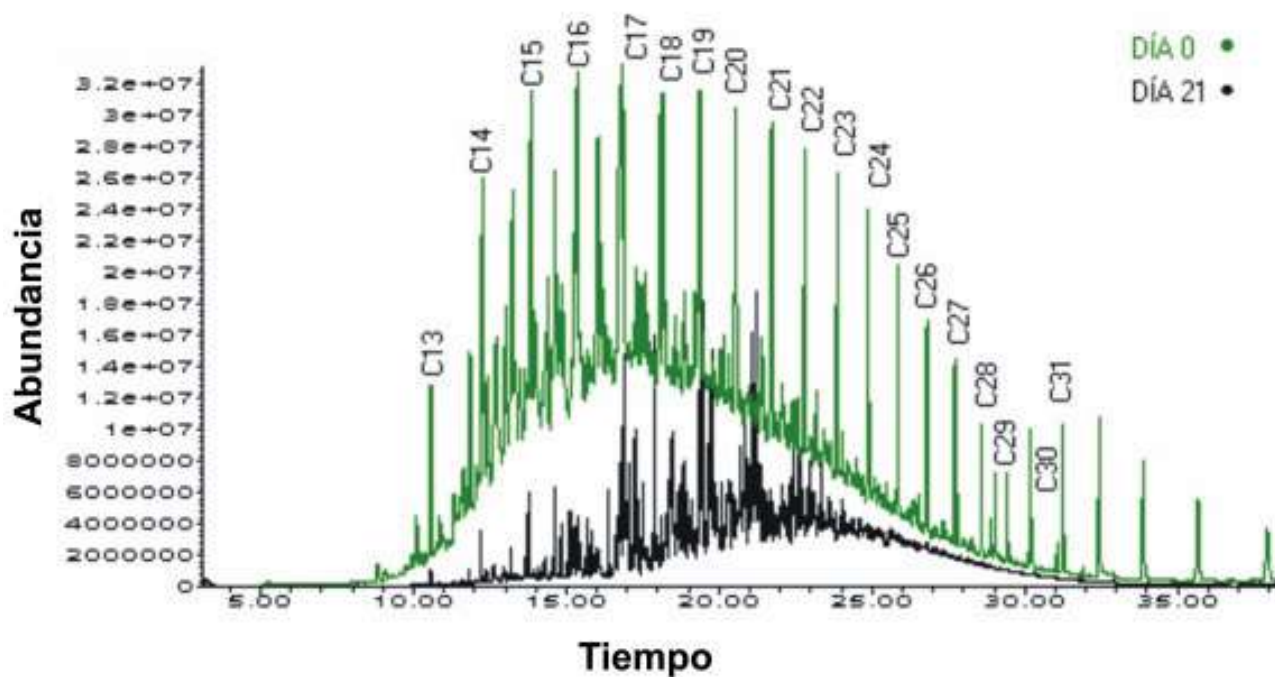


Figura 1. Perfil cromatográfico día 0 y 21 de los *n*-alcanos del ACPM en presencia del cultivo mixto

En el cromatograma de la figura 1 se observa una distribución variable de los componentes resueltos y en algunos casos de otros componentes que se sobrepone en una mezcla compleja no resuelta denominada UCM, la cual está relacionada con el origen del hidrocarburo y es característica de los hidrocarburos petrogénicos (Readman et al., 1987)

y no de los biogénicos. La UCM fue reducida por las bacterias presentes en el medio, mientras que en el control abiótico no disminuyó en el transcurso del ensayo (figura 1). Dentro de los compuestos degradados se destacó la disminución de los alcanos C20-C31 con porcentajes de degradación entre 75-85% (tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de remoción y degradación de n-alcenos en ensayo de degradación de hidrocarburos (ACPM) durante 21 días (ND = no detectable)

