



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE LICENCIATURA EN CIENCIAS MENCIÓN BIOLOGÍA O
QUÍMICA**

**Aislamiento de bacterias biodegradadoras de hidrocarburos
desde aguas empetroladas de la bahía de Quintero.**

**Tesis para optar al grado de
Licenciatura en Ciencias mención Biología**

EDUARDO ANDRES JERIA CORTES

**Directora de Tesis
Prof. Dra. MARCELA ZAHR T.**

Valparaíso, Chile

2017

Agradecimientos.

A mi familia por tantos días de paciencia y apoyo.

A mis amigas/os por acompañarme todos estos años.

A la Doctora Marcela Zahr, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Al Dr. Pablo Conejeros y todas las personas que me ayudaron a completar este trabajo.

Índice.

Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. Marco Teórico.....	8
1.1. Petróleo.....	8
1.1.2. Origen del petróleo.....	8
1.1.3. Composición del Petróleo.....	8
1.1.3.1. Hidrocarburos Saturados.....	9
1.1.3.2. Hidrocarburos Aromáticos.....	12
1.1.3.3. Hidrocarburos aromáticos Policíclicos.....	12
1.1.4. Derivados del Petróleo como contaminantes.....	13
1.2. Degradación de Hidrocarburos.....	14
1.2.1. Mecanismos de degradación de Hidrocarburos.....	14
1.3. Biorremediación.....	15
2. Hipótesis.....	16
3. Objetivo General.....	17
4. Metodología.....	18
4.1. Toma de Muestras.....	18
4.2. Aislamiento.....	18
4.3. Caracterización morfológica.....	18
4.4. Ensayo de degradación de hidrocarburos.....	18
4.5. Identificación Bioquímica.....	19
4.6. Identificación Molecular.....	19
4.6.1. Extracción de ADN.....	19
4.6.2. Preparación de Cebadores.....	20
4.6.3. PCR.....	21

5. Resultados.....	22
5.1. Caracterización Macroscópica.....	22
5.2. Degradación de Hidrocarburos.	25
5.2.1. Degradación de Hexadecano.....	27
5.2.2. Degradación de Antraceno.....	28
5.2.3. Degradación de Criseno.....	29
5.3. Identificación Bioquímica.	30
5.4. Identificación Molecular.	31
6. Discusión.....	33
7. Conclusión.....	35
8. Proyecciones.....	36
9. Bibliografía.....	37
Anexo	41

Índice de Figuras.

Figura 1: Mecanismo de degradación aeróbica de alcanos (Rojo et al., 2009).....	10
Figura 2: Mecanismo anaeróbico de degradación de alcanos (Rojo et al., 2009).....	11
Figura 3: Estructura de algunos representantes de HAP. (Mrozik et. Al. 2003).....	12
Figura 4: Crecimiento de la cepa MZN 6 en medio MM1 enriquecido con (A) petróleo, (B) hexadecano, (C) antraceno	25
Figura 5: Imagen del gel de agarosa, se observa una amplificación de las cepas SDM6, MZN14, MZN6 y MZN2 (Flechas Blancas), reveladas con luz UV.	32

Índice de Tablas.

Tabla 1: Caracterización Morfológica de las cepas de estudio.	23
Tabla 2: Resultados Tinción Gram	24
Tabla 3: Crecimiento de las cepas en crudo de petróleo	26
Tabla 4: Crecimiento de las cepas en Hexadecano	27
Tabla 5: Crecimiento de las cepas en Antraceno.....	28
Tabla 6: Crecimiento de las cepas en Criseno	29
Tabla 7: Resultados identificación bioquímica mediante API 20NE.....	30
Tabla 8: Identidad de las 14 cepas degradadoras de hidrocarburos en base al kit API20NE.....	31
Anexo 1: Resultados Biolog.....	41

Resumen.

El petróleo es una importante fuente económica e industrial que presenta un alto grado de toxicidad para el medio ambiente. Diversos estudios se han realizado para poder controlar y eliminar los efectos adversos que produce el petróleo y sus derivados en el ambiente, en especial el uso de microorganismos o productos microbianos., tales como bioestimulación que consiste en establecer las condiciones necesarias para que las bacterias autóctonas se encarguen de la desintoxicación del ambiente, y bioaugmentación, que consiste en el ingreso de bacterias nuevas a un ambiente con el fin de eliminar los componentes tóxicos.

En este trabajo se realizó una evaluación del potencial de biodegradación de cepas aisladas de muestras de aguas empetroadas provenientes de la bahía de Quintero a través de su capacidad de crecimiento en medios sólidos en presencia de crudos de petróleo y derivados de hidrocarburos alifáticos como el hexadecano y aromáticos como el antraceno y el criseno. Se hizo una caracterización macroscópica y microscópica de las cepas además de su identificación bioquímica y molecular.

Se caracterizaron morfológicamente 33 cepas de las cuales 14 cepas presentaron la capacidad de degradar hidrocarburos, equivalentes al 45% del total de cepas aisladas. Solo 5 fueron capaces de degradar los tres derivados utilizados (Hexadecano, antraceno y criseno).

Adicionalmente se caracterizaron bioquímicamente las 14 cepas degradadoras de petróleo obteniéndose preliminarmente que corresponden a EMB5: *Acromonas hydrophila*, EMB7: *Pseudomonas luteola*, SDM1: *Shewanella putrefaciens*, SDM6: *Cryseobacterium neningosepticum*, SDM7: *Senotrophomonas maltophila*, SDM8: *Aeromonas hydrophila*, MZN1: *Ochrobactrum anthropi*, MZN4: *Brevundimonas vesicularis*, MZN5: *Chryseobacterium indologenes*, MZN6: *Sphingomonas paucimobilis*, MZ9: *Photobacterium damsela*, MZN14: *Oligella ureolytica* y MZN16: *Sphingomonas paucimobilis*.

Por métodos moleculares se consiguió amplificación exitosa de las cepas SDM6 y MZN14, por lo que es necesario continuar probando con diferentes condiciones de PCR. Adicionalmente es necesario realizar pruebas adicionales, la determinación de las tasas de degradación de cada derivado de hidrocarburos y la determinación de interacciones antagónicas entre las cepas aisladas para su posible uso en biorremediación.

Abstract.

Oil is an important economic and industrial source that presents a high degree of toxicity to the environment. Various studies have been carried out to control and eliminate the adverse effects of petroleum and its derivatives on the environment, especially the use of microorganisms or microbial products, such as biostimulation, which consists in establishing the necessary conditions for native bacteria for the detoxification of the environment, and bioaugmentation, which consists of the entry of new bacteria into an environment to eliminate toxic components.

In this work an evaluation of the potential of biodegradation of strains isolated of samples of oil contaminated waters from the bay of Quintero was carried out through its capacity of growth in the presence of petroleum crude and derivatives of aliphatic hydrocarbons like hexadecane and aromatics such as anthracene and chrysene. A macroscopic and microscopic characterization of the strains was done in addition to their biochemical and molecular identification.

33 strains were morphologically characterized, of which 14 strains showed the capacity to degrade hydrocarbons, equivalent to 45% of the total of isolated strains. Only 5 were able to degrade the three derivatives used (Hexadecane, anthracene and chrysene).

In addition, the 14 petroleum degrading strains were preliminarily characterized as *EMB 5: Acromonas hydrophila*, *EMB 7: Pseudomonas luteola*, *SDM 1: Shewanella putrefaciens*, *SDM6: Cryseobacterium neningosepticum*, *SDM7: Senotrophomonas maltophila*, *SDM8: Aeromonas hydrophila*, *MZN1: Ochrobactrum anthropi*, *MZN4: Brevundimonas vesicularis*, *MZN5: Chryseobacterium indologenes*, *MZN6: Sphingomonas paucimobilis*, *MZN9: Photobacterium damsela*, *MZN14: Oligella ureolytica* and *MZN16: Sphingomonas paucimobilis*.

By molecular methods only successful amplification of the SDM 6 and MZN 14 strains was achieved, so it would be necessary to continue testing with different PCR conditions. In addition, it is necessary to carry out additional tests, such as the determination of the degradation rates of each hydrocarbon derivative and the determination of antagonistic interactions between the isolated strains for their possible use in bioremediation.

