

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS NATIVAS
CON CAPACIDAD HIDROCARBUROLÍTICA DEL POZO PETROLERO DE
SAN SEBASTIÁN, LORICA, DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA.

ANA KARINA NISPERUZA VIDAL
MELISSA MONTIEL AROCA

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
MONTERÍA
2010

CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS NATIVAS
CON CAPACIDAD HIDROCARBUROLÍTICA DEL POZO PETROLERO DE
SAN SEBASTIÁN, LORICA, DEPARTAMENTO DE CÓRDOBA.

ANA KARINA NISPERUZA VIDAL
MELISSA MONTIEL AROCA

Trabajo de grado

Asesor

Luis Oviedo Zumaqué
Master en Microbiología

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA
MONTERÍA
2010

NoNota de aceptación:

Firma del presidente del jurado

Firma del jurado

Montería, de del 2010

Firma del jurado

CONTENIDO

	Pág.
CONTENIDO	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE ANEXOS	III
RESUMEN	IV
INTRODUCCIÓN	V
OBJETIVOS	14
1. PETRÓLEO	15
1.2 COMPOSICIÓN DEL CRUDO DEL PETRÓLEO	16
1.3 EL PETRÓLEO EN COLOMBIA	17
1.3.1 REFINACIÓN	18
1.3.2 Transporte	19
1.3.2.1 Oleoducto Caño Limón – Coveñas	19
1.3.2.2 Oleoducto de Alto Magdalena.	19
1.3.2.3 Oleoducto Central de los Llanos.	19
1.3.2.4 Oleoducto Central S.A. (Ocensa).	19
1.3.2.5 Oleoducto de Colombia.	19
2. LA CONTAMINACIÓN CON HIDROCARBUROS	20
2.1 EVENTOS CONTAMINANTES DURANTE LA EXPLORACION PETROLERA	21
2.1.2 Detonación con cargas de dinamita.	21
2.1.3 Utilización de lodos químicos.	22
2.1.4 La fase de extracción.	22
2.1.5 El transporte.	23
2.2 CAUSAS DE DERRAMES POR LA ACTIVIDAD PETROLERA	23

2.2.1 Falla operacional.	24
2.2.2 Fatiga de Materiales.	24
2.2.2.1 Hurto.	24
2.2.2.2 Acto terrorista.	24
3. BIORREMEDIACIÓN	25
3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA BIORREMEDIACIÓN	25
3.1.1 Integración en el proceso de técnicas innovadoras	26
3.1.2 Desarrollo de técnicas rápidas de biología molecular	26
3.1.3 Exploración de las implicaciones del concepto de biodisponibilidad	26
3.1.4 Desarrollo definitivo de técnicas de bioaumentación	26
3.2 FUNDAMENTACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BIODEGRADACIÓN	26
3.3 MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN LOS HIDROCARBUROS	29
3.4 PARÁMETROS INDICADORES DE LA METABOLIZACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS	31
4. NORMATIVIDAD	32
5.MATERIALES Y METODO	34
5.1 AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS.	34
5.2 PRUEBA DE RESISTENCIA A PETROLEO CRUDO	36
5.3 IDENTIFICACION DE CEPAS RESISTENTES	38
6. ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS	39
CONCLUSIONES	VII
RECOMENDACIONES	VIII
BIBLIOGRAFIA	IX

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Distribución de géneros por zonas de aislamiento. (Fuente: las autoras).	39
Tabla 2. Identificación por Api20E® y Api20NE® de las mejores cepas resistentes a petróleo. *Porcentaje de identificación(Fuente: las autoras).	42

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Infraestructura petrolera de Colombia – Oleoductos Fuente: ECOPETROL S.A, 2009	19
Figura 2. Reacciones de las degradaciones aerobia y anaerobia. Fuente: MAROTO,M; ROGEL , J;2006	26
Figura 3. Crecimiento de consorcios hidrocarburolíticos Fuente: las autoras	40
Figura 4. Curva de crecimientos en la prueba de resistencia a petróleo crudo.	41

LISTA DE ANEXOS

	pág.
Anexo 1. UBICACIÓN Y DIVISIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO	48
Anexo 2. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS RESISTENTES	49
Anexo 3 . AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS.	50
Anexo 4. PRUEBA DE RESISTENCIA A PETROLEO CRUDO	52

RESUMEN

En la actualidad, los mecanismos de remediación del medio ambiente van encaminados a emplear agentes biológicos con el fin de minimizar los efectos adversos de ciertos procesos, principalmente químicos que han sido usados para dar solución a los problemas ambientales. El petróleo, uno de los recursos naturales más explotados en nuestro planeta, se ha convertido también en una importante fuente de contaminación debido a que este compuesto

y sus derivados son de difícil degradación y pueden permanecer activos durante tiempo prolongado. Ante esta situación se pretende dar una alternativa biorremediadora basada en la caracterización de cepas bacterianas nativas con capacidad hidrocarburofítica a partir de muestras del pozo petrolero de San Sebastián, Lórica, departamento de Córdoba. De estas muestras se aislaron e identificaron cuarenta cepas a las cuales se evaluó la capacidad de degradación de hidrocarburos, resultando las especies *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas aeruginosa* las más resistentes a concentraciones importantes de petróleo crudo.

Palabras claves: bacterias, hidrocarburofítica, petróleo

INTRODUCCIÓN

La industria de hidrocarburos es un sector que ha presentado un crecimiento constante a lo largo de la historia debido a que sus derivados tienen una gran demanda por parte de la mayoría de las actividades que realiza el hombre hoy en día. Aunque la explotación de petróleo está controlada rigurosamente por normas legales a nivel internacional que garantizan la protección de la comunidad y del medio ambiente, es una actividad que no está a salvo de provocar efectos adversos sobre estos, específicamente donde ocurre derrames de hidrocarburos o sus derivados, situación que se agrava por el desequilibrio ambiental que atraviesa el planeta.

Los derrames de petróleo constituyen uno de los aspectos más deplorables tanto para las naciones como para la especie humana, pues debido a sus consecuencias a corto y a largo plazo, se pone de presente la necesidad de llevar con continuidad una política de desarrollo sostenible que evite que este tipo de desastres se convierta en un problema con secuelas a largo plazo. En Colombia se ha vivido con frecuencia este tipo de situaciones, debido por lo general a actos violentos a los que se encuentran sometidos tanto la industria petrolera, como la población cercana a la infraestructura dedicada a esta actividad.

Según la Compañía Colombiana de Petróleos, ECOPETROL, durante los últimos quince años el oleoducto Caño Limón – Coveñas ha sufrido más de novecientos atentados terroristas, hechos que han conducido al derramamiento de más de cuatrocientos cincuenta millones de litros de petróleo en el medio ambiente. El impacto ambiental por los derrames de crudo ha dejado más de 2.600 Kilómetros entre ríos y quebradas y alrededor de 1.600 Hectáreas de ciénagas afectadas. Sólo en 1998 la guerrilla colombiana ocasionó el más grande derrame de crudo en aguas

continentales del mundo, con un volumen superior a 14.787.000 litros de petróleo, tragedia comparable con el accidente del buque petrolero Exxon Valdez, que vertió en las aguas de Alaska 42 millones de litros del crudo el 24 de marzo de 1989 (Atlas; Bartha, 2002; Restrepo, 2002).

Desde el año 2000 los ataques terroristas disminuyeron considerablemente con respecto a los años anteriores. En el año 2001, los grupos al margen de la ley realizaron 263 ataques, para el año 2002 la cifra llegó a 74 incursiones y para el primer semestre del 2003 la cantidad llegó a 60. Aunque los ataques han disminuido, los impactos ambientales permanecen en los diferentes ecosistemas afectados y se ven representados en las consecuencias ambientales (Restrepo, 2002).

En el caso del suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos, lo que ocasiona una mayor toxicidad (Restrepo, 2002; Siva *et al.*, 2004).

En el agua, la mancha generada por los hidrocarburos vertidos flota por diferencia de densidades impidiendo fenómenos importantes como la entrada de luz y el intercambio gaseoso, dando comienzo a la solubilización de compuestos hidrosolubles y a la afección de diferentes poblaciones: la primera población afectada por un derrame es el *Plancton*, en segundo lugar son afectados los macroinvertebrados, y la última población afectada son los *Bentos* o población de macroinvertebrados que viven en los fondos de los ríos y ciénagas (Plaza *et al.*, 2001).

Ante este panorama, la mejor alternativa es el uso de agentes biológicos que contribuyan a la resolución de estos incidentes de manera natural en lugar de emplear agentes químicos y físicos que si bien podrían mitigar este tipo de contaminaciones podrían también convertirse en nuevos factores contaminantes debido a su efecto residual alterando los ciclos naturales y simultáneamente incrementando la problemática ambiental.

La biorremediación es la forma más adecuada de tratar la contaminación por hidrocarburos, pues permite eliminar contaminantes presentes en suelos y acuíferos de una manera eficaz, segura y económica, además es la única herramienta en la que se emplean procesos naturales en los cuales los propios microorganismos del suelo transforman o degradan compuestos orgánicos en compuestos químicos más sencillos, logrando incluso una degradación completa hasta dióxido de carbono (CO₂), agua (H₂O) y fuentes de alimento para sustentar su crecimiento y reproducción, es decir, la biodegradación ocurre naturalmente (Torres; Zuluaga, 2009).