n-alceno	% remoción		% degradación
	cultivo mixto	control abiótico	
C13	100	31,60	68,40
C14	91,35	ND	91,35
C15	92,52	15,37	77,16
C16	93,89	94,01	ND
C17	94,21	44,14	50,07
Pristano	61,82	31,02	30,80
C18	92,28	8,05	84,23
Fitano	82,80	9,03	73,77
C19	74,94	0,80	74,14
C20	94,21	8,96	85,25
C21	96,52	20,29	76,23
C22	90,73	13,83	76,90
C23	96,09	12,16	83,94
C24	100	15,20	84,80
C25	100	15,87	84,13
C26	100	24,86	71,54
C27	100	19,65	80,35
C28	100	21,75	78,25
C29	100	24,28	75,72
C30	100	23,27	76,73
C31	100	22,87	77,13

No se observaron diferencias significativas en la remoción de HAT entre el control abiótico y el cultivo mixto, con porcentajes de remoción de 3,6 y 3,5%, respectivamente. Estos valores son similares y las diferencias alcanzadas se encontraron dentro del porcentaje de recuperación del método (98%), con un error relativo del 2,2% y un límite de detección de 0,35 µg/ml.

El comportamiento exhibido por el cultivo bacteriano mixto constó de una etapa de crecimiento exponencial entre los días cero ($3,0 \times 10^6$ UFC/ml) y seis ($1,3 \times 10^9$ UFC/ml), seguido de un descenso poblacional en el día nueve y continuo ascenso en el día doce ($3,1 \times 10^9$ UFC/ml), punto donde se inició una etapa de declive que se extendió hasta el día 21 con un valor final de $1,3 \times 10^8$ UFC/ml (figura 2).

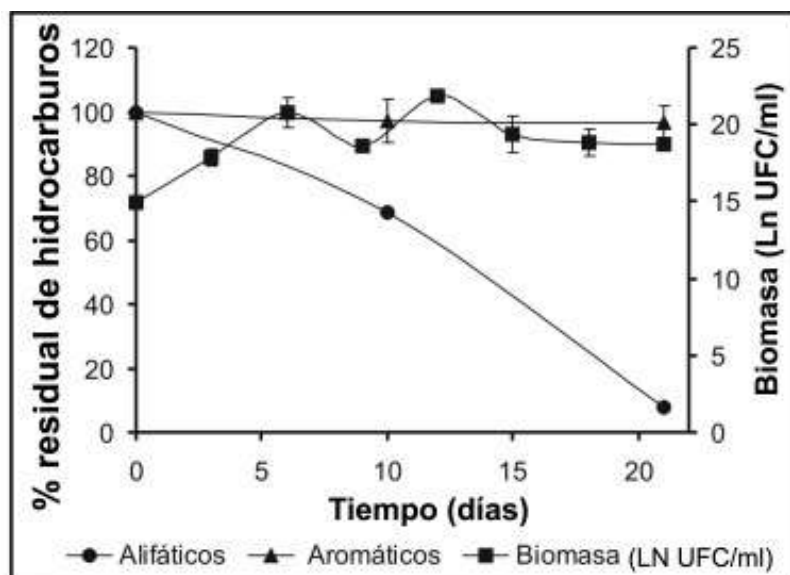


Figura 2. Curva de crecimiento del cultivo bacteriano mixto y porcentaje residual de hidrocarburos alifáticos y aromáticos durante 21 días

Ensayo de degradación de organoclorados. A partir de las pruebas de SH y CMI se escogieron 22 cepas para realizar los ensayos de degradación. El efecto degradador de las bacterias permitió reducir en 60 días la concentración inicial de DDT (1.600 ng/l) en un 68,8% y por factores abióticos un 29,1%; siendo el DDD el principal metabolito de la degradación.

La curva de crecimiento del cultivo mixto mostró una etapa exponencial entre los días cero y quince, con un valor máximo promedio de $2,6 \times 10^8$ UFC/ml, seguido de un leve descenso poblacional hasta el día treinta, momento en el cual inició la fase estacionaria que se mantuvo hasta el final del ensayo con un valor de $2,09 \times 10^8$ UFC/ml (figura 3).