1. Marco Teórico.

1.1. Petróleo

El petróleo es una importante fuente de energía, y en la última década ha experimentado un aumento en su explotación, sus subproductos son ampliamente utilizados en diferentes sectores industriales, convirtiéndola en una mercancía de gran importancia para el mercado mundial. Conocido desde la antigüedad por las filtraciones observadas en la superficie terrestre, en su forma asfáltica y bituminosas y utilizado como la construcción de embarcaciones, caminos y procesos de lubricación.

1.1.2. Origen del petróleo.

Existen diversas teorías que buscan explicar el origen del petróleo, la teoría mineral, la cual atribuye la formación del petróleo a la acción del agua sobre ciertos carburos metálicos, similar a la formación de acetileno y metano por la reacción entre carburo de calcio y agua, estas fueron dando origen a hidrocarburos más complejos por acción de presión y temperatura. La otra teoría es la teoría orgánica, la cual establece que el origen del petróleo viene dado por la descomposición de material orgánico en las profundidades de océanos ancestrales y la acción de eventos geológicos (Hispánica, 2001).

1.1.3. Composición del Petróleo.

Desde un punto de vista químico el petróleo está formado por una mezcla compleja de hidrocarburos, compuestos de carbono e hidrogeno, y en menor cantidad nitrógeno, azufre y oxígeno, además de diversos metales en bajas concentraciones.

La composición de los hidrocarburos se estudia en base a las llamadas "Series de Hidrocarburos", de las cuales muchas se encuentran ya presentes en el petróleo crudo y otras se producen por cracking e hidrogenación.

La compleja mezcla del petróleo contiene gran cantidad de diferentes químicos y se compone de cuatro fracciones principales: hidrocarburos saturados, hidrocarburos aromáticos, resinas y asfáltenos. Debido a la capacidad del carbono de formar diferentes tipos de cadenas y ciclos es posible encontrar conformaciones de tipos de hidrocarburos: saturados (alcanos y cicloalcanos), aromáticos, asfáltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas) y resinas (piridinas, quinolines, carbazoles, sulfóxidos y amidas) (Colwell & Walker, 1977).

Los hidrocarburos con bajo peso molecular se presentan generalmente en fase gaseosa, mientras que aquellos de alto peso molecular son líquidos o sólidos a temperatura ambiente. Los hidrocarburos son poco reactivos dada su carencia de grupos funcionales y su baja solubilidad en agua (Liu et al. 2014).

1.1.3.1. Hidrocarburos Saturados.

Se denomina como hidrocarburos saturados a aquellos átomos de carbono unidos solo por enlaces sencillos normales, todos los enlaces libres están saturados con átomos de hidrogeno, por esto, pertenecen a los compuestos orgánicos más lentos a reaccionar.

Un ejemplo de estos es el metano (CH_4) y por el aumento de la cadena del carbono, se pueden obtener otros hidrocarburos, los que se diferencian por la introducción de grupos CH_2 y responden a la fórmula general $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$.

La presencia de nuevos grupos CH_2 tiene poca influencia en las propiedades químicas, físicas, mientras que la longitud de la cadena de carbono tiene una implicancia crítica en las características del hidrocarburo, viéndose un incremento regular de sus propiedades a medida que aumenta el largo de la cadena (McMurry, 2008).

Pueden encontrarse alcanos lineales (n-alcanos), cíclicos (ciclo-alcanos) o ramificados (iso-alcanos). Aquellos que poseen entre uno a cuatro carbonos son gaseosos a temperatura ambiente, mientras que aquellos hidrocarburos de cadenas más largas tienden a ser líquidos o sólidos. Los alcanos pueden llegar a constituir el 50% del crudo de petróleo, dependiendo del origen del petróleo.

El metabolismo de los alcanos, por parte de los múltiples organismos como plantas, algas verdes, bacterias o animales se ve dificultado ya que presentan una baja reactividad y solubilidad en agua, pero se han descubierto microorganismos tanto aeróbicos como anaeróbicos capaces de utilizar alcanos como fuente de carbono y energía.

Se desconoce con exactitud el mecanismo por el cual los alcanos ingresan a la célula, aquellos alcanos pequeños lo hacen de manera directa, mientras que para los de mayor tamaño es necesario la adición por parte de la bacteria a la superficie de la gota de hidrocarburo o el uso de surfactantes. Los microorganismos presentan diferentes estrategias para la degradación de alcanos, pero existen dos rutas predominantes en la

degradación de los alcanos lineales: la degradación aeróbica y la degradación anaeróbica (Rojo et al, 2009).

La degradación aeróbica, consiste en el uso de O₂ como un activador de la molécula de hidrocarburo, gracias a la acción de enzimas monooxigenasas que permiten transformar los hidrocarburos poco reactivos.

La degradación de alcanos de dos o más carbonos comienza generalmente con la oxidación del carbono terminal pasando de un grupo metil a un alcohol primario, los cuales son convertidos en aldehídos y finalmente en ácidos grasos, los que son posteriormente acoplados a CoA y β-oxidados para formar acetil-CoA.

El metano (CH₄) es un caso especial, ya que al transformarse en metanol pasa a formaldehído y finalmente a ácido fórmico, el cual puede transformarse en CO₂ o ingresar a la vía de la ribosa monofosfato o a la vía de la serina, dependiendo del microorganismo.

Se ha observado también la oxidación subterminal de alcanos, los cuales generan alcoholes secundarios los que son transformados a cetonas y oxidados por monooxigenasas en ésteres. El éster es hidrolizado por esterasas generando un alcohol y un ácido graso (Figura 1)

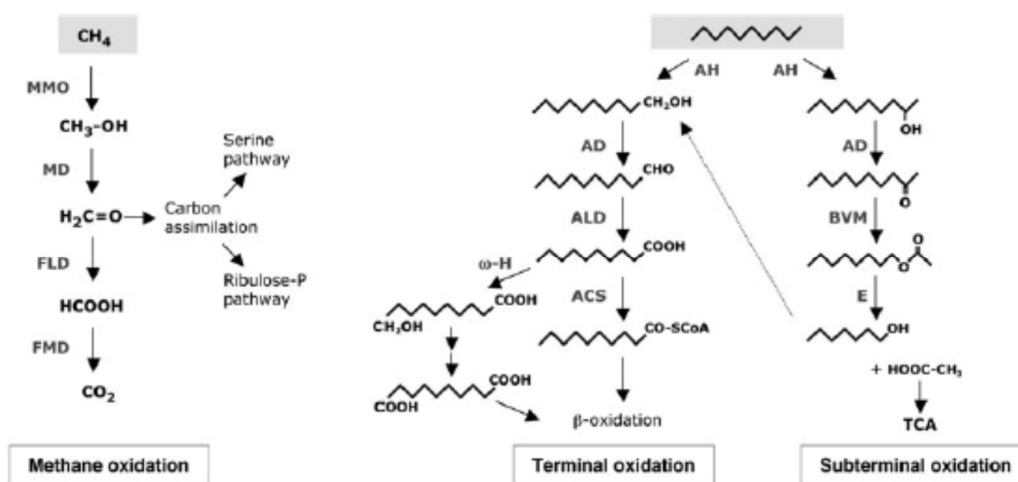


Figura1: Mecanismo de degradación aeróbica de alcanos (Rojo et al., 2009)

Los microorganismos capaces de degradar anaerómicamente los alcanos utilizan nitratos o sulfatos como aceptores de electrones; existen dos mecanismos por el cual se degradan los alcanos, el primero implica la activación subterminal del alcano por adición de una molécula de fumarato, el resultado de esta reacción es unido a CoA y convertido a acetil CoA, el segundo mecanismo (descrito solamente para el propano) en la cual el fumarato es añadido al carbono terminal del alcano (Figura 2) (Shao et al., 2013).

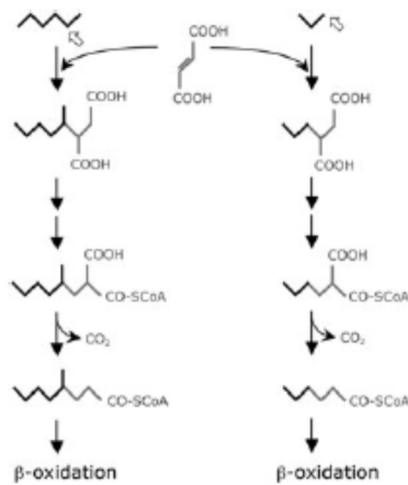


Figura 2: Mecanismo anaeróbico de degradación de alcanos (Rojo et al., 2009).