Es conocido que los microorganismos silvestres tienen la capacidad de adaptarse y eventualmente degradar cualquier compuesto orgánico natural sin asistencia del hombre, sin embargo esta adaptación requiere la presencia de condiciones ambientales apropiadas tales como pH, temperatura, el aceptor final de electrones (que en procesos aeróbicos es el oxígeno), concentraciones de contaminantes no tóxicas para los microorganismos y adecuadas condiciones de humedad y conductividad del medio, entre las más importantes. La ausencia de alguna o varias de las anteriores condiciones puede limitar parcial o totalmente la actividad biológica y es cuando la mano del hombre juega un papel importante en la optimización del proceso, ya sea mejorando estas condiciones para aumentar la población de microorganismos (bioaumentación) y/o manipulando genéticamente los microorganismos (Torres; Zuluaga, 2009).

La Región Caribe Colombiana hace parte de la red de oleoductos del país con puntos de yacimientos y transporte de petróleo y sus derivados, razón por la cual los eventos de contaminación por hidrocarburos son muy probables. La biorremediación aplicada en esta región sería más óptima y eficaz si se emplean cepas autóctonas, adaptadas a los factores ambientales propios de esta zona costera, por lo tanto este estudio pretende conocer cuáles son las cepas bacterianas nativas del pozo petrolero del corregimiento de San Sebastián, Loricá, y evaluar la eficiencia de su capacidad hidrocarburofítica.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar cepas bacterianas nativas con capacidad hidrocarburofítica del pozo petrolero de San Sebastián, Lórica, departamento de Córdoba.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Aislar cepas bacterianas hidrocarburofíticas nativas del pozo petrolero de San Sebastián, Lórica, departamento de Córdoba.
2. Identificar las cepas aisladas del pozo petrolero.
3. Evaluar la capacidad hidrocarburofítica de las cepas bacterianas aisladas
4. Comparar la distribución de los microorganismos aislados en las diferentes zonas del pozo petrolero.

MARCO REFERENCIAL

1. PETRÓLEO

El petróleo es el producto de la degradación anaeróbica de materia orgánica durante largos períodos de tiempo. Bajo condiciones de alta presión y temperatura, este producto se convierte en gas natural, crudo y derivados del petróleo.

Al igual que el carbón, el petróleo es un producto de origen fósil, formado por una mezcla compleja de hidrocarburos. Es de consistencia muy viscosa, más ligero que el agua (densidad alrededor de 0,8 a 0,95 kg/dm³), de color negro o pardo muy oscuro y olor penetrante.

Su formación es debida a la acumulación de detritos de organismos vivos, animales y vegetales, que vivían en mares, lagunas, etc., y fueron cubiertos por sedimentos, produciendo una degradación que en principio fue por bacterias anaerobias y luego aerobias. La distribución territorial del petróleo es muy irregular, aunque la mayoría de las reservas, del orden del 60%, se encuentran en Oriente Medio. Otras zonas donde se encuentran grandes reservas son:

EE.UU. con un 10%, la antigua URSS con un 9%, en Nigeria, Libia y Argelia con un 8% y en algunos países del Caribe con el 6%.

La localización de los yacimientos de petróleo (prospección) entraña grandes dificultades que requieren fuertes inversiones económicas y, alto conocimiento de técnicas específicas, lo que hace que su explotación esté casi siempre en manos de los países desarrollados.

El crudo de petróleo se caracteriza por ser una matriz contaminante que contiene una elevada diversidad de compuestos, por lo que es un sustrato ideal para evaluar el potencial catabólico de cepas o consorcios microbianos de interés en biorremediación (Torres; Zuluaga, 2009).

1.2 COMPOSICIÓN DEL CRUDO DEL PETRÓLEO

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener un sin número de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Rosini, 1960). Los hidrocarburos constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales (Casellas *et al.*, 1995).

Los hidrocarburos del petróleo pueden dividirse en cuatro categorías de compuestos:

- Los saturados: los alcanos como el hexano, el octano, el decano, el hexadecano, los isoalcanos y los cicloalcanos como el ciclohexano.
- Los aromáticos: benceno, tolueno, xileno y naftaleno agrupados también bajo la apelación BTEX y los poliaromáticos o PAHs (Rittman, 1994).
- Las resinas: sólidos polares amorfos disueltos que contienen nitrógeno, azufre y oxígeno.

- Los asfaltenos: grandes moléculas polares coloidales sin disolver que son más resistentes a la biodegradación (Balba; Al-Awadhi; Al-Daher, 1998).

1.3 EL PETRÓLEO EN COLOMBIA

Los primeros registros históricos de la existencia de petróleo en Colombia se remontan a la conquista española, cuando las tropas de Gonzalo Jiménez de Quesada llegaron por el río Magdalena a La Tora, un caserío de los yariguíes situado en lo que hoy es Barrancabermeja.

En los alrededores encontraron lugares donde manaba un líquido negro y aceitoso que los yariguíes utilizaban como reconfortante corporal, entre otros usos. Los españoles lo usaron a su vez para impermeabilizar las embarcaciones. Siglos después ese aceite vendría a ser la base de lo que hoy es la industria colombiana del petróleo.

Desde los albores del siglo XX, cuando se inició la explotación del petróleo en Colombia, la política que ha regido a esta industria ha tenido diversos y profundos cambios por parte de los distintos gobiernos, en sus esfuerzos por mantener una producción de petróleo que abastezca el consumo nacional y de paso exporte los excedentes para generar recursos adicionales a la nación.

En la búsqueda y extracción de hidrocarburos Colombia ha pasado de un sistema de concesión a un contrato de asociación. Hoy, cien años después de los primeros hallazgos comerciales de crudo, cuenta con un modelo de contrato de exploración y producción muy competitivo internacionalmente. Así mismo, la administración de esos recursos no renovables pasó de una empresa industrial y comercial del Estado (la Empresa Colombiana de

Petróleos, Ecopetrol), que durante 52 años se encargó de gestionar el mapa de tierras y las reservas de hidrocarburos en el país, a la Agencia Nacional de Hidrocarburos (ANH), unidad especial del Ministerio de Minas y Energía (ECOPETROL S.A, 2009).

1.3.1 REFINACIÓN

Colombia tiene una capacidad de refinación promedio de 315 mil barriles por día. En las dos principales refinerías del país (Barrancabermeja y Cartagena) se procesan los crudos y se obtienen los combustibles con los cuales se atiende la mayoría de la demanda nacional. También se atiende cerca del 75% de la demanda de productos petroquímicos e industriales con producción del Complejo Industrial de Barrancabermeja. Actualmente, tanto el Complejo como la Refinería de Cartagena son objeto de programas de optimización para incrementar su capacidad y mejorar la calidad de los combustibles para que éstos se ajusten a las nuevas exigencias ambientales (ECOPETROL S.A, 2009).

1.3.2 Transporte

Actualmente se cuenta para el transporte de hidrocarburos con una red de tubería de 4.184 km de oleoductos para transporte de petróleo y 3.952 km de poliductos para transporte de productos refinados (Figura 1). El total de estaciones de bombeo y terminales es de 67, distribuidas en 37 para oleoductos y 30 para poliductos. Para atender las exportaciones o importaciones de petróleo y refinados se tienen tres puertos de embarque por el mar Caribe, que son Coveñas, Cartagena y Pozos Colorados (Santa Marta), y dos puertos por el Océano Pacífico en Tumaco y Buenaventura (ECOPETROL S.A, 2009).

Los oleoductos más importantes son:

1.3.2.1 Oleoducto Caño Limón – Coveñas. Tiene 770 kilómetros de longitud y a través de él se transportan los crudos producidos en el campo Caño Limón.

1.3.2.2 Oleoducto de Alto Magdalena. Transporta los crudos que se obtienen en el Valle Superior del Magdalena.

1.3.2.3 Oleoducto Central de los Llanos.

1.3.2.4 Oleoducto Central S.A. (Ocensa). Con 790 kilómetros de longitud, transporta fundamentalmente los crudos del piedemonte llanero (Cusiana – Cupiagua) hasta el terminal marítimo de Coveñas.

1.3.2.5 Oleoducto de Colombia. Tiene 481 kilómetros y conecta la estación de Vasconia con el puerto de Coveñas.



Figura 1. Infraestructura petrolera de Colombia – Oleoductos (*Fuente:* ECOPETROL S.A, 2009)

2. LA CONTAMINACIÓN CON HIDROCARBUROS

El petróleo y sus derivados constituyen una importante fuente de contaminación. Se estima que de 0,08 % a 0,46 % (más de tres millones de toneladas) de la producción total del petróleo termina formando parte, bajo diversas formas, de la contaminación ambiental (Jacobucci *et al.*, 2000). Una de las formas de controlar los derrames de petróleo es utilizando la biorremediación. Al respecto, la USEPA (United States Environment Protection Agency) indica que un 30 % de esta contaminación en los Estados Unidos se combate por biorremediación (Olson *et al.*, 1999).

La contaminación del suelo con hidrocarburos impide la utilización de este para actividades como la agricultura y la urbanización y adicionalmente pone en riesgo las napas freáticas que en algunos países constituyen la fuente principal de agua potable. He aquí la importancia primordial de remediar estos suelos (Hanson *et al.*, 1997).