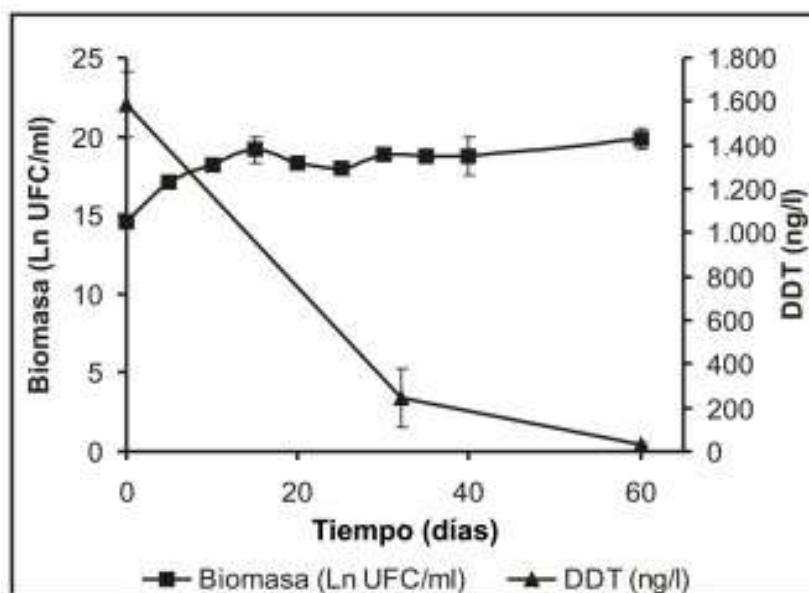


Figura 3. Curva de crecimiento del cultivo bacteriano mixto y perfil de la concentración de DDT durante 60 días

Identificación de cultivos bacterianos mixtos usando la secuencia del Gen 16S rDNA. Se seleccionaron ocho cepas del cultivo mixto hidrocarburos (CMH) y siete del cultivo mixto plaguicidas (CMO) para ser identificadas molecularmente. De cinco de las 15 cepas (CCBM 28, CCBM 52, CCBM 138, CCBM 139 y CCBM 142), no se obtuvieron amplificaciones del gen aún

cuando se variaron las condiciones de la reacción, concentración de Tag polimerasa hasta 3 ug/ μ l, concentración del MgCl₂ y concentración de ADN. El CMO estuvo conformado por cepas bacterianas de los géneros *Acinetobacter*, *Brevibacillus* y *Pseudomonas*. El CMH estuvo conformado por los géneros *Bacillus*, *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* y *Ralstonia* (tabla 4).

Tabla 4. Identificación molecular de las cepas bacterianas pertenecientes al cultivo mixto de plaguicidas e hidrocarburos del Caribe colombiano. (NCBI = National Center for Biotechnology Information; NI = No Identificada)

Ensayo	Código de la cepa	Código de acceso (NCBI)	Homólogo cercano	Porcentaje de similitud
Hidrocarburos	CCBM28	-	No se pudo secuenciar	NI
Hidrocarburos	CCBM30	AY838390.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> HPC800	85,6
Hidrocarburos	CCBM31	DQ490332	<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> KVD-unk-44	92,2
Hidrocarburos	CCBM34	AY293865.	<i>Pseudomonas sp.</i> NUST03	88
Hidrocarburos	CCBM52	-	No se pudo secuenciar	NI
Hidrocarburos	CCBM56	DQ785822.	<i>Ralstonia sp.</i> MMB075	83,3
Hidrocarburos	CCBM76	AY293865	<i>Pseudomonas sp.</i> NUST03	88
Hidrocarburos	CCBM135	DQ907936	<i>Bacillus pumilus</i> XJU-13	84,2
Plaguicidas	CCBM137	DQ834361.	<i>Acinetobacter sp.</i> BYC3	94,2
Plaguicidas	CCBM138	-	No se pudo secuenciar	NI
Plaguicidas	CCBM139	-	No se pudo secuenciar	NI
Plaguicidas	CCBM140	AJ586380.	<i>Brevibacillus agri</i>	67,2
Plaguicidas	CCBM141	DQ837570.	<i>Pseudomonas sp.</i> K1	59,7
Plaguicidas	CCBM142	-	No se pudo secuenciar	NI
Plaguicidas	CCBM143	DQ837570.	<i>Pseudomonas sp.</i> K1	59,7

