



# Aislamiento e identificación de bacterias heterótrofas de suelos contaminados con petróleo provenientes de oleocentros de la ciudad de Trujillo, Perú

Isolation and identification of heterotrophic bacteria in soils contaminated with oil from of oleocentros of the city of Trujillo, Peru

Luis A. Llenque Díaz

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo, Perú.  
[lullediaz@yahoo.com](mailto:lullediaz@yahoo.com)

## RESUMEN

Se procedió a aislar cultivos bacterianos de suelos de Oleocentros de la ciudad de Trujillo, Perú; las muestras de suelo recolectadas de aproximadamente 20 cm de profundidad fueron sometidas a incubación de pre-enriquecimiento por 5 días con petróleo al 0.5 % e incubados a temperatura ambiente. Luego se prepararon diluciones seriadas hasta  $10^{-2}$  y fueron sembradas 0,1 ml de las dos últimas diluciones en agar nutritivo por el método de superficie con asa de Drigalsky. La población heterótrofa aislada se caracterizó por formar colonias blancas, planas, algo extendidas, bordes aserrados y con un brillo metálico; otras colonias de color amarillo, secas, duras. Estos hallazgos preliminares permitieron continuar con los ensayos correspondientes a una selección secundaria en cultivo sumergido que se hizo en tubo con caldo de soya triptica, sales biliares y petróleo al 1%, seleccionándose los cultivos que mostraron crecimiento expresado en turbidez del medio a 37°C por 48 horas, siendo subcultivados en medio fresco e incubados en las mismas condiciones; finalmente se sembraron en caldo mínimo de sales más petróleo 1 % y solo 5 cultivos tuvieron crecimiento. Al evaluar su comportamiento bioquímico mediante las pruebas indican una identificación preliminar que son bacilos pequeños, aerobios, Gram negativos, catalasa y citrato positivo y crecimiento en caldo nutritivo a 42° C; características que corresponden al género *Pseudomonas* en cada una de las muestras analizadas, resaltando su capacidad de crecer en el ambientes contaminados con petróleo en las condiciones ensayadas; por consiguiente se destaca la viabilidad de la bacteria en las muestras recolectadas así como después de evaluar su crecimiento con petróleo en medio sumergido, proponiendo su evaluación posterior en biorreactores agitados.

**Palabras clave:** Bacterias heterótrofas, *Pseudomonas*, Degradadoras de petróleo.

## ABSTRACT

Bacterial cultures were isolated from soils of Oleocentros of the city of Trujillo, Peru; soil samples collected from approximately 20 cm depth were subjected to the incubation of pre-enriquecimiento for 5 days with oil 0.5% and incubated at room temperature. Then prepared serial dilutions to  $10^{-2}$  and they were seeded 0.1 ml of the two latest dilutions on nutrient agar surface with handle method. The isolated heterotrophic population was characterized by forming colonies white, flat, somewhat extended, edges serrated with a

metallic sheen; other colonies of yellow colour, dry, hard. These preliminary findings enabled to continue corresponding to a secondary selection tests in submerged culture which became in tube with soy broth media, bile salts and oil 1%, by selecting the crops that showed growth expressed in turbidity of the medium at 37 ° C for 48 hours, to be subcultured amid conditions and incubated under the same conditions; finally planted in stock sales than more oil 1% and only 5 crops were growing. To be evaluated by biochemical behavior evidence suggests a preliminary identification that are small bacilli, aerobic, Gram-negative, catalase and citrate positive and growth in nutrient broth at 42 ° C; features that correspond to the genus *Pseudomonas* in each of the samples analyzed, highlighting its ability to grow in the environment contaminated by oil in the tested conditions; therefore highlights the viability of the bacteria in samples collected and after assessing its growth with oil immersed in the middle, proposing its ex-post evaluation in stirred bioreactors.

**Key words:** Heterotrophic bacteria, *Pseudomonas*, Petroleum based.

## INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista ambiental, las bacterias son muy importantes, pues tienen la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos a sustancias inocuas, que pueden ser reciclados al medio ambiente y también de aquellas bacterias que tienen la capacidad de oxidar una gran cantidad de compuestos orgánicos producidos y utilizados industrialmente<sup>1</sup>. Se estima que de todos los microorganismos presentes en el suelo, las bacterias son aquellas que se presentan en un mayor número y también las más importantes en la degradación de hidrocarburos<sup>2</sup>.