1.1.3.2. Hidrocarburos Aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos forman una familia de hidrocarburos compuestos por un núcleo bencénico (1,3,5 ciclohexatrieno). Su nombre proviene del siglo XIX, en donde se descubrieron múltiples productos con aromas intensos, lo cuales resultaron contener núcleos bencénicos.

Cuando se sintetiza el 1,3,5 ciclohexatrieno se obtiene benceno, pero las propiedades que presentan estos dos compuestos son completamente diferentes, siendo el benceno más estable y la distancia de los enlaces C-C presentan una longitud regular de 0.14nm, por lo que forman un hexágono regular (Yúfera, 1994).

1.1.3.3. Hidrocarburos aromáticos Policíclicos.

Uno de los componentes del petróleo son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), los cuales son importantes contaminantes tanto del aire, suelo y sedimentos. En la última década se ha observado un aumento de esta clase de productos como resultado de la contaminación de origen industrial y del transporte del petróleo y sus derivados. Los HAP son un grupo de moléculas compuestas por dos o más anillos aromáticos fusionados, ya sea de forma lineal o angular (Figura 3)

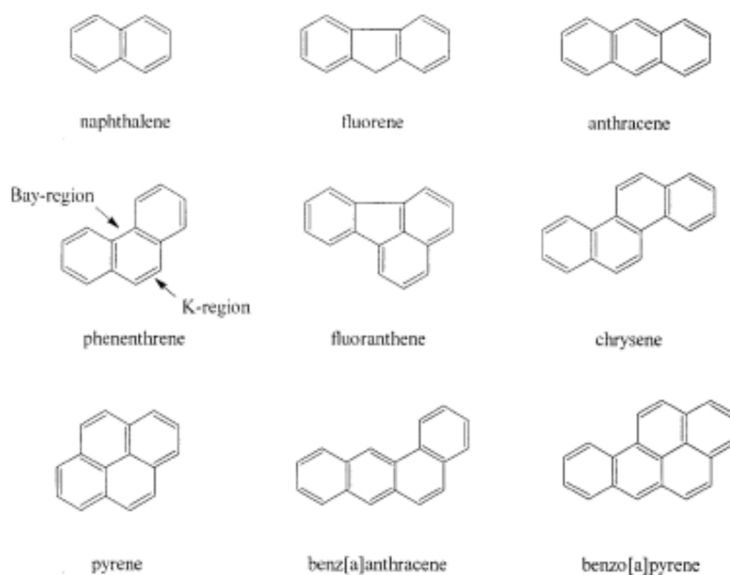


Figura 3: Estructura de algunos representantes de HAP. (Mrozik et. Al. 2003)

Los HAP de bajo peso molecular se definen como aquellos con dos o tres anillos, y estos son relativamente volátiles, solubles y más degradables que aquellos con alto peso molecular, que son aquellos con cuatro o más anillos, los cuales se unen al suelo o al sedimento y son más resistentes a la degradación por parte de las comunidades bacterianas además de ser altamente tóxicos para las células (Mrozik et al. 2002).

1.1.4. Derivados del Petróleo como contaminantes.

Los hidrocarburos derivados del petróleo son los contaminantes ambientales más comunes, los derrames de petróleo presentan un gran riesgo para los ecosistemas marinos y terrestres. La contaminación por petróleo puede provenir de diferentes fuentes, ya sean accidentales u operacionales donde el petróleo es almacenado, transportado, procesado o utilizado, tanto en tierra como en el mar (Head et al. 2006). Las descargas de derivados del petróleo en el ambiente son responsables, directa o indirectamente, de afectar la salud del ser humano y los sistemas ecológicos marinos y continentales, más los efectos varían dependiendo del lugar geográfico y la naturaleza del vertido (Mahjoubi et al. 2013).

Hay un gran interés en la biorremediación de los HAP, especialmente en ambientes marinos ya que estos presentan serios riesgos para la salud de las personas, ya que presentan efectos no solo tóxicos, sino que genotóxicos, mutagénicos y cancerígenos. Estos compuestos presentan estructuras que no son fáciles de degradar por bacterias, lo que hace que estos procesos sean lentos, tomando meses en el caso de los HAP de bajo peso molecular.

1.2. Degradación de Hidrocarburos.

Los componentes del crudo de petróleo y muchos combustibles pueden ser degradados por microorganismos, dependiendo del largo de sus cadenas. HAP y otras moléculas de gran tamaño son más persistentes en el ambiente y tienen efectos a largo plazo, ya que tienen la particularidad de ser absorbidos en el material particulado suspendido en el agua y, por consecuencia, depositados en el sedimento, que se transforma en un reservorio de contaminantes afectando a la biota marina por largos periodos de tiempo (Rodríguez et al. 2015). Estudios de degradación de hidrocarburos llevados a cabo en ambientes marinos han demostrado que la adición de nutrientes produce un aumento en la tasa de degradación de los hidrocarburos, se han reportado tasas de degradación mayores para hidrocarburos saturados, seguidos por aromáticos de bajo peso molecular (Head et al. 2006), los cuales han desarrollado capacidades metabólicas y fisiológicas únicas que les permiten ser ampliamente exitosos y son productores de compuestos los cuales no son comúnmente encontrados en los ambientes terrestres (Hasanshahian et al. 2013).

1.2.1. Mecanismos de degradación de Hidrocarburos.

Muchas bacterias degradadoras de hidrocarburos, como *Pseudomonas sp.*, *Pseudoalteromonas sp.*, *Psychrobacter sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Sphingomonas sp.*, *Ochrobactrum sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Acinetobacter sp.* y *Bacillus sp.*, fueron aisladas desde ambientes marinos. (Al-Hadhrami et al., 1996; Luigi et al., 2007; Chen et al., 2008; Arulazhagan and Vasudevan, 2009; Song et al., 2011; Hou et al., 2012; Patel et al., 2013). Estos microorganismos poseen una maquinaria metabólica altamente especializada para la degradación de derivados de hidrocarburos (entre otras rutas metabólicas). La forma más rápida de degradar hidrocarburos y otros contaminantes está dada en condiciones aeróbicas, en la cual la célula ingresa el contaminante, inicialmente se produce un ataque al contaminante por acción enzimática y procesos oxidativos además de la incorporación de oxígeno catalizado por oxigenasas y peroxidasas: Mecanismos de degradación paralelos convierten el contaminante orgánico en intermediarios de la vía metabólica principal.

Un ejemplo de estas rutas es la observada en *Pseudomonas*, la cual, a través del flujo de electrones a través de NADH a la dihidroxilasa permite la conversión de un alcano en un alcohol, el cual es posteriormente oxidado a aldehído y ácido carboxílico antes de ingresar a la ruta β -oxidativa. Las rutas de degradación de otras clases de hidrocarburos, como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP) (Teramoto et al. 2013).

Bacterias del genero *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus*, entre otras presentan la capacidad de metabolizar HAP como el antraceno, a través de la oxidación del antraceno en la posición 1,2 para formar 1,2-cis-dihidroxi-1,2-dihidroxiantraceno para convertirlo en 1,2 dihidroxi antraceno vía dihidrodiol dehidrogenasa. Posteriormente las bacterias oxidan el 1,2-dihidroxiantraceno a 4-cis-(2-hidroxinaftaleno-3-yl)-2-oxo ácido butenoico el cual es convertido en ácido 2-hidronaftoico, esto es metabolizado en forma de salicilato y catecol (Moody et al. 2001).

1.3. **Biorremediación.**

La biorremediación es el producto de múltiples investigaciones que tuvieron como objetivo el desarrollar una técnica amigable y práctica de control y limpieza de componentes tóxicos presentes en los ambientes. Esta técnica consiste en el uso y manipulación de los productos microbianos para combatir la polución, aprovechando las habilidades desintoxicantes de los organismos vivos y su facilidad para convertir sustancias tóxicas, incluidos xenobióticos, en productos inocuos, generalmente dióxido de carbono y agua.