DISCUSIÓN

Las diferencias en la diversidad y densidad de morfotipos reportados en cada estación, se debió posiblemente a la influencia de diferentes tipos de descargas y a las características

granulométricas de los sedimentos, que presentaron un porcentaje de lodos entre 51-100% como el departamento de Sucre y Córdoba (tabla 1). El alto contenido de lodos favorece el proceso de adsorción de contaminantes orgánicos e inorgánicos y a su vez, permite la selección

de determinadas especies microbianas (Torres et al., 2001).

Los recuentos poblacionales encontrados en los sedimentos presentaron valores similares a los reportados por Österreicher et al. (2003) y Vezzulli et al. (2004) en sus investigaciones. El grupo predominante en los aislamientos fue el de bacilos gram negativos como ha sido descrito por Ruberto et al. (2003), quienes encontraron que este grupo microbiológico desempeña un papel importante en los procesos de degradación de hidrocarburos. La presencia de lipopolisacáridos en sus membranas ayuda en la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos en sistemas acuosos y contribuye al incremento en la superficie de ataque del contaminante (Sikkema et al., 1995). Esta particularidad les confiere una ventaja comparativa frente a las bacterias Gram positivas en la asimilación de COP.

En el ensayo de degradación de hidrocarburos se observó una transformación significativa por acción de las bacterias al igual que en otras investigaciones, donde se han reportado porcentajes de degradación de la fracción alifática entre el 50 y 91,3% en un periodo de tres días a un mes (Márquez et al., 2001; Palittapongarnpim et al., 1998; Plohl y Leskovsek, 2002; Sharma y Pant, 2000).

El pristano y fitano son alcanos ramificados persistentes empleados como indicadores de degradación microbiana en procesos de biorremediación en cortos periodos de tiempo (Wang y Fingas, 2003). En el ensayo se mostró una degradación de pristano y fitano del 30 y 73,8%, respectivamente (tabla 3). En otras investigaciones llevadas a cabo por Sharma y Pant (2000) se alcanzó la degradación del pristano en un 30%, con la oxidación del compuesto y formación de ácidos mono y dioicos. Se ha encontrado en estudios de degradación que el pristano y fitano han permanecido hasta el final de los ensayos mientras los alifáticos lineales se han transformado totalmente (Ghazali et al., 2004; Penet et al., 2004).

Se determinó que la curva del CMH logró su máximo crecimiento durante los días 6 y 12 con valores de $1,3 \times 10^9$ y $3,1 \times 10^9$ UFC/ml, posiblemente las cepas bacterianas se encontraban creciendo a expensas de los hidrocarburos alifáticos y utilizaron estos compuestos como fuente de carbono y energía.

El porcentaje de remoción de HAT alcanzado por el cultivo bacteriano no fue significativo y las pérdidas presentadas correspondieron a fenómenos de volatilización y evaporación. Estas pérdidas minimizaron el efecto causado por el metabolismo microbiano, por esto Ruberto et al. (2003) plantean la necesidad de prolongar el tiempo de ensayo para su detección. El ACPM es una fuente rica en hidrocarburos alifáticos y estos son más susceptibles al ataque microbiano, seguidos por los hidrocarburos ramificados, aromáticos de bajo peso molecular, y por último los aromáticos de alto peso molecular y cicloalcanos (Leahy y Colwell, 1990; Plohl y Leskovsek, 2002).

Durante los ensayos de plaguicidas el DDD fue el principal producto del metabolismo. La conversión de DDT a DDD es una de las reacciones microbianas más importantes que se presenta bajo condiciones reductoras en ambientes contaminados con insecticidas organoclorados. La mayoría de las investigaciones indican que la dechloración reductiva involucra la sustitución un átomo de cloro en la cadena alifática por uno de hidrógeno (Aislabie et al., 1997; Lal y Saxena, 1982; Sims et al., 1991).