La mayoría de las células procariotas son heterótrofas; es decir, consiguen su alimento incorporando materia orgánica formada por otros seres vivos, disminuyéndolos de los ecosistemas, mediante catabolismos aeróbios o anaeróbios (fermentaciones), muchas de las cuales son útiles para nuestros propósitos. Por ejemplo existe una gran variedad de microorganismos identificados en la degradación de compuestos derivados del petróleo<sup>3</sup>, destacando el género *Pseudomonas* que está constituida por bacterias tipo bacilar Gram negativos, con flagelo polar, catalasa positivos y no forman esporas, demuestra una gran diversidad metabólica, y consecuentemente son capaces de colonizar un amplio rango de nichos, siendo aislado tanto en suelos limpios como en suelos contaminados por productos biogénicos y xenobióticos, también son microbiota predominante en la rizósfera y en la filósfera de plantas; del mismo modo, se han aislado de ambientes acuáticos, tanto de agua dulce como de aguas marinas.

El petróleo crudo, contiene varias clases de componentes hidrocarbonados que pueden ser clasificados en 4 grupos: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos<sup>4</sup>. Los componentes del petróleo que tienen efectos más nocivos, son los hidrocarburos aromáticos, puesto que algunos actúan como tóxicos agudos y otros, como el benzopireno, tienen actividad carcinogénica<sup>5</sup>. La biodegradación de hidrocarburos en suelos, es una alternativa que puede emplearse tanto para el tratamiento, como para la disposición final de los residuos producidos por las refinerías del petróleo<sup>6</sup>. Las bacterias requieren de una amplia área de contacto entre ellas y el petróleo, para llevar a cabo, la emulsificación del petróleo en el medio acuoso circundante<sup>7</sup>.

Lopólito<sup>8</sup> llevó a cabo experimentos de biodegradación de hidrocarburos utilizando diferentes sustratos como el petróleo, kerosene, aceite lubricante y benceno, y como nutriente un medio mínimo y fertilizante foliar comercial, concluyendo que la inoculación previa acelera el proceso de degradación. En tanto que, Acuña y col<sup>9</sup> observaron que es posible la realización de un proceso de biodegradación de hidrocarburos en la muestra de suelo apoyado por las características físicas y químicas estudiadas en la muestra de suelo, así como, por la composición de la comunidad bacteriana, que demostró capacidad de producir biomasa en presencia de petróleo, gasoil, kerosén y aceite lubricante.

El proceso de biorremediación aerobia de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo, a nivel laboratorio y piloto, alcanzó tasas de remoción del 66 al 93 %, donde el mejor tratamiento fue el que contenía lodos residuales (biosólidos) como fuente alterna de nutrientes. La mineralización o madurez de los lodos influyó en la tasa de remoción de hidrocarburos, entre más frescos mayor

remoción. La densidad fue también un factor importante para aumentar el porcentaje de degradación<sup>11</sup>.

El interés de la investigación fue en primer lugar, lograr el aislamiento de una población bacteriana nativa con capacidad de utilizar el petróleo como fuente de carbono para su desarrollo y crecimiento a partir de suelos contaminados; y en segundo lugar, seleccionar un cultivo bacteriano con una gran capacidad de adaptación para crecer en condiciones de cultivo sumergido en un medio mínimo de sales complementado con petróleo al 1% dentro de un biorreactor agitado. Quedando finalmente, continuar con investigaciones posteriores para trabajar en el mejoramiento genético y buscar su aplicación in situ.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Recolección de las muestras de suelo

Se recolectaron muestras de suelo contaminados, aproximadamente 20 cm de profundidad, de dos grifos de la ciudad de Trujillo en bolsas de primer uso, rotulado y llevado al laboratorio de Fisiología y Genética Bacteriana.

### Pre-enriquecimiento de las muestras

A las muestras recolectadas se les colocó en recipientes plásticos de primer uso y se adicionó petróleo al 0.5 %, se homogenizó con una espátula y se incubó por 5 días a temperatura ambiente.

### Aislamiento de cultivos nativos

Se pesó 10 g de muestra en un matraz y se adicionó 40 ml de agua destilada estéril, se agitó manualmente por 10 minutos, se dejó en reposo por 15 minutos. Seguidamente se trasvasó 1 ml del sobrenadante, en tubos de conteniendo 9 ml de solución salina fisiológica estéril y finalmente una segunda dilución en similares condiciones. Se sembró 0.1 ml de la dilución en agar nutritivo por el método de superficie con asa de Drigalsky, e incubó a 37°C por 48 h.