La biorremediación permite, al contrario de los procesos físico-químicos, destruir los contaminantes orgánicos a un costo reducido y en condiciones ambientales, lo que lo ha convertido en la principal opción para la eliminación de derivados del petróleo (Ghosal et al., 2016).

Otra forma que tienen los microorganismos para la metabolización de los hidrocarburos es la utilización de subproductos metabólicos, los biosurfactantes, que son moléculas complejas capaces de solubilizar compuestos hidrófobos, de modo de facilitar la utilización de hidrocarburos como fuente de carbono. Existen muchos tipos de biosurfactantes, estos sintetizados por diversas especies de bacterias (como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, entre otras). Uno de estos son los lipopéptidos, que consisten en un ácido graso hidrofóbico y un péptido hidrofílico, lo que le confiere sus propiedades emulsificantes (Banat et al., 2010).

2. Hipótesis

Bacterias aisladas desde aguas empetroladas de la bahía de Quintero podrán ser capaces de degradar petróleo y derivados de hidrocarburos alifáticos y aromáticos.

3. Objetivo General

- Aislar las cepas bacterianas que presenten capacidad de biodegradar derivados de hidrocarburos lineales y aromáticos de muestras de aguas empetroladas de la bahía de Quintero.

Objetivos Específicos

- Caracterizar morfológicamente las cepas bacterianas
- Determinar la capacidad de crecimiento de las cepas en crudo de petróleo y derivados de hidrocarburos alifáticos y aromáticos como única fuente de carbono.
- Caracterizar bioquímicamente aquellas cepas bacterianas con capacidad de degradar hidrocarburos.
- Identificación molecular preliminar mediante reacción en cadena de la polimerasa.

4. Metodología.

4.1. Toma de Muestras.

Se tomaron muestras de aguas y sedimentos contaminados con petróleo en enero 2015 desde tres sitios en la comuna de Quintero, la caleta El Manzano, Caleta Embarcadero y de sedimentos entre estos dos puntos, esto después del derrame de petróleo ocurrido el 24 de septiembre del 2014 en la misma comuna.

4.2. Aislamiento.

Se realizó aislamiento directo desde la muestra (inoculo 0,1mL) por 3 días a 23°C, posteriormente un enriquecimiento en Caldo LB 3% NaCl por 3 días a 23°C. Adicionalmente se realizaron diluciones desde 10^{-1} a 10^{-6} en solución salina 0.8% y siembra homogénea (inoculo 0,1mL) Por 3 días a 23°C. Las cepas fueron denominadas según lugar de origen siendo MZN a las provenientes de El Manzano, EMB a las provenientes de El Embarcadero y SDM a las provenientes de sedimentos.

4.3. Caracterización morfológica.

A las 33 cepas previamente aisladas fueron caracterizadas macroscópica utilizando como parámetros la forma, borde, elevación, opacidad, color, superficie y consistencia de la colonia. Adicionalmente se realizó una caracterización microscópica mediante tinción diferencial Gram.

4.4. Ensayo de degradación de hidrocarburos.

Se inocularon las 33 cepas, según el protocolo establecido por Kiyohara, (1982), se realizó un cultivo en medio mínimo MM1 (1.32g K_2HPO_4 , 1g KH_2PO_4 , 0.81g NH_4Cl , 0.84g $NaNO_3$, 0.01g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2g $MgSO_4$ y 0.02g $CaCl_2$) con Crudo estéril y 3% Cloruro de Sodio y se incubaron a 23°C por 14 días, se utilizaron dos tipos de crudo de petróleo en este estudio, el Crudo 1, proveniente de la fosa Daniel en ENAP Magallanes y el Crudo 2, proveniente de ENAP Bio-Bio. Posteriormente se cultivaron en medio MM1 con hexadecano a 600ppm y cloruro de sodio al 3% por 14 días a 23°C, esto se repitió con antraceno y criseno.

4.5. Identificación Bioquímica.

La identificación de las cepas se realizó utilizando el kit comercial API 20NE (Biomérieux), para esto se realizaron cultivos puros de las cepas en medio nutritivo 3%NaCl enriquecido con crudo de petróleo, se realizó suspensiones de las cepas en 2ml de solución salina 0.8% a una turbidez similar al reactivo McFarland 0.5, se inocularon con esta suspensión se inocularon las pruebas desde NO₃ a PNPG, posteriormente se tomaron 200µl de la suspensión bacteriana y se inoculo una ampolla de API AUX Medium, y se llenaron los tubos de las pruebas [GLU] hasta [PAC]. Se les añadió aceite mineral a los tubos de las pruebas GLU, ADH y URE. Se incubaron a 25°C por 24h antes de ser observado y analizadas con el software ApiWeb 1.2.1.

Adicionalmente se utilizó el kit comercial BiologGN2 y Biolog GP2 (Ursulab), para esto se trabajó con cultivos frescos en medio nutritivo 3%NaCl, se tomaron colonias de las cepas y se realizó una suspensión a una densidad similar al McFarland 0.5, 150µl de esta suspensión se inocularon en cada poso del GN2/GP2 MicroPlate e incubado a 25°C por 24h antes de la observación de los resultados.

4.6. Identificación Molecular.

4.6.1. Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se realizaron cultivos sólido frescos de las 14 cepas previamente seleccionadas como degradadoras de hidrocarburos en medio nutritivo con 3% NaCl, se incubaron a 25°C por 48 horas, posteriormente se inocularon tubos con caldo nutritivo con 3% NaCl por 48 horas, se extrajo 1000µl de medio de cultivo en un microtubo de 1.5ml y centrifugado a 6000rpm por 20 minutos a 4°C, se extrajo el sobrenadante y se agregaron nuevamente 1000µl de medio los cuales fueron centrifugados bajo las mismas condiciones. Se extrajo el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente.

El pellet fue re suspendido en 600 µl de solución de lisis (compuesta por 9.34 TE Buffer (10mM Tris-Cl y 1mM EDTA, pH 8.0), 600µl de SDS 10% y 60µl de proteinasa K (20mg/ml)) e incubado a 55°C por 30 minutos tras lo cual se le añaden 600µl Fenol-Cloroformo, se lleva al vórtex a máxima velocidad por 20 segundos y se llevaron a centrifuga por 5 minutos a 13300rpm.

Se extrajo la fase acuosa con micropipeta en un microtubo a la cual se le añade Cloroformo, se lleva a vórtex (máxima velocidad por 20 segundos) y se centrifuga por 5 minutos a 13300rpm y nuevamente se extrae la fase acuosa en un microtubo, se añade al extracto de la fase acuosa 600µl de isopropanol y se incuba a -20°C por 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo se centrifuga a 13300rpm por 15 minutos tras lo cual se extrae el isopropanol y se añaden 1000µl de etanol 70% el cual se elimina por inversión y se dejó secar al aire, una vez seco se añaden 30µl de agua ultra pura.

4.6.2. Preparación de Cebadores.

Se trabajaron con los siguientes cebadores:

PRIMER	SECUENCIA (5'-3')	TEMPERATURA DE MELTING
ATPD FORW	ATG AGT CAG GGC AAG ATC GTT C	62.1°C
ATPD REV	TCC TGC AGG ACG CCC ATT TC	62.5°C
BAC16S1	GTT TGA TCC TGG CTC AG	52.4°C
BAC16S2	GAC GGG CGG TGT GTA CAA	58.4°C
RECA-BRUCOCHRO-F	ATG TCT CAA AAT TCA TTG CGA C	56.4°C
RECA-BRUCOCHRO-R	AGC ATC TTC TTC CGG TCC GC	62.5°C
B27F	GAG TTT GAT CMT GGC TCA G	55-57.5°C
B1512R	AAG GAG GTG ATC CAN CCR CA	58.4-62.5°C
PS-FORW	GGT CTG AGA GGA TGA RCA GT	58.4°C
PS-REV	TTA GCT CCA CCT CGC GGC	60.8°C
AHF	GGG AGT GCC TTC GGG AAT CAG A	65.8°C
AHR	TCA CCG CAA CAT TCT GAT TTG	57.5°C
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	58.4°C
907R	CCC CGT CAA TTC ATT TGA GTT T	58.4°C
SPHINGO 108F	GCG TAA CGC GTG GGA ATC TG	62.5°C
SPHINGO 920R	TTA CAA CCC TAA GGC CTT C	55°C
CAR1	GCT TGA AGA GAT TCG AGT	51.4°C
CAR2	CAC CTC GCG GTC TTG CTG	60.8°C

Las temperaturas fueron calculadas según la herramienta Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)

A los cebadores obtenidos se le añaden agua ultra pura y se lleva a vórtex por 1 minuto, se extraen 0.5µl y se colocaron en microtubos con 9.5µl de agua ultra pura libre de nucleasas.