El crecimiento exponencial del CMO en los primeros días obedeció a la asimilación del extracto de levadura del medio, el cual favoreció la transformación del DDT a DDD, de forma cometabólica, como ha sido corroborado en otros estudios (Aislabie et al., 1997; Francis et al., 1976; Hay y Focht, 1998; Nadeau et al., 1994). En el periodo de la fase estacionaria (día 30-60), tiempo en el cual la tasa de crecimiento es igual a la tasa de mortalidad y los nutrientes son limitados, la concentración de DDT continuó

disminuyendo paulatinamente hasta alcanzar un valor final de 33,8 ng/l.

La presencia de los géneros bacterianos encontrados en los cultivos mixtos degradadores de hidrocarburos y plaguicidas como *Bacillus* y *Pseudomonas* es de gran interés para la formulación a futuro de pools microbianos de aplicación en campo teniendo en cuenta que estos géneros han sido destacados en diversos procesos de degradación de COP (Gallego et al., 2001; Kaplan y Kitts, 2004; Vargas et al., 2004).

CONCLUSIONES

Los cultivos mixtos mostraron alta diversidad y potencial enzimático para remover los COP. Al ser microorganismos aislados de lugares contaminados con hidrocarburos y plaguicidas se encontraron adaptados a la presencia de estos contaminantes y transformaron en un 92,15% la fracción alifática del ACPM y en 97,9% el DDT.

REFERENCIAS

- Aislabie J, Richards N, Boul H.** 1997. Microbial degradation of DDT and its residues—a review. *New Zealand Journal Agriculture Research*, 40:269-282.
- Francis A, Spanggord R, Ouchi G, Bramhall R, Bohomos N.** 1976. Metabolism of DDT analogues by a *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 32:213-216.
- Gallego J, Loredó J, Llamas J, Vásquez F, Sánchez J.** 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*, 12:325-335.
- Garay J, Betancourt J, Ramírez G, Marín B, Cadavid B, Panizzo L, Lesmes L, Sánchez S, Lozano H, Franco A.** 2003. *Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos: aguas, sedimentos y organismos*. INVEMAR. Santa Marta. (Serie Documentos generales; N.º 13)
- Ghazali F, Salía R, Sallehi A, Basri M.** 2004. Biodegradation in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54:61-67.
- Gómez M.** 2003. Selección de un consorcio bacteriano aeróbico de la Ciénaga Grande de Santa Marta con capacidad degradadora del plaguicida organoclorado-Aldrin. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Universidad

La aplicación de estos cultivos mixtos o consorcios permite incrementar los porcentajes de remoción de los contaminantes debido a los efectos sinérgicos y a las relaciones de mutualismo que se puedan dar entre las especies bacterianas. Pruebas piloto en campo permitirán evaluar la dinámica de los diferentes microorganismos que conforman el cultivo mixto.

AGRADECIMIENTOS

A Colciencias, al Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVEMAR), al Centro de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de los Andes (CIMIC), al CEBIMAR y a la Universidad Nacional; por el apoyo financiero, logístico y técnico al proyecto “Selección y aplicación de bacterias marinas con capacidad degradadora de compuestos orgánicos persistentes (COP) en el Pacífico y Caribe colombiano” (código de Colciencias 2105-09-13524).

Nacional de Colombia, Santa Marta, D.T.C.H., Colombia.