### Caracterización de los cultivos aislados

#### A. Morfológica

Se realizó una caracterización macroscópica, por medio de la observación de la morfología de las colonias en un estereoscopio; a demás se realizó una tinción Gram de las colonias aisladas. Luego se procedió a rotular cada cultivo con un código FGB seguida de un número secuencial.

#### B. Fisiológica

Se sembró el cultivo puro en agar nutritivo por la técnica en camada y se incubó a 37°C por 24 h. Se cosechó la población con SSFE y se colocó 1 ml de inóculo, con una turbidez equivalente al tubo n° 1 del Nefelómetro de Mac Farlan, a 8,9 ml de caldo soya triptica, sales biliares 0.5 ml (2 g/30 ml) y 1.0 ml de petróleo; se homogeneizó por agitación manual por 5 min y se incubó a 37°C por 48 h.

Se eligieron los cultivos que mostraron turbidez en el medio y se hicieron siembras en agar soya triptica más petróleo 1 % y se incubó a 37°C por 48 h. Cada cultivo fue centrifugado y lavado con solución salina fisiológica y se preparó suspensiones bacterianas equivalentes al tubo n° 1 del nefelómetro de Mac Farland.

Luego, se prepararon tubos de ensayo con 8.9 ml de medio mínimo de sales (MgSO<sub>4</sub>, 0.1 g; NH<sub>4</sub>Cl, 0.5 g, Ca<sub>2</sub>Cl, 0.8 g; H<sub>2</sub>K PO<sub>4</sub>, 0.1 g; NaCl, 0.3 g; 200 ml de agua destilada), y se suplementó con 0,1ml de petróleo Diesel y 0,5 ml de solución de sales biliares (2g en 30 ml); y, finalmente se adicionó 1 ml de la suspensión bacteriana a evaluar. Se homogeneizó manualmente por 5 min y se incubó a 37°C por 5 días.

Cada uno de los cultivos fueron sembrados en agar sales minerales con 1% de petróleo en superficie e se incubó a 37°C por 48 h y se aislaron cultivos puros en agar nutritivo inclinado con petróleo.

### Identificación de los cultivos seleccionados

Se hicieron tinciones Gram y las pruebas bioquímicas de catalasa, hemólisis, crecimiento en agar citrato, TSI, crecimiento a 42°C<sup>19</sup>.

## RESULTADOS

Se hallaron cocos y bacilos, Gram (+), cuyas colonias se caracterizan por ser planas, brillantes o cremas y planas (Tabla 1, Fig. 1). Cuando se hizo el cultivo en medio líquido, apareció turbidez variable, aspecto de nata, con ascenso de micelio mayormente rápido y sólo dos cultivos pigmentados, asimismo, se determinó que son catalasa (+), hemólisis mayormente positivos y solo dos con pigmentación positiva (Tablas 2 y 3)

Tabla 1. Morfología macro y microscópica de las bacterias aisladas de muestra de suelo contaminado provenientes de grifos de la ciudad de Trujillo, Perú.

Parámetro	Cultivo FGB DP									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Morfología de colonia	Mediana, plana, brillante, amarilla	Mediana, plana, brillante, amarilla	Mediana, plana, brillante, blancas	Grande, plana, brillante, blanca	Mediana, plana, brillante, Blanca	Grande, plana, blanca	Pequeña, Irregular crema	Grande, plana, crema	Grande, plana, crema	Grande, plana, crema
Gram	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Forma	Coco	Coco	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo

Leyenda: FGB DP: Fisiología y Genética Bacteriana Degradador Petróleo

Tabla 2. Características de crecimiento en medio líquido con petróleo 1 % de las bacterias aisladas de la muestra de suelo contaminado de oleocentros de la ciudad de Trujillo, Perú.

Pará-metro	Cultivo FGB DP									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Turbidez	+	+	+	++++	++	+	+	+	++	++
Aspecto	Nata y sediment o amarillo	Nata	Nata	Nata y sedimen to	Nata	Nata y sedim ento	Nata y sedim ento	Nata	Nata y sedim ento	Nata
Ascenso micelas	deRápido	Rápido	Rápido	Lento	Rápido	Rápido	Lento	Lento	Lento	Lento
Pigmentación verde	++	-	+	+++	-	-	-	-	-	-