Las huellas más evidentes en los lugares donde se ha dado extracción de petróleo, frecuentemente han sido ocasionadas por accidentes en tanques de almacenamiento o en oleoductos. Sin embargo los accidentes que son los acontecimientos más notorios no son las únicas fuentes de contaminación o degradación del medio, ni siquiera las más importantes.

Todas las actividades que están envueltas en la exploración y explotación del petróleo provocan impactos potencialmente negativos sobre el medio ambiente y sobre las personas que lo usan o que están en contacto con él. Gran parte de los ecosistemas afectados por la exploración y explotación de hidrocarburos cuentan con formas de vida muy diversas y complejas. A pesar de este hecho, la expansión petrolera muy a menudo se enfoca en dichos ecosistemas.

El impacto ambiental de los derrames de crudo en Colombia ha dejado miles de hectáreas afectadas, sin dejar a un lado los kilómetros de ríos y quebradas. Estos daños a las fuentes hídricas, suelos, aire, fauna y vegetación, causados por actos terroristas a la infraestructura petrolera o como resultado de la actividad de la extracción del petróleo, son prácticamente irremediables, ya que los procesos de descontaminación no alcanzan a cubrir todas las áreas afectadas y se realizan mucho tiempo después de que el crudo ha penetrado al ecosistema.

En la región Caribe existen problemas locales debido a derrames crónicos en los puertos, las refinerías de petróleo, terminales petroleros, por los buques de cabotaje o accidentes de buques de tráfico internacional (Marín *et al.*, 2004). Las zonas costeras más afectadas son Santa Marta, Barranquilla, Cartagena, Golfo de Morrosquillo y Golfo de Urabá.

Evaluaciones sobre la contaminación de hidrocarburos derivados del petróleo muestran que los contenidos de Hidrocarburos Disueltos y Dispersos (HDD) han alcanzado valores de 33µg/L (Marín *et al.*, 2004), concentración que supera el valor límite de 10 µg/L establecido por la UNESCO para aguas marinas y costeras no contaminadas (INVEMAR, 2001).

2.1 EVENTOS CONTAMINANTES DURANTE LA EXPLOTACION PETROLERA

2.1.2 Detonación con cargas de dinamita. La operación sísmica consiste en la medición de las ondas de resonancia que produce la detonación de cargas de dinamita. Esto significa que la zona explorada queda completamente llena de agujeros dinamitados. Al encontrarse el lugar donde probablemente se

puede dar la explotación del mineral, se procede a abrir los pozos exploratorios.

2.1.3 Utilización de lodos químicos. Durante la fase de exploración son utilizados lodos químicos, los cuales son altamente contaminantes, para la mayor penetración en el terreno de los taladros que deben ser enfriados constantemente con agua. También se construyen piscinas para depositar las aguas acidas y los lodos contaminados que salen junto con el petróleo.

Esta fase altera el equilibrio natural, ya que requiere de grandes cantidades de agua del lugar y aumenta los niveles de contaminación. También en las perforaciones se producen lodos con metales pesados y tóxicos como cadmio, cobre, arsénico, mercurio y plomo.

2.1.4 La fase de extracción. Comienza cuando alguno de los pozos exploratorios toca un yacimiento. En tierra o en mar las operaciones a realizarse en esta etapa alteran el ambiente natural y lo contaminan. Esta etapa presente riesgos adicionales de accidentes, relacionados con gases tóxicos, aguas acidas y los depósitos de crudo.

Dentro de las etapas de exploración y explotación también se da una compactación de los suelos por la maquinaria pesada donde por la pérdida de vegetación, se produce una erosión y contaminación de los suelos de la zona. Los microorganismos del suelo son alterados por la contaminación con hidrocarburos, desapareciendo o disminuyendo las especies menos resistentes sin dejar atrás las altas tasas de mutaciones. Las alteraciones al suelo producen cambios en el pH de este y del agua, que pueden causar un deterioro crónico de los ecosistemas. Por lo tanto un manejo inadecuado de dicha fuente energética puede causar problemas de gran envergadura socio-ambiental.

2.1.5 El transporte. El transporte del crudo es una de las etapas más riesgosas y costosas en términos de destrucción ambiental. Desde que se transporta el crudo masivamente, son millones de barriles que se han derramado en zonas selváticas, ríos, lagos y mares. Las consecuencias de tales derrames continúan afectando estos ecosistemas muchos años después (Torres; Zuluaga, 2009).

2.2 CAUSAS DE DERRAMES POR LA ACTIVIDAD PETROLERA

Los derrames de petróleo representan un riesgo inherente a la actividad petrolera aunque ésta se encuentre regulada bajo normas legales internacionales. Estos eventos contaminantes tienen un impacto global afectando aspectos ecológicos, económicos, sociales y políticos de los territorios en los cuales suceden.

En Colombia se ha vivido con frecuencia este tipo de situaciones, debido por lo general, a actos violentos a los que se encuentran sometidos tanto la industria petrolera como la población cercana a la infraestructura dedicada a esta actividad.

Dentro de las disciplinas que tratan este tema se define vertimiento al derrame accidental, es decir, no provocado, no deseado, súbito, imprevisible e irresistible, no contable que afecta un recurso natural no renovable. En estos eventos la contaminación puede tener una fuente o varias causas que participan de una forma determinante en el desastre contaminador o complican el problema por los elementos o desechos que de forma independiente no tienen carácter contaminador, pero que por combinación o

adición con las fuentes procedentes de la misma u otras, llegan a contaminar. Las causas más frecuentes de contaminación en la industria petrolera por transporte por medio de tubería u oleoducto, son:

2.2.1 Falla operacional. Se da por un desajuste o asincronismo en la actividad normal de la operación de un oleoducto, un poliducto o estación, ya sea en la manipulación de los instrumentos o en la parte operativa por parte de los operadores, que ocasiona una sobrepresión de la línea de transporte.

2.2.2 Fatiga de Materiales. Ocasionado por el inadecuado mantenimiento de las instalaciones, llámese tubo, pozo o múltiple abastecimiento, provocando un pittinges, un agujero por el cual se genera una fuga del líquido.

Cuando un derrame es provocado por la acción dolosa de un tercero, en dicho caso es habitual que el origen del mismo se pueda dar por:

2.2.2.1 Hurto. Cuando los terceros que acometen el hecho punible no tienen por motivo nada distinto que obtener un lucro con el crudo que extraen de la tubería.

2.2.2.2 Acto terrorista. Es aquel que se atribuye por lo general a grupos u organizaciones armadas que enarbolando un carácter político cometen el atentado con el interés de desestabilizar de alguna manera el orden público del país.

Según la Compañía Colombiana de Petróleos, ECOPETROL, durante los últimos quince años el oleoducto Caño Limón- Coveñas ha sufrido más de novecientos atentados terroristas, hechos que han conducido al derramamiento de más de 450 millones de litros de petróleo en el medio ambiente (ECOPETROL S.A, 2009).

3.BIORREMEDIACIÓN

3.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE LA BIORREMEDIACIÓN

A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes (Zobell, 1946; Davis, 1956). Este "uso" intencionado recibió entonces el nombre de biorremediación ("bioremediation").

Las primeras técnicas que se aplicaron fueron similares al "landfarming" ("labranza") actual y sus actores, lógicamente, compañías petrolíferas. Las primeras patentes, fundamentalmente para remediación de vertidos de gasolina, aparecen en los años 70.

En los años 80 se generalizó el uso del aire y peróxidos para suministrar oxígeno a las zonas contaminadas mejorando la eficiencia de los procesos degradativos. Durante los años 90 el desarrollo de las técnicas de "air sparging" (burbujeo de oxígeno) hizo posible la biorremediación en zonas por debajo del nivel freático.

Al mismo tiempo, la implementación en la práctica de aproximaciones experimentales en el laboratorio permitió el tratamiento de hidrocarburos clorados, los primeros intentos con metales pesados, el trabajo en ambientes anaerobios, etc. Paralelamente, se desarrollaron métodos de ingeniería que mejoraron los rendimientos de las técnicas más populares para suelos contaminados (Riser-Roberts, 1998).

En la actualidad, la biorremediación enfrenta un nuevo reto: el de convencer a las compañías y a los organismos oficiales de su alto potencial. En algunos países, la biorremediación fue una técnica poco reconocida y marginada, hoy en día se ha convertido en una verdadera industria. Esta “industria” busca seguir mejorando en sus líneas interdisciplinarias, lo que se pueden resumir en los siguientes puntos:

3.1.1 Integración en el proceso de técnicas innovadoras que ayuden a comprender y controlar los fenómenos de transporte de nutrientes y otros posibles aditivos.

3.1.2 Desarrollo de técnicas rápidas de biología molecular que permitan caracterizar las poblaciones indígenas de los emplazamientos contaminados así como su potencial enzimático (Theron y Cloete, 2000; Watanabe, 2001).

3.1.3 Exploración de las implicaciones del concepto de biodisponibilidad definido por las propiedades físico-químicas de los contaminantes. Se trata de un factor que en muchos casos está limitando la biodegradación y en otros reduciendo la toxicidad de los contaminantes.

3.1.4 Desarrollo definitivo de técnicas de bioaumentación realmente útiles (Major et al., 2002).

3.2 FUNDAMENTACIÓN BIOQUÍMICA DE LA BIODEGRADACIÓN

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa, principalmente, en la serie de reacciones de óxido-reducción (cuyo fin es la obtención de energía) que se producen en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células. La cadena la inicia un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como

dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia (Maroto Arroyo, artículo internet).

Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Figura 2).

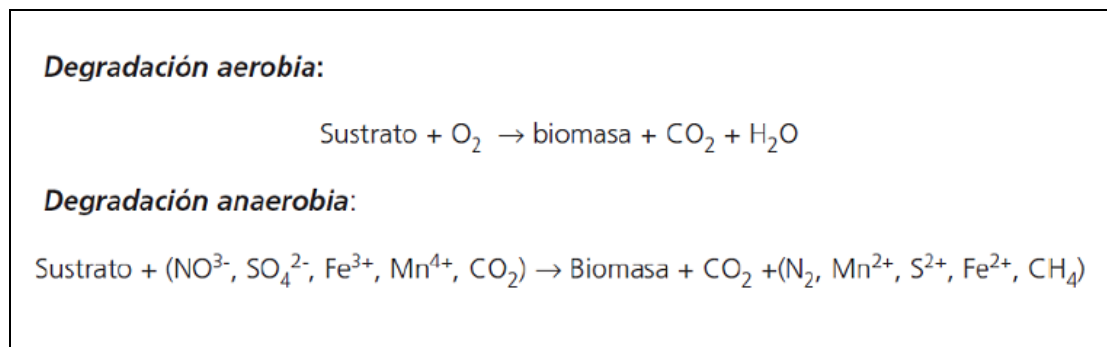


Figura 2. Reacciones de las degradaciones aerobia y anaerobia. Fuente: MAROTO,M; ROGEL , J;2006.

Los hidrocarburos presentan la particularidad de adsorberse rápida y fuertemente a las partículas del suelo. Esta peculiaridad junto con la gran variedad de hidrocarburos hace necesario concebir consorcios bacterianos que logran trabajar juntos para la descomposición natural de los contaminantes. (Rahman *et al.*, 2001) mostraron que la degradación de la gasolina alcanza un nivel óptimo al combinar apropiadamente los microorganismos, nutrientes inorgánicos y orgánicos y surfactantes, el todo asociado con buenas condiciones de oxigenación.

Hace diez años, el tolueno y otros compuestos volátiles se consideraban como muy poco tolerados por las cepas de *Pseudomonas*, *Achromobacter* y *Nocardia* disponibles en ese momento ; para el benceno, ninguna cepa tolerante se conocía aún (Moriya ; Horikoshi, 1993). Desde entonces, muchos estudios han demostrado que los compuestos volátiles son metabolizados por algunas cepas en medio anaerobio, relacionado con las reducciones de nitratos, sulfatos, hierro, óxido de manganeso y con la producción de metano. Diferentes alternativas de aceptores de electrones como el fumarato, el humus y las quinonas han sido igualmente propuestas (Burland ; Edwards, 1998 ; Cervantes *et al.*, 2001 ; Franzmann *et al.*, 2002).

En medio aerobio, métodos paralelos como la condensación, la absorción sobre carbono activado y la oxidación térmica se aplican para captar y degradar los hidrocarburos volátiles (Li *et al.*, 2001). Estos métodos aprovechan que los microorganismos que se encuentran inmovilizados sobre algunas superficies ideales bajo forma de *biofilms*, se encuentran menos expuestos a la toxicidad de los compuestos volátiles y soportan concentraciones mayores del agente contaminante (Franzmann *et al.*, 2002).

Existe una diferencia entre las tasas de degradación de los contaminantes en estado puro y aquellos que forman parte de una mezcla de hidrocarburos, como en el caso del diesel y la gasolina (Greene *et al.*, 2000). Algunas pruebas han permitido verificar que mezclados, el tolueno es degradado antes que el benceno (Franzmann *et al.*, 2002).

Para una degradación más rápida y completa es preferible degradarlos a partir de su forma pura antes que en presencia de otros hidrocarburos (Greene *et al.*, 2000). La baja solubilidad de los hidrocarburos en medio acuoso necesita la acción de surfactantes para incrementar su biodisponibilidad y su metabolización por los microorganismos (Harris, 1997).

Debe también considerarse el problema de la concentración residual de los contaminantes después de su degradación. Este residuo permanece sin importar el tratamiento aplicado pero debe ser minimizado. Por esto se recomiendan los consorcios bacterianos en vez de los cultivos puros. Juntas, varias bacterias pueden degradar varios hidrocarburos del diesel o del petróleo hasta obtener un residuo mínimo (Nocentini; Pinelli; Fava, 2000).

3.3 MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN LOS HIDROCARBUROS

Existen varias clases de microorganismos: mohos, levaduras, bacterias, actinomicetos, protozoos, algas, virus.

Los microorganismos se adaptan o desarrollan su metabolismo en función de los parámetros físico-químicos (pH, temperatura, humedad) así como de los compuestos químicos que se encuentran en su ambiente inmediato. El petróleo y los hidrocarburos se encuentran naturalmente presentes en el suelo, lo que ha permitido a muchos microorganismos acostumbrarse a su presencia y utilizarlos para sobrevivir.

En el caso de los hidrocarburos, las bacterias Gram negativas parecen encontrarse más adaptadas a estas fuentes de carbono (Venosa *et al.*, 1999). Diversos estudios permiten hoy en día establecer una lista de 160 géneros de microorganismos que degradan los hidrocarburos (Prince *et al.*, 1999), los consorcios más empleados contienen las especies *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter* y en menos ocasiones *Mycobacterium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Candida*. Las bacterias son más empleadas que los hongos y las levaduras

(Balba ; Al-Adawadhi ; Al-Daher, 1998 ; Vasudevan ; Rajaram, 2001 ; Rahman *et al.*, 2001).

Es importante estudiar qué poblaciones existen en el suelo contaminado ya que estas probablemente ya se habrán adaptado a este ambiente (Hanson *et al.*, 1997). Las poblaciones nativas pueden ser sensibles a la presencia y la actividad de poblaciones extranjeras especializadas. Estas poblaciones, visto las diferencias metabólicas, producen en algunos casos metabolitos e intermediarios tóxicos para la microflora nativa. Muchas veces también, estas poblaciones agregadas no se adaptan a las condiciones del sitio contaminado y debido a ello, no realizan la descontaminación con la misma eficiencia con la que lo hacen las poblaciones nativas (Thomassin-Lacroix *et al.*, 2002).

El suelo es un medio complejo orgánico y/o mineral en el que muchas condiciones determinan la variabilidad de la microflora (Madigan; Martinko; Parker, 1998). La biodegradación de los hidrocarburos se realiza de preferencia a una temperatura entre 15 y 30°C. Visto la complejidad del suelo, deben controlarse también el pH, los nutrientes, la disponibilidad de oxígeno y del contaminante (Thomassin-Lacroix *et al.*, 2002).

La biodisponibilidad de los hidrocarburos es esencial para su descomposición. La adición de agentes de superficie (surfactantes o emulsificantes) permite mejorar esta disponibilidad (Harris, 1997).

3.4 PARÁMETROS INDICADORES DE LA METABOLIZACIÓN DE LOS HIDROCARBUROS

La oxidación de los hidrocarburos produce ácidos grasos que son utilizados por las bacterias o liberadas en el medio. Si este es el caso, el pH del medio disminuye. Esta acidificación se emplea como parámetro para evaluar la degradación, junto con:

- El incremento de la población microbiana a lo largo del tiempo es el resultado del consumo de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. Este aumento de población puede visualizarse al medir la turbidez del medio (la densidad óptica), la evolución de la materia seca y la viabilidad (UFC/ml) en el tiempo.
- La disminución de la concentración de hidrocarburo en el medio puede ser un segundo indicador de la degradación. Si la población logra utilizar el contaminante como fuente de carbono, la concentración del mismo debe disminuir con el tiempo y ser reemplazado en el medio por nuevos metabolitos. La determinación de la concentración puede hacerse por métodos analíticos (cromatografía, absorción IR) o de Immunoassay (kit enzimáticos).
- La evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno puede también constituir un indicador de la actividad de degradación que realizan los microorganismos sobre las fuentes de carbono empleando al oxígeno como aceptor de electrones. Una prueba respirométrica puede llevarse a cabo sobre un suelo contaminado en presencia de microorganismos (Balba *et al.*, 1998).

4. NORMATIVIDAD

La legislación sobre contaminación del suelo no se encuentra de forma específica en una Ley o Decreto de orden nacional, se tienen normas de ámbito regional o local (Resoluciones por parte de las Corporaciones Autónomas Regionales), esto se debe principalmente a que el recurso del suelo necesariamente hace parte fundamental de los ecosistema terrestres, por lo tanto no se hace referencia exclusiva a la contaminación del suelo como tal, sino que generaliza a la protección de los recursos naturales.

En la Constitución Nacional de 1991 se presentan 17 artículos relacionados con la protección, conservación, control y mejoramiento de los recursos naturales. De forma específica sobre el suelo se menciona en los artículos 360, 361 y 366, a los cuales se refiere la corte constitucional.

El código penal sanciona los delitos en contra de los recursos naturales en los artículos 242 al 247. Específicamente el artículo 247 se refiere a la sanción que se aplica a quien por contaminación ambiental ilícitamente, incurrirá, sin perjuicio de las sanciones administrativas a que hubiere lugar y siempre que el hecho no constituya otro delito, en prisión de uno a seis años y multa de cincuenta mil a dos millones de pesos.