4.6.3. PCR.

En un microtubo se prepararon 54µl de una mezcla compuesta por 30µl de Master Mix, 3µl de cada primer correspondiente y se 18µl agua ultrapura. Se depositan 18µl de esta mezcla en tubo de PCR al cual se le agrego 2µl del extracto de ADN a amplificar. Las condiciones del PCR fueron de un ciclo de 95° C durante 5 minutos, 35 ciclos de 95° C durante 30 segundos, un periodo de 40 segundos a la temperatura de alineamiento de cada primer, 72° C por un minuto y finalmente, un periodo de extensión de 72° C durante 5 minutos. Posteriormente se congelaron los amplificados a -20°C. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% a 90V por 60 minutos, el gel fue revelado en el equipo Enduro GDS.

5. Resultados.

5.1. Caracterización Macroscópica.

De las 33 cepas aisladas previamente de las muestras de aguas empetroadas de la Bahía de Quintero en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad de Valparaíso, se realizaron cultivos en medio agar Nutritivo 3% NaCl, de los cuales solo crecieron 31 de las 33 cepas (no se observó crecimiento de las cepas MZN7 y MZN8) con el fin de determinar las características macroscópicas de las colonias (Tabla 1).

Posteriormente se tomó una colonia de cada cultivo para la realización de una tinción Gram (Tabla 2) en placas con medio nutritivo incubadas por 48hrs. Se observa la presencia de múltiples cepas Gram negativas, lo que es de esperar ya que las bacterias provenientes de ambientes marinos son mayoritariamente Gram negativa; resulta interesante la aparición también de cepas Gram positivas.

Tabla 1: Caracterización Morfológica de las cepas de estudio.

CEPA	FORMA	BORDE	ELEVACION	OPACIDAD	COLOR	SUPERFICIE	CONSISTENCIA
SDM 1	Circular	Liso	Elevada	Translúcida	Crema amarilla	Suave	Mucosa
SDM2	Circular	Liso	Elevada	Translúcida	Crema	Suave	Granular
SDM3	Circular	Liso	Elevada	Brillante	Crema Blanca	Suave	Mucosa
SDM4	Circular	Liso	Convexa	Opaco	Crema Blanca	Suave	Mucosa
SDM5	Circular	Liso	Convexa	Opaco	Blanca	Suave	Mucosa
SDM6	Circular	Liso	Convexa	Opaco	Crema	Suave	Granular
SDM7	Circular	Liso	Elevada	Opaco	Crema	Suave	Granular
SDM8	Circular	Liso	Convexa	Opaco	Blanca	Rugosa	Granular
SDM9	Circular	Liso	Convexa	Opaco	Blanca	Rugosa	Granular
SDM10	Circular	Liso	Elevada	Opaco/Brilla	Anaranjada	Suave	Granular
EMB1	Circular	Liso	Plana	Brillante	Blanca	Suave	Granular
EMB2	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Amarillo Crema	Suave	Mucosa
EMB3	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Amarillo Crema	Suave	Mucosa
EMB4	Circular	Liso	Convexa	Opaco	Naranja	Suave	Mucosa
EMB5	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Amarillo	Suave	Mucosa
EMB6	Circular	Liso	Umbilicada	Brillante	Blanca	Suave	Mucosa
EMB7	Irregular	Lobulado	Plana	Opaco	Blanca	Suave	Granular
MZN1	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Amarillo Crema	Suave	Mucosa
MZN2	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Amarillo Crema	Suave	Granular
MZN3	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Amarillo Crema	Suave	Granular
MZN4	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Blanca	Suave	Mucosa
MZN5	Circular	Liso	Umbilicada	Translúcida	Blanca	Suave	Mucosa
MZN6	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Crema	Suave	Granular
MZN9	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Roza	Suave	Granular
MZN10	N D	N D	N D	Opaco	Amarillo	Suave	Granular
MZN11	Circular	Liso	Elevada	Opaco	Crema	Suave	Granular
MZN12	Circular	Liso	Convexa	Opaco	Crema	Suave	Granular
MZN13	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Blanca	Suave	Granular
MZN14	Circular	Liso	Convexa	Brillante	Crema	Suave	Mucosa
MZN15	Irregular	Irregular	Elevada	Opaco	Crema	Suave	Granular
MZN16	Circular	Liso	Elevada	Brillante	Semi-transparente	Suave	Granular

Tabla 2: Resultados Tinción Gram

CEPA	MORFOLOGÍA GRAM	
EMB1	Bacilo	-
EMB2	Cocobacilo	-
EMB3	Cocobacilo	-
EMB4	Estafilococo	-
EMB5	Estafilococo	-
EMB6	Bacilo	+
EMB7	Bacilo	-
SDM1	Bacilo corto	-
SDM2	Cocobacilo	-
SDM3	Cocobacilo	-
SDM4	Bacilo	-
SDM5	Estafilococo	-
SDM6	Estafilococo	+
SDM7	Bacilo	+
SDM8	Estafilococo	-
SDM9	Cocobacilo	-
SDM10	Estafilococo	-
MZN1	Bacilo corto	+
MZN2	Estafilococo	-
MZN3	Cocobacilo	-
MZN4	Bacilo	-
MZN5	Cocobacilo	-
MZN6	Estafilococo	-
MZN9	Cocobacilo	-
MZN10	Bacilo corto	-
MZN11	Bacilo corto	-
MZN12	Estafilococo	-
MZN13	Estafilococo	-
MZN14	Estafilococo	-
MZN15	Bacilo	+
MZN16	Bacilo corto	-

5.2. Degradación de Hidrocarburos.

Con las 31 cepas previamente caracterizadas morfológicamente, se procedió a determinar la capacidad de crecer en medio mínimo (MM1) enriquecidos con petróleo (Tabla 3). Se trabajó con dos muestras de petróleo de diferente procedencia.

Se observó crecimiento de solo tres cepas en el crudo 1 (obtenido de la región de Magallanes), SDM6, MZN6 y MZN9. Mientras que con el crudo 2 (obtenido de la región del Bío-Bío) se observó crecimiento de 14 cepas, EMB5, EMB7, SDM1, SDM6, SDM7, SDM8, MZN1, MZN2, MZN4, MZN5, MZN6 (Figura 5), MZN9, MZN14 y MZN16.



Figura 4: Crecimiento de la cepa MZN 6 en medio MM1 enriquecido con (A) petróleo, (B) hexadecano, (C) antraceno

Tabla 3: Crecimiento de las cepas en crudo de petróleo

CEPA	CRUDO 1				CRUDO 2	
EMB 1	-	-	-	-	-	-
EMB 2	-	-	-	-	-	-
EMB 3	-	-	-	-	-	-
EMB 4	-	-	-	-	-	-
EMB 5	-	-	-	-	+	-
EMB 6	-	-	-	-	-	-
EMB 7	-	-	-	-	+	-
SDM 1	-	-	-	-	+	-
SDM 2	-	-	-	-	-	-
SDM 3	-	-	-	-	-	-
SDM 4	-	-	-	-	-	-
SDM 5	-	-	-	-	-	-
SDM 6	+	+	+	+	+	+
SDM 7	-	-	-	-	+	-
SDM 8	-	-	-	-	+	-
SDM 9	-	-	-	-	-	-
SDM 10	-	-	-	-	-	-
MZN 1	-	-	-	+	+	+
MZN 2	-	-	-	-	+	-
MZN 3	-	-	-	-	-	-
MZN 4	-	-	-	+	+	+
MZN 5	-	-	-	-	+	-
MZN 6	+	+	-	-	+	+
MZN 7	-	-	-	-	-	-
MZN 8	-	-	-	-	-	-
MZN 9	+	-	+	-	+	+
MZN 10	-	-	-	-	-	-
MZN 11	-	-	-	-	-	-
MZN 12	-	-	-	-	-	-
MZN 13	-	-	-	-	-	-
MZN 14	-	-	-	+	+	+
MZN 15	-	-	-	-	-	-
MZN 16	-	-	-	-	+	-

5.2.1. Degradación de Hexadecano.

La prueba de crecimiento en hexadecano se realizó con una metodología similar a la utilizada para el crecimiento en petróleo, se observó crecimiento de 9 cepas (Tabla 4).