- Grimalt J, Fernández P, Berdie L, Vilanova RM, Catalán J, Psenner R, Hofer R, Appleby PG, Rosseland BO, Lien L, Massabuau JC, Battarbee RW.** 2001. Selective trapping of organochlorine compounds in mountain lakes of temperate areas. *Environmental Science Technology*, 35:2690-2697.
- Hay A, Focht D.** 1998. Cometabolism of 1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethylene by *Pseudomonas acidovorans* M3GY grown on biphenyl. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:2141-2146.
- Kaplan C, Kitts C.** 2004. Bacterial succession in a petroleum land treatment unit. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3):1777-1786.
- Lal R, Saxena D.** 1982. Accumulation, metabolism and effects of organochlorines insecticides on microorganisms. *Microbiological Review*, 46:95-127.
- Leahy J, Colwell R.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Review*, 54:305-315.
- Marín B, Garay J, Ramirez G, Betancourt J, Troncoso W, Gómez M, Sánchez J, Cadavid B, Acosta, J, Vivas J, Casas M, Lozano P, Arias L.** 2004. Diagnóstico y evaluación de la calidad ambiental marina en el Caribe y Pacífico colombiano. Red de vigilancia para la conservación y protección de las aguas marinas y costeras de Colombia. Diagnóstico Nacional y Regional. INVEMAR. Santa Marta (Magdalena), Colombia.
- Márquez F, Hernández V, Lamela T.** 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution*, 128:313-320.
- Mc Manus J.** 1988. Grain size determination and interpretation. Pp. 63-85. *En: Tucker M (ed.). Techniques in sedimentology.* Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Nadeau L, Menn F, Breen A, Sayler G.** 1994. Aerobic degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. *Applied and Environmental Microbiology*, 60:51-55.
- Österreicher P, Langenbach T, Torres A, Tácio M, Eurípedes A, Wagener A.** 2003. HCH distribution and microbial parameters alter living of a heavily contaminated soil in Rio de Janeiro. *Environmental Research*, 93:316-327.
- Palittapongarnpim M, Pokethitiyook L, Suchart E, Tangbanluekal M.** 1998. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic. *Biodegradation*, 9:83-90.
- Penet S, Marchal R, Sghir A, Monot F.** 2004. Biodegradation of hydrocarbon cuts for diesel oil formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 66:40-47.
- Plohl K, Leskovsek H.** 2002. Biological degradation of motor oil water. *Acta Chimica Slovenica*, 49:279-289.
- Readman JW, Montoura RF, Rhead MM.** 1987. A record of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) pollution obtained from accreting sediments of the Tamar estuary, UK: evidence for non-equilibrium behavior of PAH. *The Science of the Total Environment*, 66:73-94.
- Ream W, Field K.** 1999. *Molecular biology techniques. An intensive laboratory*

- course. Academia Press. San Diego (CA), U. S. A.
- Rodríguez R, Rojas N, Enríquez F, Martínez J, Poggi H.** 1999. Transformer oil degradation by an indigenous microflora isolated from a contaminated soil. *Resources, Conservation and Recycling*, 27:15-26.
- Ruberto L, Vazquez S, Mac Cormack W.** 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora: Biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52:115-125.
- Sharma S, Pant A.** 2000. Biodegradation and conversion of alkanes and crude oil by marine *Rhodococcus* sp. *Biodegradation*, 11:289-294.
- Sikkema J, Bont J, Poolman B.** 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, 59:201-222.
- Sims J, Suflita J, Russell H.** 1991. *Reductive dehalogenation of organic contaminants in solids and ground water*. EPA Ground Water Sigue. <<http://www.epa.gov/ada/download/issue/reddehal.pdf>>. Fecha de consulta: 20 de octubre de 2005.
- Torres J, Vieira E, Malm O.** 2001. DDT environmental persistence forms its use in a vector control program: a case study. *Environmental Research*, 86:174-182.
- Vargas P, Cuellar R, Dussán J.** 2004. Biorremediación de residuos del petróleo. *Hipótesis-apuntes científicos uniandinos*, 4: 44-49.
- Vezzulli L, Pruzzo C, Fabiano M.** 2004. Response of the bacterial community to in situ bioremediation of organic-rich sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 49:740-751.
- Wang Z, Fingas M.** 2003. Development of oil hydrocarbon fingerprinting and identification techniques. *Marine Pollution Bulletin*, 47:423-452.
- Xu R, Obrad JP.** 2004. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in oil-contaminated beach sediments treated with nutrient amendments. *Journal Environmental Quality*, 33:861-867.