En la ley 23 de 1997 se relacionan aspectos como la prevención y control de la contaminación del medio ambiente, mejoramiento, conservación y restauración de los recursos naturales renovables, determinando como bienes contaminables el aire, el agua y el suelo. Esta ley define como contaminación a “la alteración del medio ambiente por sustancias o formas de energía puestas allí por la actividad humana o de la naturaleza, en cantidades, concentraciones o niveles capaces de interferir con el bienestar y la salud de las personas, atentar contra la flora y la fauna, degradar la

calidad del medio ambiente o afectar los recursos de la nación o de particulares”.

También define Contaminante como todo elemento, combinación de elementos o forma de energía que actual o potencialmente pueda producir alguna o algunas de las alteraciones ambientales descritas en la definición de contaminación.

En el Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente (Decreto 2811 de 1974), en sus artículos relacionados con el medio ambiente, específicamente con el recurso suelo, se tienen los siguientes artículos: Artículo 8º. Se consideran factores que deterioran el ambiente, entre otros: La degradación, la erosión, el revenimiento de suelos y Las alteraciones nocivas de la topografía Artículos 182º al 186º. Relacionado con el uso y conservación de los suelos Artículos 324º al 326º Relacionados con los distritos de conservación de suelos.

5. MATERIALES Y METODO

Se realizó un estudio analítico comparativo de corte transversal. La población y muestra de estudio se obtuvo por muestras de petróleo y suelo del pozo petrolero del corregimiento de San Sebastián, municipio de Lorica, departamento de Córdoba. Este es un yacimiento inexplorado que afecta una superficie visible de 6 m de diámetro, se encuentra a 200 m de la comunidad y a 40 m de un lago que abastece la actividad agrícola y ganadera del corregimiento.

5.1 AISLAMIENTO, IDENTIFICACION Y MANTENIMIENTO DE MICROORGANISMOS.

El pozo fue dividido en cuatro zonas dependiendo el grado de derrame del crudo en la periferia. La zona pozo petrolero (PP) que constituye un orificio de aireación de 20 cm de diámetro de donde fluye el petróleo crudo en su mejor concentración; la zona de derrame (ZD) que comprende 1,5 m partiendo de la zona PP hacia el borde del círculo y que contiene suelo de consistencia pastosa y color oscuro por el material que se derrama desde el interior del pozo; la zona de transición (ZT) son los 1,5 m desde ZD hacia el exterior y se constituye de suelo afectado en menor proporción por el derrame con un color menos oscuro que en ZD y una cuarta zona no contaminada (ZNC) formada por suelo sin contaminación visible del crudo, con aspecto y consistencia natural e incluso forestado con la vegetación nativa del lugar (Anexo 1).

De cada zona se tomaron muestras pareadas con espátulas metálicas en frascos de vidrio estériles y se transportaron inmediatamente al laboratorio del Grupo de Investigación de los departamentos de Química y Biología de la

Universidad de Córdoba (GRUBIODEQ) donde se llevó a cabo todo el procesamiento de las muestras recolectadas.

En cada una de las muestras recolectadas se realizó un proceso de bioestimulación durante 120 horas suministrando oxígeno y elementos esenciales. Para ello se diluyeron 10 g de cada muestra en frascos de vidrio herméticamente sellados con tapas plásticas con 90 ml de fosfato de amonio (NH_4PO_4) al 2%, obteniéndose una dilución 10^{-1} , a los cuales se les adicionó 60 μL de Tween80 con el fin de emulsificar las grasas presentes en la muestra (Harris, 1997). Cada recipiente tenía dos orificios, de entrada y salida para la inyección del oxígeno y la recirculación de gases de desecho.

Cada muestra fue diluida hasta 10^{-5} a partir de la dilución realizada en el proceso de bioestimulación y sembrada por agotamiento en Agar Bushnell Haas adicionando 50 μL de Kerosene, esterilizado en UV por 5 horas, en los lugares libre de siembra de las placas. Se incubaron a temperatura ambiente durante 120 horas. El Agar Bushnell Haas se preparó según la fórmula de Bushnell y Haas y es recomendado por el Comité SIM para el estudio de la degradación microbiológica de hidrocarburos (Bushnell; Haas, 1941; Allred *et al.*, 1963). Este medio contiene todos los nutrientes excepto una fuente de carbono para el crecimiento de la bacteria la cual será adicionada por el investigador. Solo aquellos microorganismos capaces de descomponer hidrocarburos crecerán en este medio; el sulfato de magnesio (MgSO_4), el cloruro cálcico (CaCl_2) y el cloruro férrico (FeCl_3) proveen oligoelementos; el fosfato diamonio ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) es la fuente de nitrógeno mientras que el fosfato monopotásico (KH_2PO_4) es el tampón o *buffer* del medio.

Al cabo de las 120 horas se observó el crecimiento y se discriminó por la morfología de las colonias, cada una de las cuales fue sembrada nuevamente en Agar Bushnell Haas hasta que el agotamiento obtenido

tuviera características homogéneas en sus colonias. Se necesitaron cinco pasajes a Bushnell Haas en promedio para obtener cultivos puros.

Al obtener cultivos aparentemente puros se realizó coloración de Gram para conocer las características tintoriales y morfologías microscópicas de los microorganismos y confirmar la pureza del crecimiento.

Posteriormente se sembraron en medio Agar Nutritivo e incubados a temperatura ambiente durante 24 horas.

Se realizó coloración de Gram al crecimiento en Agar Nutritivo para confirmar la preservación de las colonias de origen y descartar cualquier tipo de contaminación. Los cultivos que registraron contaminación y cuyas cepas de interés no pudieron ser recuperadas fueron descartados inmediatamente para asegurar el éxito del resto de la investigación.

Una vez confirmada la pureza de las cepas en Agar Nutritivo se almacenaron por duplicado en viales de vidrio con 3 ml de Caldo Nutritivo en refrigeración y simultáneamente se realizó inoculación en Agar McConkey y en la serie bioquímica: TSI, SIM, Citrato, Urea, LIA, incubados a temperatura ambiente durante 24 horas. Adicionalmente se realizaron pruebas de Catalasa y Oxidasa.

5.2 PRUEBA DE RESISTENCIA A PETROLEO CRUDO

Con las cepas puras almacenadas se constituyeron los consorcios para la Prueba de resistencia a petróleo crudo, conservando la distribución en las cuatro zonas establecidas inicialmente.

Se inocularon 100 μ L de caldo de cada cepa almacenada en 50 ml de caldo Bushnell Haas suplementado con 1 ml de Kerosene estéril. Las cepas pertenecientes a una misma zona fueron inoculadas en el mismo caldo para obtener un total de cuatro consorcios hidrocarburofílicas. Los caldos fueron incubados a temperatura ambiente por 7 días en agitación.

De cada consorcio se realizaron diluciones hasta 10^{-6} y se sembraron masivamente las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} en placas de Agar Bushnell Haas adicionando 50 μ L de Kerosene en los lugares libre de siembra de las placas. Estas se incubaron a temperatura ambiente por 6 días durante los cuales se realizaron recuentos de las colonias a las 48, 72, 96, 120 y 144 horas desde la inoculación.

Simultáneamente se prepararon series de caldos Bushnell Haas suplementado con petróleo estéril concentraciones al 1%, 4%, 8% y 12%, una serie para cada zona. El petróleo empleado para estas concentraciones se diluyó al 75% en Kerosene para facilitar su manipulación y se esterilizó a 15 libras de presión durante 10 minutos.

Estas series de concentraciones fueron inoculadas con 100 μ L de los cuatro consorcios e incubadas a temperatura ambiente en agitación durante 5 días, después de los cuales se realizaron diluciones de cada zona y concentración hasta 10^{-6} , se sembraron de forma masiva en placas de Agar Bushnell Haas las concentraciones 10^{-5} y 10^{-6} adicionando 50 μ L de Kerosene y se incubaron durante 5 días a temperatura ambiente. Después del periodo de incubación se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonia (UFC) de cada zona y concentración.

5.3 IDENTIFICACION DE CEPAS RESISTENTES

Las colonias de cada zona que crecieron a la mayor concentración de petróleo crudo (12%) fueron pasadas a placas de Agar Nutritivo e incubadas a temperatura ambiente durante 24 horas. Las cepas se almacenaron por duplicado en viales de vidrio con 3 ml de Caldo Nutritivo en refrigeración y realizó coloración de Gram, pruebas de Catalasa y Oxidasa, inoculación en Agar McConkey, Agar Cetrimide y en la serie bioquímica: TSI, SIM, Citrato, Urea, LIA, incubados a temperatura ambiente durante 24 horas. De las cepas que presentaron características idénticas en estas pruebas y que pertenecían a la misma zona se seleccionó solo una para someterla a la identificación final.

Las cepas que resultaron resistentes a la mayor concentración de petróleo crudo empleada fueron finalmente identificadas con galerías de identificación bioquímica Api20E® y Api20NE® y el software ApiWeb®.

Los datos fueron tabulados y analizados empleando como herramienta el software Microsoft Excel®.

6. ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

A partir de las muestras recolectadas en las cuatro zonas del pozo petrolero se aislaron 45 cepas capaces de tolerar hidrocarburos del petróleo. De 45 cepas aisladas se logró la recuperación viable de 40, de las cuales, 21 provenían de la zona PP, 13 de ZD, 3 de ZT y 3 de ZNC.