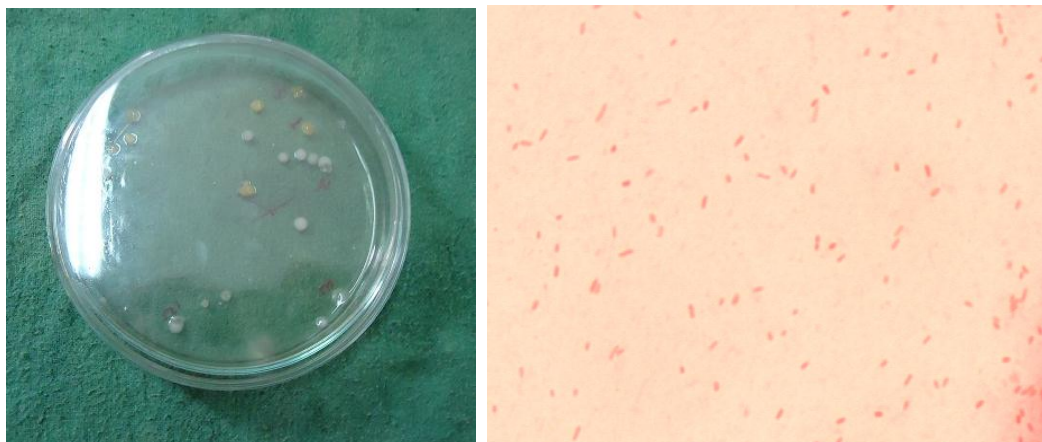
Tabla 3. Característica bioquímica de las bacterias aisladas de la muestra de suelo contaminado de grifos de la ciudad de Trujillo, Perú, con capacidad de crecer en medio en medio líquido con petróleo 1% .

Parámetro	Cultivo FGB DP									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hemólisis	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
TSI	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
Crecimiento a 42°C	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	+

## DISCUSIÓN

En los últimos años, la ecología microbiana ha direccionado esfuerzos en determinar los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar hábitats contaminados; para ello, han sido desarrollados estudios de diversidad, dinámicas poblacionales y de comunidades presentes en suelos contaminados, especialmente aquellas relacionadas con asociaciones de bacterias

biodegradadoras<sup>11</sup>. Por lo que los hallazgos logrados por investigaciones sucesivas<sup>12,13,14</sup> para evaluar la microflora presente en los ambientes contaminados constituyéndose en una fuente adecuada para el aislamiento de microorganismos con mejores capacidades de degradar los hidrocarburos, los mismos que son evaluados *in vitro*, mejorados genéticamente, y posteriormente lograr su aplicación *in situ* para menguar la problemática ambiental.



**Fig. 1.** Placa Petri con agar nutritivo, donde se observa la población heterótrofa aislada de la muestra de suelo contaminado proveniente de grifos de la ciudad de Trujillo (izquierda) y observación microscópica del cultivo FGB DP 4, seleccionado con capacidad de crecer en petróleo, aislado de muestra de suelo contaminado de grifos de la ciudad de Trujillo (derecha).

En la fase de aislamiento utilizando petróleo diesel como fuente de carbono y energía, permitió seleccionar bacilos, que tenían una colonia de tamaño mediana y grande, planas brillantes blancas; y cocos Gram negativos, que formaron colonias de tamaño mediano, planas, brillantes, amarillas, en cada una de las muestras evaluadas como se indica en la Tabla 1, se indican los 10 cultivos bacterianos seleccionados en el ensayo de crecimiento en medio Agar nutritivo mas petróleo 1 %. Resultados relativamente similares a los obtenidos por Passos y cols<sup>13</sup>, que investigaron la población bacteriana autóctona de efluentes petroquímicos del municipio de Fortaleza, Brasil; utilizando agar nutritivo, encontraron características morfológicas de todas las colonias de la primera colección presentaban un aspecto cremoso, consistencia mucosas y de coloración amarillenta, pero que frente a la coloración Gram fueron Gram-positivos y de forma de cocobacilar.

Los cultivos de 48 h de incubación presentaron abundante crecimiento con morfologías de colonias brillantes grandes y algunas pequeñas, borde continuo, cremosas, convexas y coloración amarilla. De las colonias aisladas fueron seleccionadas 10 colonias con crecimiento abundante y fueron sembradas en agar sale minerales con 1% de petróleo, tal como se presenta en otras investigaciones y tuvieron crecimiento en la totalidad lo que significa que las bacterias utilizan el petróleo como fuente carbonada y energía para su crecimiento y desarrollo.

Entre los cultivos seleccionados, el cultivo FGB DP4 se caracterizó por un crecimiento abundante en el medio líquido con petróleo a las 72 h de incubación, tuvo una pigmentación color verdoso y con la bioquímica realizada se presume posible bacteria del género *Pseudomonas*<sup>15</sup>. En esta etapa, fue evidente la formación de natas blanquecinas en la superficie del tubo (hábitat de biopelícula), la cual fue más abundante al cuarto día de incubación, mientras que las algunas muestras presentaron abundante turbidez, nata en la parte superior y formación de sedimento, el cual se hizo mucho más abundante el día quinto.