Tabla 4: Crecimiento de las cepas en Hexadecano

CEPA	HEXADECANO		
EMB 1	-	-	-
EMB 2	-	-	-
EMB 3	-	-	-
EMB 4	-	-	-
EMB 5	-	-	-
EMB 6	-	-	-
EMB 7	+	+	-
SDM 1	+	-	+
SDM 2	-	-	-
SDM 3	-	-	-
SDM 4	-	-	-
SDM 5	-	-	-
SDM 6	+	-	-
SDM 7	-	-	-
SDM 8	+	+	-
SDM 9	-	-	-
SDM 10	-	-	-
MZN 1	+	+	+
MZN 2	+	+	+
MZN 3	-	-	-
MZN 4	-	-	+
MZN 5	+	+	+
MZN 6	+	+	+
MZN 7	-	-	-
MZN 8	-	-	-
MZN 9	-	-	-
MZN 10	-	-	-
MZN 11	-	-	-
MZN 12	-	-	-
MZN 13	-	-	-
MZN 14	-	-	-
MZN 15	-	-	-
MZN 16	+	-	-

5.2.2. Degradación de Antraceno.

En antraceno, solo se observó crecimiento de 10 cepas, EMB7, SDM1, SDM6, SDM8, MZN1, MZN2, MZN4, MZN5, MZN6, MZN16 (Tabla 5)

Tabla 5: Crecimiento de las cepas en Antraceno

CEPA	ANTRACENO		
EMB 1	-	-	-
EMB 2	-	-	-
EMB 3	-	-	-
EMB 4	-	-	-
EMB 5	-	+	-
EMB 6	-	-	-
EMB 7	+	+	+
SDM 1	-	+	-
SDM 2	-	-	-
SDM 3	-	-	-
SDM 4	-	-	-
SDM 5	-	-	-
SDM 6	-	+	-
SDM 7	-	-	-
SDM 8	-	-	-
SDM 9	-	-	-
SDM 10	-	-	-
MZN 1	+	+	+
MZN 2	+	-	-
MZN 3	-	-	-
MZN 4	+	+	-
MZN 5	-	-	-
MZN 6	+	+	+
MZN 7	-	-	-
MZN 8	-	-	-
MZN 9	+	+	+
MZN 10	-	-	-
MZN 11	-	-	-
MZN 12	-	-	-
MZN 13	-	-	-
MZN 14	+	-	+
MZN 15	-	-	-
MZN 16	+	+	+

5.2.3. Degradación de Criseno.

En criseno se observó el crecimiento de nueve cepas (Tabla 6). De estas cepas solo EMB7, MZN2, MZN4, MZN6 y MZN16 crecieron en los tres hidrocarburos.

Tabla 6: Crecimiento de las cepas en Criseno

CEPA	CRISENO		
EMB 1	-	-	-
EMB 2	-	-	-
EMB 3	-	-	-
EMB 4	-	-	-
EMB 5	+	+	-
EMB 6	-	-	-
EMB 7	+	-	-
SDM 1	-	-	-
SDM 2	-	-	-
SDM 3	-	-	-
SDM 4	-	-	-
SDM 5	-	-	-
SDM 6	-	-	-
SDM 7	-	-	-
SDM 8	+	-	-
SDM 9	-	-	-
SDM 10	-	-	-
MZN 1	-	-	-
MZN 2	+	-	-
MZN 3	-	-	-
MZN 4	-	+	-
MZN 5	-	+	-
MZN 6	+	+	-
MZN 7	-	-	-
MZN 8	-	-	-
MZN 9	-	-	-
MZN 10	-	-	-
MZN 11	-	-	-
MZN 12	-	-	-
MZN 13	-	-	-
MZN 14	+	+	-
MZN 15	-	-	-
MZN 16	-	+	-

5.3. Identificación Bioquímica.

Para la identificación bioquímica se trabajó solo con aquellas cepas que presentaban crecimiento en los derivados de hidrocarburos y se obtuvieron la identidad de las cepas (Tabla 7) tras el análisis del kit API 20NE con el software Apiweb (Tabla 8). Con el sistema Biolog se obtuvieron resultados para 12 de las 14 cepas que presentaban crecimiento en los derivados de hidrocarburos (Anexo 1).

Tabla 7: Resultados identificación bioquímica mediante API 20NE

CEPA	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ASI	MLT	CIT	PAC	OX
EMB5	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
EMB7	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
SDM1	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
SDM6	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
SDM7	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
SDM8	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
MZN1	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
MZN2	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
MZN4	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
MZN5	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MZN6	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
MZN9	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
MZN14	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
MZN16	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 8: Identidad de las 14 cepas degradadoras de hidrocarburos en base al kit API20NE.

CEPA	IDENTIFICACIÓN	ORDEN	FAMILIA
EMB 5	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadales	Aeromonadaceae
EMB 7	<i>Pseudomonas luteola</i>	Pseudomonadales	Pseudomonaceae
SDM 1	<i>Shewanella putrefaciens</i>	Alteromonadales	Shewanellaceae
SDM 6	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae
SDM 7	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae
SDM 8	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Aeromonadales	Aeromonadaceae
MZN 1	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Rhizobiales	Brucellaceae
MZN 2	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae
MZN 4	<i>Brevundimonas vesicularis</i>	Caulobacterales	Caulobacteraceae
MZN 5	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	Flavobacteriales	Flavobacteriaceae
MZN 6	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae
MZN 9	<i>Photobacterium damsela</i>	Vibrionales	Vibrionaceae
MZN 14	<i>Oligella ureolytica</i>	Burkholderiales	Alcaligenaceae
MZN 16	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	Sphingomonadales	Sphingomonadaceae

5.4. Identificación Molecular.

Las cepas identificadas bioquímicamente se realizó una identificación molecular preliminar, para esto se trabajó con cultivos frescos en medio líquido con los cuales se realizó una extracción de ADN, obteniéndose extractos de las 14 cepas ya seleccionadas.

Por problemas de tiempo solo fue posible realizar amplificaciones a las cepas SDM6, SDM7, MZN2, MZN5, MZN6, MZN14 y MZN16. Las cuales fueron amplificadas utilizando los primer y temperaturas ya reportadas.

Se obtuvo una amplificación exitosa de 2 cepas, SDM6 y MZN14 observándose los fragmentos esperados a 1300pb (Tasic et al. 2012). La cepa MZN2, con un fragmento de 858pb (Kaiser et al. 2009) y MZN6 con un fragmento de 312pb (Leys et al, 2004) fueron amplificadas, pero con una intensidad menor y las cepas SDM7, MZN5 y MZN16 no pudieron ser amplificadas con los primer y condiciones utilizados (Figura 6).



Figura 5: Imagen del gel de agarosa, se observa una amplificación de las cepas SDM6, MZN14, MZN6 y MZN2 (Flechas Blancas), reveladas con luz UV.

6. *Discusión.*

De las 33 cepas iniciales se obtuvieron 14 cepas capaces de crecer en medios enriquecidos con petróleo, aunque el petróleo utilizado en este estudio no fue el mismo que fue derramado en la Bahía de Quintero, no se descarta la posibilidad de que el bajo número de cepas que presentaron crecimiento en los diferentes crudos sea producto de las diferencias en las composiciones de los crudos utilizados.