La identificación bioquímica determinó que estas 40 cepas correspondían a 6 géneros de bacilos Gram negativos: *Pseudomona*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, siendo las dos primeras las de mayor frecuencia (Tabla 1) y por ser indistinguibles con las pruebas realizadas se les asignó a las cepas ambas posibilidades de género. El género *Klebsiella* también presentó un número importante de aislamientos. Narvaez-Florez *et al* aislaron los mismos géneros sumados a tres géneros Gram positivos a partir de sedimentos de suelo del Caribe colombiano confirmando la capacidad hidrocarburofítica de los microorganismos aislados.

Zona	<i>Pseudomona/ Burkholderia</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Citrobacter</i>
PP	3	9	3	5	1
ZD	7	1	5	0	0
ZT	2	0	1	0	0
ZNC	1	1	0	1	0
Total	13	11	9	6	1
%	32.5	27.5	22.5	15	2.5

Tabla 1. Distribución de géneros por zonas de aislamiento. (Fuente: las autoras)

Al realizar el recuento del consorcio las zonas que presentaron crecimientos más exuberantes fueron PP y ZNC (Figura 4). En PP este tipo de crecimiento puede estar relacionado con la cantidad de cepas aisladas de esta zona que fueron la mayoría. ZNC presentó un número mucho menor de aislamientos que PP, sin embargo el crecimiento en ZNC fue homogéneo obteniéndose colonias numerosas de iguales características.

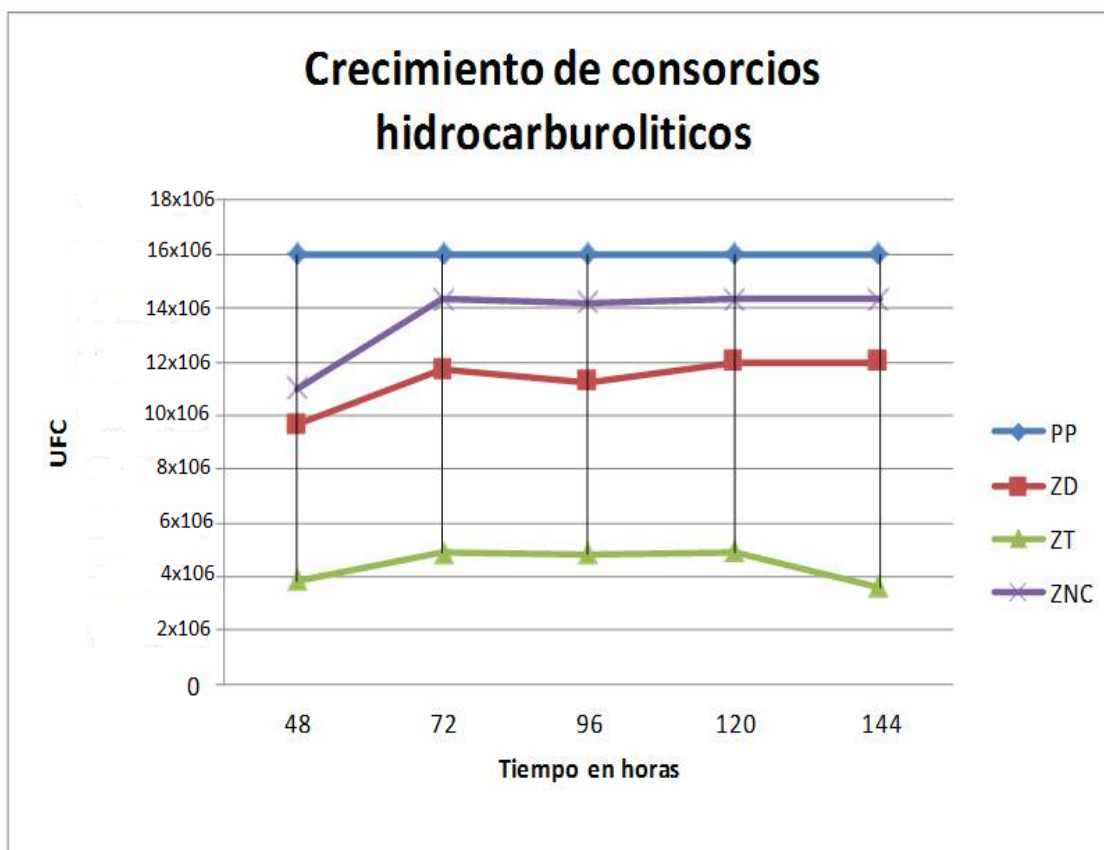


Figura 3. Crecimiento de consorcios hidrocarburolíticos (*Fuente:* las autoras).

La prueba de resistencia a petróleo crudo tuvo comportamientos similares en tres zonas. El crecimiento se mantuvo constante en ZD, ZT y ZNC con un conteo óptimo entre 30 y 300 UFC en las diluciones 10^{-5} de todas las concentraciones. Por su parte la zona PP presentó un gran crecimiento al 1%

de petróleo y conteos menores a 30 UFC en las siguientes cuatro concentraciones (Figura 4).

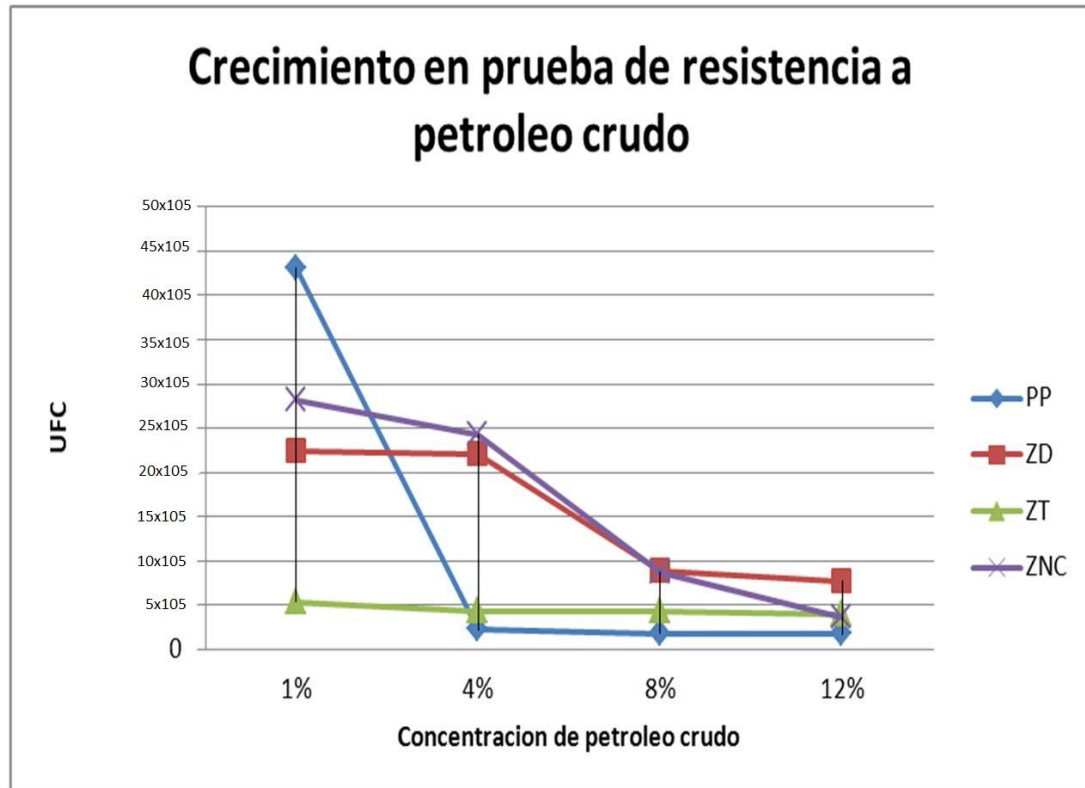


Figura 4. Curva de crecimientos en la prueba de resistencia a petróleo crudo.

De la prueba de resistencia se obtuvieron 9 cepas que registraron crecimiento al 12% de petróleo, distribuidas de la siguiente forma: 2 en PP, 2 en ZD, 2 en ZT y 3 correspondientes a ZNC. La identificación preliminar de estas las clasificó como pertenecientes a los géneros *Pseudomonas/Burkholderias*. Para la identificación confirmatoria con galerías de identificación bioquímica Api20E® y Api20NE® se seleccionaron 7 cepas descartando 2 de ZNC debido a que las características macroscópicas, microscópicas y bioquímicas eran idénticas a la seleccionada.

Luego de la inoculación e incubación de las galerías, los datos obtenidos se registraron en el software ApiWeb® confirmando la identificación bioquímica preliminar ya que se obtuvieron 5 cepas del genero *Pseudomonas* y 2 *Burkholderias* (Tabla 2).

Cepa	Galería	Perfil	%ID*	Taxón
PP-A	Api20E®	2200004	75,2	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
PP-B	Api20NE®	1047777	99,5	<i>Burkholderia cepacia</i>
ZD-A	Api20NE®	1155565	97,4	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
ZD-B	Api20E®	2217046	99,0	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
ZT-A	Api20NE®	1354777	99,8	<i>Pseudomona aeruginosa</i>
ZT-B	Api20E®	2201004	94,1	<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>
ZNC-A	Api20NE®	1144457	70,0	<i>Pseudomonas putida</i>

Tabla 2. Identificación por Api20E® y Api20NE® de las mejores cepas resistentes a petróleo. *Porcentaje de identificación (*Fuente: las autoras*).

