

## Aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa* potencialmente degradadoras de crudo de petróleo, provenientes de suelos en talleres de automóviles en el Norte Chico

Isolation and identification of *Pseudomonas aeruginosa* potentially degrader of crude oil, from soils in car workshops in North Chico

Jean Piere Jesús Quiliche-Duran<sup>1</sup>, Anthony Apolinario Cortez Lázaro<sup>1</sup>, Pedro Manuel Rodríguez Grados, Mishel Zaori Silva Vergara<sup>1</sup>, Luis Alberto Huayna Dueñas<sup>1</sup>

### RESUMEN

**Objetivo:** Aislar e identificar *Pseudomonas aeruginosa* procedentes de suelo en talleres de automóviles para posteriormente determinar su actividad emulsificante y degradativa en crudo de petróleo. **Métodos:** Investigación básica y diseño de investigación no experimental, se realizó un muestreo no probabilístico y aleatorio sistemático en 10 talleres de automóviles que presentaran suelos contaminados con hidrocarburos, se usó una suspensión de suelo extraído en solución salina 0,85% para luego realizar una serie de sembrados en medios de cultivo comunes, selectivos y pruebas bioquímicas, por último se realiza las pruebas de actividad emulsificante de la bacteria degradadoras de petróleo y se determinara la actividad degradativa. **Resultados:** De los talleres analizados se aisló en 5 *P. aeruginosa*: MBAT-1, MBAT-2, MHCT-1, MHCT-2 y MSTT-1, observan que las bacterias que presentan mayor actividad emulsificante y degradativa en crudo de petróleo son: MBAT-2 y MHCT-2. **Conclusion:** Se aislaron e identificaron un total 5 *P. aeruginosa* en talleres de automóviles, se determinó su actividad emulsificante y degradativa en crudo de petróleo indicando que las de mayor en ambos casos fueron MBAT-2 y MHCT-2, por lo cual son capaces degradar el crudo de petróleo de una manera más relevante que MBAT-1, MHCT-1 y MSTT-1.

**Palabras clave:** Crudo, petróleo, emulsión, *Pseudomonas aeruginosa*.

### ABSTRACT

**Objective:** Isolate and identify *Pseudomonas aeruginosa* from soils in car workshops to subsequently to determine their emulsifier and degradative activity in crude oil. **Methods:** Basic research and non-experimental research design, with a systematic non-probabilistic and random sampling was performed in 10 car workshops. They presented hydrocarbon contaminated soils, and used a soil suspension extracted in saline solution 0.85% then make a series of sowings in common culture media, selective and biochemical tests. Finally, was performed the emulsifying activity tests of oil degrader bacteria and determined the degradative activity. **Results:** Of the workshops analyzed was isolated in 5 *P. aeruginosa*: MBAT-1, MBAT-2, MHCT-1, MCP-2 and MHCT-1. Then, observed that bacterias have a higher emulsifier and degradative activity in crude oil are MBAT-2 and MHCT-2. **Conclusion:** Isolated and identified a total five *P. aeruginosa* in car workshops, the emulsifier and degradative activity was determined in crude oil higher indicating that in both cases were MBAT-2 and MHCT-2, which are capable of degrading the crude oil in a more relevant way that MBAT-1, MHCT-1 and MSTT-1.

**Keywords:** Crude, petroleum, emulsion, *Pseudomonas aeruginosa*

<sup>1</sup> Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión. Huacho, Perú.

## INTRODUCCIÓN

El Norte Chico es una zona de la Costa del departamento de Lima. Está comprendido por las provincias norteñas de Lima, como Huaura, Barranca y Huaral de las cuales estas están conformadas por Barranca, Pativilca, Huacho, Paramonga, Santa María, etc.

El Sector Transporte es el mayor consumidor de derivados de petróleo en el país, y el principal emisor de CO y CO<sub>2</sub> a la atmósfera. En las últimas décadas, el automóvil ha aparecido de forma masiva en las ciudades, contribuyendo a incrementar los problemas de contaminación atmosférica como consecuencia de los gases contaminantes (Valdeglesias, 2007).

La industria petroquímica es importante en una sociedad moderna, no obstante la falta de un programa de protección ambiental, hace que el medio ambiente se contamine al producirse derrame de petróleo, principalmente de crudo, por un deterioro de los oleoductos, descargas de efluentes contaminados, afloramientos naturales a través de fisuras de la corteza terrestre y debido a la producción, transporte y almacenamiento de este recurso natural (Von Wedel *et al.*, 1998).

En el caso del suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmosfera, iniciando una serie de procesos fisicoquímicos 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. Además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, lo que dificulta su tratamiento, debido a que altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados (Restrepo, 2002); (Sivakumaran, Clothier y McNaughton, 2004).

La problemática actual de los sitios contaminados con hidrocarburos, es que hasta hace pocos años, prácticamente no existía una

conciencia del grado de dificultad y del enorme costo de la remediación de suelos, cuerpos de agua y atmósfera contaminados, lo que representa hoy para la sociedad un gran costo económico (Schmidt, 2000).

Hoy en día, a nivel mundial se cuenta con diversas técnicas biológicas con el fin de proporcionar alternativas de descontaminación de zonas impactadas en suelo, aire y agua. La biorremediación es un proceso de descontaminación que emplea una serie de reacciones bioquímicas por una población o consorcios de microorganismos inoculados en la zona contaminada, para convertir la estructura de los hidrocarburos en componentes menos tóxicos (Benavides, Quintero y Ostos, 2006).