Al ser probadas en medio enriquecido con hexadecano, se observó el crecimiento de 9 de las 14 cepas. Mientras que al utilizar un medio con antraceno solo se observó el crecimiento de 8 cepas, de las cuales, solo 5 cepas son capaces de crecer en ambos medios. En criseno solo se observó el crecimiento de 9 cepas, siendo solamente 5 capaces de crecer en los tres hidrocarburos probados, (EMB7, MZN2, MZN4, MZN6 y MZN16); estas son de gran importancia debido a la alta toxicidad y baja biodegradabilidad que presentan los hidrocarburos aromáticos y aunque se desconocen la tasa a la cual se degradan estos hidrocarburos por parte de las cepas aisladas, este resultado es significativo para su posible uso en procesos de biorremediación.

Las identificaciones con el kit API20NE fueron consistentes con lo esperado, encontrándose múltiples posibles identidades que han sido previamente (según la literatura) aisladas de ambientes contaminados con petróleo y descritas como degradadoras de uno o más tipos de hidrocarburos.

Las cepas de *Aeromonas hydrophila* (EMB 5 y SDM 8) han sido previamente reportada como capaz de crecer en medios con hexadecano, tolueno, propil-benceno y terbutil-benceno como única fuente de carbono (Kaczorek et al. 2010) mientras que las cepas EMB 5 aislada no presentó crecimiento en hexadecano y presentó crecimiento en antraceno, la cepa SDM 8 presenta crecimiento en hexadecano pero no en antraceno, lo cual no es consistente si es que ambas cepas corresponden a la misma especie.

Las cepas de *Pseudomonas lutea* (EMB7) pertenecen a un género que ha sido descrito anteriormente como degradador de hidrocarburos, especialmente *Pseudomonas aeruginosa* la cual además es productora de biosurfactante (Das et al, 2007, Chaineau et al. 1999, Dagher et al. 1997), EMB 7 presentó crecimiento en todos los hidrocarburos utilizados.

Shewanella putrefaciens (SDM 1) es una especie bacteriana encontrada como resultado de derrames de petróleo y está implicada en su degradación en condiciones anaeróbicas (Martin-Gil et al, 2004), aunque presentó crecimiento en las condiciones utilizadas, no se cultivaron en condiciones anaeróbicas, lo que podría explicar el bajo crecimiento en crudo de petróleo (presentando crecimiento solo en un cultivo con el crudo 2).

Chryseobacterium meningosepticum (SDM 6) y *Chryseobacterium indologenes* (MZN 5) ha sido previamente aislado desde suelos contaminados con petróleo (Szoboszlay et al. 2008), SDM 6 fue la única cepa capaz de crecer en todos los cultivos de ambos crudos utilizados y solo fue capaz de degradar hexadecano y no los hidrocarburos aromáticos.

Stenotrophomonas maltophilia (SDM 7 y MZN2), *Ochrobactrum anthropi* (MZN 1) y *Brevundimonas vesicularis* (MZN 4) (Chaîneau et al. 1999) también han sido descritas como degradadoras de petróleo y derivados tanto aromáticos como alifáticos (Van Hamme et al. 2000) SDM 7 fue incapaz de crecer en los tres derivados de hidrocarburos utilizados mientras que, si lo hicieron MZN 2 y MZN4, por esto SDM 7 y MZN 2 no corresponderían a la misma especie, esto se pudo comprobar mediante Biolog, ya que presentaron perfiles bioquímicos diferentes.

Shingomonas paucimobilis (MZN 6 y MZN 16) ha sido descrita como degradadora de HAP y previamente aislada desde muestras de suelos contaminados con hidrocarburos (Ye et al. 1995, Chaîneau et al. 1999) lo que es consistente con lo obtenido, ya que tanto MZN 6 y MZN 16 presentaron crecimiento en todos los hidrocarburos utilizados, pero presentan morfologías y perfiles bioquímicos diferentes.

Photobacterium damselae (MZN 9) ha sido descrito como productora de biofilm y degradadora de anilina, un hidrocarburo aromático (Kafilzadeh et al, 2013), esto es consistente con lo encontrado mediante el método de cultivo utilizado, pero llama la atención la presencia de cepas que previamente han sido aisladas de ambientes terrestres y no marinos como son las encontradas en este trabajo.

No hay reportes previos de *Oligella ureolytica* (MZN 14) como degradadora de petróleo o los derivados de hidrocarburos utilizados en este estudio, por el contrario, la cepa MZN 14 presentó crecimiento solo en hidrocarburos aromáticos, además esta especie es generalmente aislada de muestras de orina humana, lo cual puede ser signo de contaminación en la zona de donde se tomaron las muestras.

7. Conclusión.

De las 33 bacterias aisladas desde las muestras de agua empetrolada obtenida desde la bahía de Quintero, el 21,4% corresponde a bacterias Gram + y 78,6% a Gram -, 64,5% presentan morfología bacilar y 35.5% son cocos.

Se encontraron 14 cepas (42,42% de las cepas totales) capaces utilizar derivados de hidrocarburos como única fuente de carbono, del total de cepas que crecieron en el crudo de petróleo, 9 degradan hexadecano (64,3%), 9 criseno (64,3%), y 8 antraceno (57,1%), mientras que solo 5 (35,7%) degradan los 3 derivados utilizados.

Se pudo identificar bioquímicamente cepas que previamente se han reportado como degradadoras de hidrocarburos, dentro de las cuales *Chryseobacterium* y *Sphingomona* han sido descritas como un buen potencial para biorremediación.

8. Proyecciones.

Con las cepas analizadas se puede estudiar su capacidad de degradar otros derivados de hidrocarburos de interés, establecer sus tasas de degradación de hidrocarburos y los productos de degradación, determinar los efectos de antagonismo que pudieran o no afectar el proceso biodegradativo para así ser propuestas como potenciales candidatas para efectuar procesos de bioremediación en ambientes marinos.

9. Bibliografía.

- Das, N., & Chandran, P. (2010). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
- Edmo M. Rodrigues, Karlos H.M. Kalks, Marcos R. Tótola, Prospect, isolation, and characterization of microorganisms for potential use in cases of oil bioremediation along the coast of Trindade Island, Brazil, *Journal of Environmental Management*, Volume 156, 1 June 2015, Pages 15-22
- Hassanshahian, M., Ahmadinejad, M., Tebyanian, H., Kariminik, A., 2013. Isolation and characterization of alkane degrading bacteria from petroleum reservoir waste water in Iran (Kerman and Tehran provenances). *Mar. Pollut. Bull.* 73, 300–305.
- Head, I.M., Jones, D.M., Roling, W.F., 2006. Marine microorganisms make a meal of oil. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 173–182.
- Jiang Z, Huang Y, Xu X, Liao Y, Shou L, Liu J, et al. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. *Acta Ecologica Sinica* 2010; 30:8–15.
- Mehdi Hassanshahian, Giti Emtiazi, Simone Cappello, Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from the Persian Gulf and the Caspian Sea, *Marine Pollution Bulletin*, Volume 64, Issue 1, January 2012, Pages 7-12.
- Moody J.D, Freeman J.P., Doerge D.R., Cerniglia C.E. Degradation of phenanthrene and anthracene by cell suspensions of *Mycobacterium* Sp. Strain PYR-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1476, 2001.
- Mouna Mahjoubi, AtefJaouani, Amel Guesmi, Sonia Ben Amor, Ahlem Jouini, Hanen Cherif, Afef Najjari, Abdellatif Boudabous, Nedra Koubaa, Ameer Cherif, Hydrocarbonoclastic bacteria isolated from petroleum contaminated sites in Tunisia: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential, *New Biotechnology*, Volume 30, Issue 6, 25 September 2013, Pages 723-733, ISSN 1871-6784.
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., & Labuzek, S. (2003). Bacterial Degradation and Bioremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Polish Journal of Environmental Studies*, 12(1).