Pseudomonas es el género que registró los mayores aislamientos en esta investigación. Este género es el que se aísla con mayor frecuencia de ambientes contaminados con hidrocarburos y de la cual mayor información ha sido registrada; se conoce su capacidad para crecer sobre una amplia variedad de hidrocarburos del petróleo como benceno, naftaleno, tolueno, gasolina, kerosene y diesel.

Esta alta frecuencia de aislamiento está relacionad a pricipalmentecon la produccion de biosurfactantes como los ramnolípidos involucrados en procesos de remoción de aceites y productos relacionados (Ron; Rosenberg, 2002); Bushnell y Hass fueron de los primeros en describir bacterias

productoras de biosurfactantes, principalmente *Pseudomonas*, lo que les confiere mayor capacidad de supervivencia en medios saturados de hidrocarburos.

En Long Beach (California), aplicaron la biorremediación in situ en suelos contaminado con aceite diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos complementada con la adición de nutrientes y oxígeno o proceso de bioestimulación, similar al realizado en el presente estudio. Esto permitió encontrar consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos identificados por secuenciación de genes 16S-RNA, demostrando la presencia, entre otras bacterias de *Pseudomonas sp.* (Cunningham C.; Philp J., 2000).

La *Pseudomonas aeruginosa*, es uno de los microorganismos más usado y estudiado en y presenta una serie de actividades naturales sobre xenobióticos.

La *Pseudomona putida* es un saprofito del suelo, oportunista, cosmopolita, metabólicamente versátil, por poseer una dioxigenasa inicial, una tolueno dioxigenasa, aunque no presenta la dioxigenasa específica para los PAHs por lo cual es una buena candidata para las aplicaciones biotecnológicas, tales como agricultura, biocatálisis, biorremediación, biocontrol en protección de las plantas y producción de bioplásticos. Braibant en 2004 obtuvo resultados eficientes al enfrentar cuatro cepas de *Pseudomona putida* a diferentes familias de hidrocarburos del petróleo, concordando con los resultados obtenidos en el presente estudio.

Rockne *et al* en 2000 comprobaron también la actividad hidrocarburofítica de la *Pseudomonas fluorescens*, afirmando además que esta es

degradadora de naftaleno y fenantreno, ventaja que tiene frente a las otras *Pseudomonas*, que solo metabolizan naftaleno y asfaltenos.

Tomasini y Moeller obtuvieron resultados efectivos de degradación en aguas residuales aromáticas empleando *Pseudomona fluorescens/putida* asociadas con *Aeromonas hydrophila*.

Burkholderia fue el segundo microorganismo resistente a la mayor concentración de petróleo crudo ensayada en este estudio, lo que concuerda con ensayos previos como los de Sudarat *et al* en el 2000. Debido a su genoma extremadamente flexible, *Burkholderia cepacia*, bacilo Gram negativo no fermentador, productora de pigmento amarillo tiene una gran capacidad mutagénica y adaptativa, a lo que se le atribuye su gran capacidad en la degradación de hidrocarburos (Svenja *et al*, 1999).

Las bacterias obtenidas en su totalidad presentaron coloraciones tintoriales de microorganismos Gram negativos lo que confirma las observaciones de Ruberto *et al*. Los lipopolisacáridos presentes en sus membranas ayudan a la formación y estabilización de emulsiones de hidrocarburos en sistemas acuosos y contribuyen al incremento en la superficie de ataque sobre el contaminante, para su posterior asimilación (Sikkema *et al.*, 1995).

Las cepas aisladas e identificadas poseen capacidades metabólicas para tolerar altas concentraciones de hidrocarburos, asimilar y degradar los mismos. Estas características son el punto de partida para la investigación del metabolismo y de las interacciones que se generan al interior de estos consorcios microbianos.

CONCLUSIONES

De la investigación realizada se puede concluir:

El pozo petrolero del corregimiento San Sebastián posee una flora bacteriana con capacidad hidrocarburofítica.

Dentro de esta población se encuentran los géneros: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*.

Las bacterias más comunes en esta población son las pertenecientes a los generos *Pseudomonas* y *Klebsiella*.

Las bacterias más resistentes a concentraciones de por lo menos 12% de petróleo crudo son las pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*.

la zona PP presentó el mayor número de cepas aisladas, confirmando la eficiente capacidad hidrocarburofítica de estas.

RECOMENDACIONES

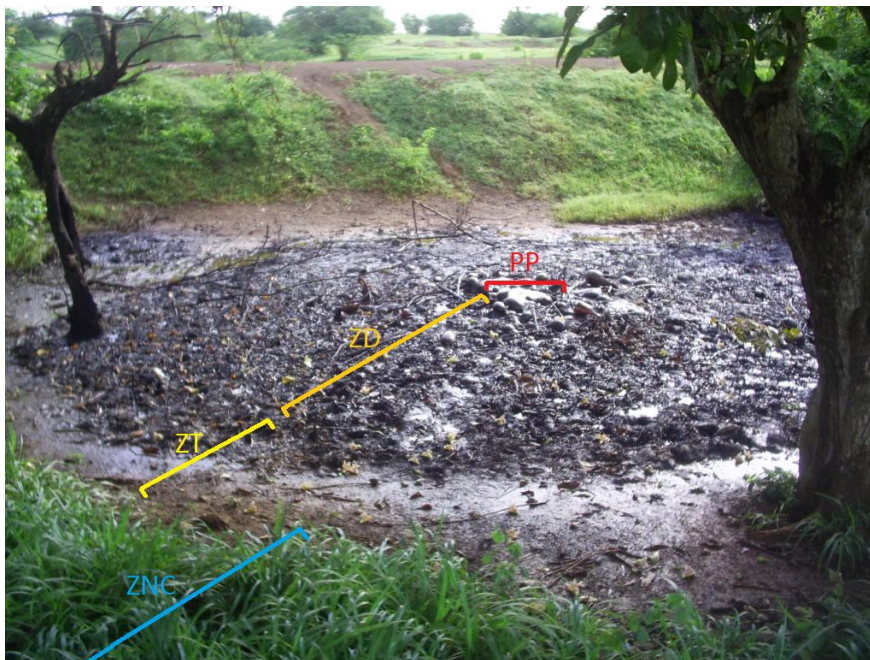
Se recomienda hallar la Concentración Mínima Inhibitoria de petróleo crudo para las cepas aisladas.

Estudiar las características del suelo del pozo a partir del cual se aislaron las cepas para conocer y correlacionar las condiciones ecológicas de estos microorganismos y sus capacidades naturales para degradar hidrocarburos.

Establecer las interacciones entre las diferentes especies para definir el mejor consorcio hidrocarburofílico.

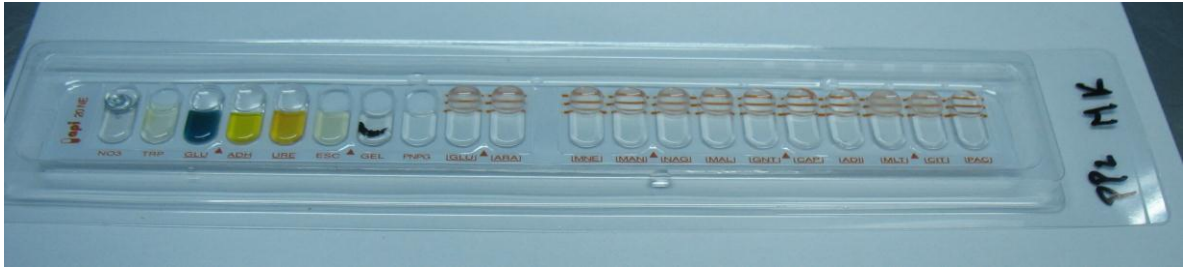
ANEXOS

Anexo 1. UBICACIÓN Y DIVISIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO.

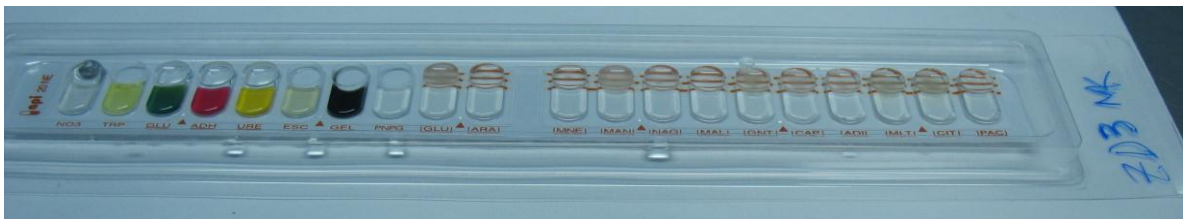


División de la zona de muestreo, PP (pozo petrolero), ZD (zona de derrame), ZT (zona de transición), ZNC (zona no contaminada).

Anexo 2. IDENTIFICACIÓN DE CEPAS RESISTENTES



Cepa PP-B identificada con Api20NE® con 99,5% de identificación como *Burkholderia cepacia*.