Por lo tanto, el cultivo *in vitro* permitió aislar y seleccionar cultivos de *Pseudomonas* con características importantes de tener un buen crecimiento en petróleo en las condiciones ensayadas resultando excelentes para investigaciones científicas posteriores. Este género es uno de los más proclives a la degradación de compuestos orgánicos, especialmente cepas de la especie

*Pseudomonas putida*<sup>16</sup> por su amplio potencial catabólico del género que viene dado en muchos casos por la presencia de determinantes plasmídicos y transposones autotransmisibles<sup>17</sup>.

Se seleccionaron hasta 5 cultivos con potencial catabólico sobre el petróleo, resaltando la ubicuidad y capacidad de este género bacteriano para explotar una amplia variedad de nutrientes reflejando una adaptación al medio ambiente que no encuentra semejanza con otros géneros bacterianos, siendo excelentes para investigaciones científicas posteriores de biorremediación de suelos y aguas<sup>18,20</sup>, pasando de pruebas de laboratorio a pruebas *in situ*, debido a que muchos factores ambientales podrían afectar la habilidad de estas bacterias para degradar hidrocarburos en ecosistemas contaminados.

## CONCLUSIÓN

Los suelos contaminados con petróleo presentan una población heterótrofa propia, lográndose aislar y seleccionar cultivos con características del género *Pseudomonas* capaces de crecer en un medio mínimo de sales suplementado con petróleo al 1 % en cultivo sumergido

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rittmann B. Biotecnología del medio ambiente, Principios y aplicaciones. España McGraw-Hill; 2001.
2. Sarubbi A. Aspectos importantes en biorremediación. AIDIS Argentina. 2000. Disponible En <http://www.aidisar.org>. Consultado el 15 ene. 2004
3. Valderrama B., Téllez-Sosa. Microbiología del petróleo y sus derivados. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, México; 2000.
4. Apezteguía A, Bratovich C. Bacterias degradadoras de petróleo y derivados. XXVI Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Argentina, 1999: 46.
5. Cisnero E. Manual de Química Ambiental. Programa de Educación ambiental. UNALM. Lima- Perú, 1996.
6. Morry.....
7. Morris A. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Editorial Mc Graw Hill. Interamericana. Madrid- España, 1997.
8. Lopolito M. 2005. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo y compuestos relacionados. Instituto nacional de ciencias y técnicas hídricas. Argentina.
9. Acuña A, Pucci, G, Morales M, Pucci O. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 2010; 30:29-36
10. Martínez-Prado A, Pérez-López E, Pinto-Espinoza J, Gurrola-Nevárez B, Osorio-Rodríguez A. Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. Rev. Int. Contam. Ambie. 2011; 27(3): 241-252.
11. Bracho M, Díaz L, Soto L. M. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos por *Pseudomonas* spp. Ciencia. 2004; 12:269-275.
12. Bossert I, Bartha R. The fate of petroleum in soil ecosystem. In: Petroleum. Microbiology. Atlas, R. (Ed.). Macmillan Publishing Co. 1984: 436 - 455.
13. Passos Barbosa S, Campelo Aminha M, França Paz M. Identificação da microbiota bacteriana autóctone de efluentes petroquímicos no Município de Fortaleza. II Congresso de Pesquisa e Inovação Da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica João Pessoa - Pb – 2007.
14. Echeverri G, Manjarrez G, Cabrera M. Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. NOVA - Publicación Científica En Ciencias Biomédicas 2010;8(13): 76-86.
15. Krieg, N. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 1. Baltimore: Williams & Wilkins; 1984
16. Castillo F, Roldán M. Biotecnología ambiental. Editorial Tebar, España 2005.
17. Prieto M. Caracterización molecular de la ruta catabólica del 4-hidroxifenilacetato de *Eseherichia coli* W. Memoria que para optar al grado de Doctor en Farmacia Universidad Complutense de Madrid, Madrid 1995.
18. Madigan M, Martinko J. Brock Biology of Microorganisms. 11th ed. edición. Prentice Hall; 2005

19. Mc Faddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. México DF: Editorial Médica Panamericana; 1991
20. Samanez E. Biodegradación bacteriana por bioestimulación en suelos contaminados con petróleo crudo TESIS de Magíster en Biotecnología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Post Grado. Lima – Perú, 2008.