- Liu, Haijun, Yao, Jun, Yuan, Zhimin, Shang, Yifan, Chen, Huilun, Wang, Fei, Masakorala, Kanaji, Yu, Chan, Cai, Minmin, Blake, Ruth E., Choi, Martin M.F. (2014). Isolation and characterization of crude-oil-degrading bacteria from oil-water mixture in Dagang oilfield, China. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 87, 52-59.
- Teramoto M., Queck SY, Ohnishi K. Specialized Hydrocarbonoclastic Bacteria Prevailing in Seawater around a Port in the Strait of Malacca. *PLoS ONE*, v8 Issue 6. 2013.
- W. Fritsche and M. Hofrichter, "Aerobic degradation by microorganisms," in *Environmental Processes- Soil Decontamination*, J. Klein, Ed., pp. 146–155, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2000.
- R. R. Colwell, J. D. Walker, and J. J. Cooney, "Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment," *Critical Reviews in Microbiology*, vol. 5, no. 4, pp. 423–445, 1977.
- Al-Hadhrami, M.N., Lappin-Scott, H.M., Fisher, P.J., 1996. Effects of the addition of organic carbon sources on bacterial respiration and n-alkane biodegradation of Omani crude oil. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 351–357
- Luigi, M., Gaetano, D.M., Vivia, B., Angelina, L.G., 2007. Biodegradative potential and characterization of psychrotolerant polychlorinated biphenyl-degrading marine bacteria isolated from a coastal station in the Terra Nova Bay (Ross Sea, Antarctica). *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1754–1761
- Arulazhagan, P., Vasudevan, N., 2009. Role of a moderately halophilic bacterial consortium in the biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 256–262.
- Patel, V., Patel, J., Madamwar, D., 2013. Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard. *Mar. Pollut. Bull.* 74, 199–207.
- Chen, J., Wong, M.H., Wong, Y.S., Tam, N.F.Y., 2008. Multi-factors on biodegradation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs) by *Sphingomonas* sp. a bacterial strain isolated from mangrove sediment. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 695– 702

- Hou, D., Shen, X., Luo, Q., He, Y., Wang, Q., Liu, Q., 2012. Enhancement of the diesel oil degradation ability of a marine bacterial strain by immobilization on a novel compound carrier material. *Mar. Pollut. Bull.* 67, 146–151.
- Song, X., Xu, Y., Li, G., Zhang, Y., Huang, T., Hu, Z., 2011. Isolation, characterization of *Rhodococcus* sp. P14 capable of degrading high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons and aliphatic hydrocarbons. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2122–2128.
- Banat I. M., Franzetti A., Gandolfi I., Bestetti G., Martinotti M. G., Fracchia L., et al. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 427–444. 10.1007/s00253-010-2589-0
- McMurry J. 2008, *Química Organica*, 7a edición, Cengage Learning Editores S.A. Capítulo 3, Pag 73-98.
- Primo Yúfera, E., *Química organica basica y aplicada: de la molecula a la industria*. Editorial Reverté, 1994. Capítulo 12, Pag 231-237.
- Enciclopedia Hispánica, Editorial Barsa Planeta, Inc. Volumen 11. 2001, Pagina 380-383.
- Madigan, N., Martinko, J., Parker. J., Brock, T., Fernandez, C., Pérez, M. Editorial Pearson Educación, 2004, Pag 137-145.
- E. Kaczorek, M. Urbanowicz, A. Olszanowski, The influence of surfactants on cell surface properties of *Aeromonas hydrophila* during diesel oil biodegradation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Volume 81, Issue 1, 1 November 2010, Pages 363-368.
- Martin-Gil, J., Ramos-Sánchez, M. C., & Martin-Gil, F. J. (2004). *Shewanella putrefaciens* in a fuel-in-water emulsion from the Prestige oil spill. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 86(3), 283-285.
- Szoboszlay, S., Atzel, B., Kukolya, J., Toth, E. M., Marialigeti, K., Schumann, P., & Kriszt, B. (2008). *Chryseobacterium hungaricum* sp. nov., isolated from hydrocarbon-contaminated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 58(12), 2748-2754.
- Van Hamme, J. D., Odumeru, J. A., & Ward, O. P. (2000). Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. *Canadian journal of microbiology*, 46(5), 441-450.

- Chaîneau, C. H., Morel, J., Dupont, J., Bury, E., & Oudot, J. (1999). Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 227(2), 237-247.
- Ye, D., Siddiqi, M. A., Maccubbin, A. E., Kumar, S., & Sikka, H. C. (1995). Degradation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Sphingomonas paucimobilis*. *Environmental science & technology*, 30(1), 136-142.
- Dagher, F., Deziel, E., Lirette, P., Paquette, G., Bisailon, J. G., & Villemur, R. (1997). Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Canadian journal of microbiology*, 43(4), 368-377.
- Tasić, S., Kojić, M., Stanković, S., & Obradović, D. (2012). Identification and molecular characterization of *Chryseobacterium vrystaatense* ST1 isolated from oligomineral water of southeast Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 64(3), 877-883.
- Kaiser, S., Biehler, K., & Jonas, D. (2009). A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *Journal of bacteriology*, 191(9), 2934-2943.
- Leys, N. M., Ryngaert, A., Bastiaens, L., Verstraete, W., Top, E. M., & Springael, D. (2004). Occurrence and phylogenetic diversity of *Sphingomonas* strains in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 1944-1955.
- Shao, Z., & Wang, W. (2013). Enzymes and genes involved in aerobic alkane degradation. *Frontiers in microbiology*, 4, 116.
- Ghosal, D., Ghosh, S., Dutta, T. K., & Ahn, Y. (2016). Current State of Knowledge in Microbial Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HAPs): A Review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1369. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01369>
- Das, K., & Mukherjee, A. K. (2007). Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource technology*, 98(7), 1339-1345.
- Kafilzadeh, F., Nejad, R. A., & Nejad, F. M. (2013). Isolation and identification of aniline degrading bacteria from sediments of Kharg island in Persian Gulf. *European Journal of Experimental Biology*, 3(3), 454-460.

Anexo

Anexo 1: Resultados Biolog

	EMB5	EMB7	SDM1	SDM6	SDM7	SDM8	MZN1	MZN2	MZN6	MZN9	MZN14	MZN16
Water	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -Cyclodextrin	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
Tween 40	-	-	-	+	/	+	-	+	/	+	-	+
Tween80	-	-	-	-	-	+	-	+	/	+	-	+
N-Acetyl-D-Galactosamine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N-acetyl-D-glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	+	-	/	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	+
L-arabinose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
D-cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
L-erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
D-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
L-fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
D-galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Gentiobiose	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
α -D-glucose	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-
m-inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
α -D-lactose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Lactulose	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Maltose	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-
D-mannitol	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
D-Mannose	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
D-Melibiose	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
b-Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
D-Psicose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
D-Sorbitol	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
Sucrose	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
D-Trehalose	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Turanose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Methyl Pyruvate	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Mono-Methyl-Succinate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

<i>Acetic Acid</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cis-Aconitic Acid</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Citric Acid</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>Formic Acid</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>D-Galactonic Acid Lactone</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D-Galacturonic Acid</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>D-Gluconic Acid</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>D-Glucosaminic Acid</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>D-Glucuronic Acid</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>α-Hydroxy Butyric Acid</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>β-Hydroxy Butyric Acid</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>γ-Hydroxy Butyric Acid</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>p-Hydroxy Phenylacetic Acid</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Itaconic Acid</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>α-Keto Butyric Acid</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>α-Keto Glutaric Acid</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>α-Keto Valeric Acid</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>D,L-Lactic Acid</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
<i>Malonic Acid</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Propionic Acid</i>	+	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-
<i>Quinic Acid</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>D-Saccharic Acid</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Sebacic Acid</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Succinic Acid</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>Bromo Succinic Acid</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Succinamic Acid</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glucoranamide</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L-Alaninamide</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>D-Alanine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>L-Alanine</i>	-	-	-	+	-	-	-	/	+	+	-	-
<i>L-Alanyl-glicine</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>L-Asparagine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>L-Aspartic Acid</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>L-Glutamic Acid</i>	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>Glycyl-L-Aspartic Acid</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Glycyl-L-Glutamic Acid</i>	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>L-Histidine</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>Hydroxy-L-Proline</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>L-Leucine</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>L-Ornithine</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+

<i>L-Phenylalanine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>L-Proline</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>L-Pyrogutamic Acid</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>D-Serine</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>L-Serine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>L-Threonine</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>D,L-Camitine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>γ-Amino Butyric Acid</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Urocanic Acid</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>Inosine</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Uridine</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Thymidine</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Phenyethylamine</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Putrescine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>2-Aminoethanol</i>	-	/	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>2,3-Butanediol</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glycerol</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>D,L- α -Glycerol Phosphate</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Glucose-1-Phosphate</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Glucose-6-Phosphate</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-