Cepa ZD-A identificada con Api20NE® con 97,4 % de identificación como *Pseudomona aeruginosa*



Cepa ZNC-A identificada con Api20NE® con 70,0 % de identificación como *Pseudomona putida*.

BIBLIOGRAFIA

Allred, Degray, Edwards, Hedrick, Klemme, Rogers, Wulf and Hodge, 1963, Prop Procedures for Microbiological Examination of Fuels, SIM Special Publications, No. 1. Merck, Sharp & Dohme Research Laboratories, Rahway, N.J.

Alexander, M. (1999). Biodegradation and Bioremediation 2nd ed. Academic Press, London.

American Petroleum Institute (API). Industrial oily waste control 121p.

Atlas R, Bartha R. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Ed. Addison Wesley. Madrid. 2002. 561p.

Balb, M.; Al-awadhi, N. ; Al-daher, R.. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil : microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. Journal of Microbiological Methods. 32:155-164.

Benavides, J; Quintero, G Msc, Guevara, A; Jaimes, D; Gutiérrez ,S; García, J. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA ISSN: 1794-2470 VOL.4 No. 5 ENERO - JUNIO DE 2006:1-116.

Braibant C. Estudio del potencial de degradación de los por *Acinetobacter sp.* Y *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. 2004; Escuela de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Burland, S; Edwards, E.. 1998. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. Applied and Environmental Microbiology. Estados Unidos. 65(2):592-533.

Bushnell and Haas, 1941, J. Bacteriol., 41:653.

Casellas, M.; Fernández P.; Bayona. (1995). "Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain)", Chemosphere 30: 725–740.

Cervantes, F. ; Dijkstra, W. ; Duong-dac, T. ; Ivanova, A. ; Lettinga, G. ; Field, J.. 2001. Anaerobic mineralization of toluene by enriched sediments with quinines and humus as terminal electron acceptors. *Applied and Environmental Microbiology*. Estados Unidos. 67(10):4471- 4478.

Cunningham C, Philp J. Comparison of Bioaugmentation and Bioestimulation in ex situ treatment of Diesel Contaminated Soil. *Land Contamination and Reclamation*. 2000; 8 (4): 261- 269.

Davis, J.B. Microbial decomposition of hydrocarbons. *Ind. Eng. Chem*; 1956; 48:1444-1448.

Fatima B, Flavio A, Oliveira C, Benedict O, William T. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal Microbiology*. 2003;34(1).

Franzmann, P. ; Robertson, W. ; Zappia, L. ; Davis, G.. 2002. The role of microbial populations in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface. *Biodegradation*. Países Bajos. 13:65-78.

Garay, J., G. Ramírez, J. Betancourt, B. Marín, 2003. Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos: aguas, sedimentos y organismos. INVEMAR, Santa Marta. 177 p.

Greene, A. ; Kay, J. ; Jaber, K. ; Stehmeier, L. ; Voordouw, G.. 2000. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. Estados Unidos. 66(12):5282-5289.

Haigler, B., C. Pettigrew y J. Spain. 1992. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 2237-2244.

Hanson, K. ; Anuranjini, N. ; Kapadia, M. ; Desai, A.. 1996. Crude oil degradation by *Acinetobacter* sp. A3 as influenced by nitrogen, phosphorus and surfactants. *Indian Journal of Experimental Biology*. 34(12):1276-1278.

Harris, S.. 1997. Hydrocarbon bioremediation. No se encontró más información. Material proporcionado por Marc Gesnot en el lugar de realización de la práctica.

INVEMAR. 2001. Informe del estado de los ambientes marinos y costeros en Colombia: 2000. INVEMAR, Santa Marta. 138 p.

Jacobucci, D. ; Vasconcelos, C. ; Matsuura, A. ; Falconi, F. ; Durrant, L.. 2000. Degradation of diesel oil by biosurfactants-producing bacterial strains. Contaminated Soil Sediment and Water. Association of Environmental Health and Sciences.

Lepo, J. ; Hancock, P. ; Zuleger, C. ; Roupp-edwards, K.. 2001. Effectiveness and safety of biosurfactants as agents of oil spill response. Center for Environmental Diagnostics and Bioremediation, University of West Florida. Pensacola, Estados Unidos. Consultado el 24 de junio del 2003. Disponible en <http://www.kmprc.or.kr/dataroom/2001iosc/PDF/00609.pdf>.

Li, G. ; Hu, H. ; Hao, J. ; Fujie, K.. 2002. Use of biological activated carbon to treat mixed gas of toluene and benzene in biofilter. Environmental Technology. 23:467-477

Madigan, M. ; Martinko, J. ; Parker, J.. 1999. Brock : Biología de los Microorganismos. 8 ed. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. 986 p.

Maroto,M; Rogel , J Geocisa. Div. Protección Ambiental de Suelos: Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA ISSN:1794-2470 VOL.4 No. 5 ENERO - JUNIO DE 2006:1-116

Marving, C. "Revisión de los procesos de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, aplicados en Colombia" Tesis de grado. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá. 1999.

Ministerio del Medio Ambiente. *Guía de manejo ambiental para proyectos de perforación de pozos de petróleo y gas*. VERSION N°1 Agosto/99

Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial. Resolución número (1742) 3 de Octubre de 2008.

Moriya, K. ; Horikosil, K.. 1993. Isolation of a benzene-tolerant bacterium and its hydrocarbon degradation. Journal of Fermentation and Bioengineering. 76(3):168-173.

Narváez-Flórez S, Gómez M, Martínez M. Selección de bacterias con capacidad Degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe Colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - Vol. 37 (1) – 2008: 63 – 77.

Norman, R., R. Frontera-suau y P. Morris. 2002. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5096-5103.

Olson, J. ; Mills, G. ; Herbert, B. ; Morris, P.. 1999. Biodegradation rates of separated diesel components. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(11):2448-2453.

PRINCE R (1993) Biorremediation in Marine Environments. *Crit. Rev. Microbiol.* 19: 217-242.

Rahman, K; Banat, I. ; Thahira, J. ; Thayumanavan, T. ; Lakshmanaperumalsamy, P.. 2001. Bioremediation of gasoline contaminated soil by a bacterial consortium amended with poultry litter, coir pith and rhamnolipid biosurfactant. *Bioresource Technology.* 81:25-32.

Restrepo R. Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo. 2002.

Rittman, B.. 1994. *In situ* bioremediation. 2 ed. Noyes Publication. New Jersey, Estados Unidos. 255 p.

Riser-Roberts E (1998) Bioremediation of petroleum contaminated soils. Lewis. Chelsea, MI, EEUU. pp. 232-249

Rockne K, Chee-Sanford J, Sanford R, Brian P, James T, Staleyand S. Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology* . 2000; 66: (4)1595-1601.

Rodríguez, J; Sánchez, J. Biorremediación. Artículo: Fundamentos y aspectos microbiológicos.

Ron, E. ; Rosenberg, E.. 2002. Biosurfactants and oil bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology.* 13:249-252.

Rossini ,F D.: (1960).Fundamental Processes of Autoxidation,J Chem.Educ.,37,554

Sudarat B, Britz M, Grant S. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons defined fungal-bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology.*2000; 66(3): 1007-1019.

Svenja R, Alexander N, Ulf S, Peter K. Differential detection of key enzymes of polyaromatic-hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology*. 1999; 145: 1731-1741.

Theron, J. Y Cloete, T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. *Critical Rev. Microbiol*; 2000;26: 37-57.

Thomassin-Lacroix, E. ; Eriksson, M. ; Reimer, K. ; Mohn, W.2002. Biostimulation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. *Applied Microbiology Biotechnology*. Quebec, Canadá. 59:551-556.

Tomasini-Ortíz, A. C. ; *et al.*, 2004. Evaluación de microorganismos efectivos (1ª Parte). Informe final del proyecto TC-0401.5. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.

Tosse , O."*Legislación Ambiental relacionada con Contaminación del Recurso Suelo en Colombia.*" Ministerio de Ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial. Dirección de Ecosistemas. 2003.

Siva S, Brett R, Tessa M, Vogeler I, Clothier B, Grant L. Northcott and Don McNaughton. Bioremediation of soils contaminated with organic compounds. 2004. En: http://www.regional.org/au/asssi/super/soil2004/pdf/1455_sivakumarans.pdf.

Stelmack, P. ; Gray, M.; Pickard, M.. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. Estados Unidos. 65(1):163-168

Nocentini, M. ; Pinelli, D. ; Fava, F.. 2000. Bioremediation of a soil contaminated by hydrocarbon mixtures : the residual concentration problem. *Chemosphere*. 41(2000):1115-1123.

Vasudevan, N.; RAJARAM, P.. 2001. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. *Environment International*. 26:409-411.

Venosa, A. ; Stephen, J. ; Macnaughton, S. ; Chang, Y. ; White, D.. 1999. Microbial populations changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Microbial Biosystems: New Frontiers*. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. Halifax, Canadá.

Watanabe, K. (2001). Microorganisms relevant to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology* 12:237-241.

Wongsa, P., M. Tanaka, A. Ueno, M. Hasanuzzaman, I. Yumoto y H. Okuyama. 2004. Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Curr. Microbiol.*, 49: 415-422.

Zobell, C.E. (1946). Action of microorganisms in hydrocarbons. *Bact. Rev.*10:1-49.

www.ecopetrol.com.co/especiales/elpetroleoysumundo/sumundo.html.