Los microorganismos que biodegradan hidrocarburos del petróleo, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos incluyendo naftaleno, hidrocarburos aromáticos como tolueno, o hidrocarburos alifáticos como n-alcenos, son aislados del medioambiente, particularmente de sitios contaminados con petróleo. Algunas de las rutas metabólicas microbianas responsables de la degradación, incluyendo las rutas *alk* (C<sub>5</sub> a C<sub>12</sub> n-alcenos), *nah* (naftaleno) y *xyl* (tolueno) han sido ampliamente caracterizadas; están generalmente relacionadas con plásmidos catabólicos encontrados en *Pseudomonas spp.*, por ejemplos los plásmidos OCT, NAH y TOL. (Sayler, Hooper, Layton y King, 1990); (Whyte, Bourbonniere y Greer, 1997).

La *P. aeruginosa*, es uno de los microorganismos más usado y estudiado en biorremediación y presenta una serie de actividades naturales sobre xenobióticos. Lamentablemente, también es conocida por ser un patógeno oportunista en humanos y causante de complicaciones graves en personas inmunosuprimidas, con quemaduras severas o con fibrosis quística (Rockne *et al.*, 2000).

La hipótesis fue: en los suelos contaminados de los talleres de reparación de automóviles hay presencia de *P. aeruginosa*, a partir de las cuales son capaces de degradar crudo de

petróleo y cómo objetivo es aislar e identificar *P. aeruginosa* procedentes de suelo en talleres de automóviles para posteriormente determinar su actividad emulsificante y degradativa en crudo de petróleo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un muestreo no probabilístico y aleatorio sistemático de 10 talleres de automóviles donde se observe suelos de color negro causado por hidrocarburos dentro de provincias del Norte chico, lo primero que se hizo fue medir la longitud de la zona de muestreo y se extrajo a partir de la base del suelo una profundidad de 5 cm en un intervalo de tiempo de 5 a 10 minutos obteniendo 100 gramos de la muestra colectadas en una bolsa de polietileno hasta llegar al laboratorio Multifuncional de Biología donde se realizó el trabajo de investigación. Se muestra la Tabla 1 que representa el código por cada muestra por taller.

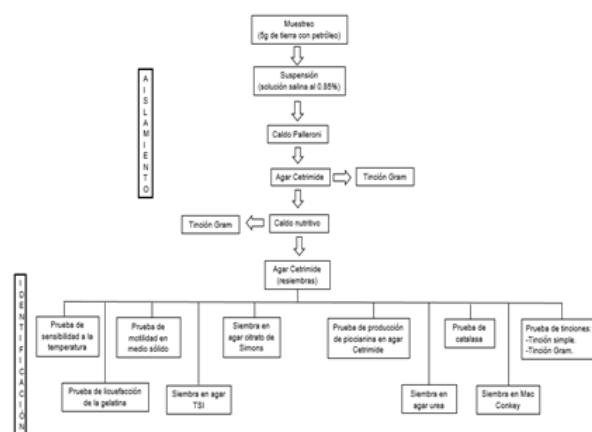
**Tabla 1.** Referencia de código de muestra por provincia

Provincia	Código propuesto
Barranca	MBAT-1
Barranca	MBAT-2
Pativilca	MPTT-1
Pativilca	MPTT-2
Huacho	MHOT-1
Huacho	MHOT-2
Paramonga	MPGT-1
Paramonga	MPGT-2
Santa María	MSTT-1
Santa María	MSTT-2

MBAT: Muestra Barranca taller. MPGT: Muestra Paramonga taller.  
MPTT: Muestra Pativilca taller. MSTT: Muestra Santa María taller.  
MHOT: Muestra Huacho taller.

El método de aislamiento propuesto por Merino (1998) para aislar bacterias degradadoras y emulsificante de petróleo. Para lo cual se

suspendió, 5 gramos de tierra en una solución salina al 0,85%, se sembró en un caldo Palleroni en una incubadora orbital con agitación de 150 rpm. Se incubó las muestras hasta 48 horas. Transcurrido el tiempo para el aislamiento de bacterias se procedió a sembrar por estrías en placas que contenían Agar Cetrimide a partir de Caldo Palleroni. Se incubó las placas a 30 °C por 48 horas. Transcurridas las 48 horas, se procedió a sembrar las cepas en caldo nutritivo incubarlas nuevamente a 30 °C por 48 horas. Se realizaron resiembras en agar nutritivo para obtener la *P. aeruginosa* pura. Luego se prosiguió a realizar pruebas para identificación de la bacteria tales como la de sensibilidad a la temperatura, prueba de motilidad en medio sólido, prueba de producción de pirocianina en agar Cetrimide, prueba de catalasa, prueba de licuefacción de la gelatina, siembra en agar Mac Conkey, siembra en agar citrato de Simons, siembra en agar urea, siembra en agar TSI y también se aplicó tinciones simple con azul de metileno y Gram. Con esto se cerciora que estamos frente a *P. aeruginosa*. (Figura 1)



**Figura 1.** Flujograma para el aislamiento e identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

### **Actividad emulsificante de las bacterias degradadoras de petróleo**

Se realizó según la metodología propuesta por Goldman, Shabtai, Rubinovitz, Rosenberg, y Gutnick, (1982). Se procesaron cinco cepas de bacterias de diez muestreos, para evaluar la capacidad que tienen de producir emulsificantes de petróleo en agua. Se empleó el Medio Mínimo de Goldman et al. (1982), al cual se le adiciono extracto de levadura al 3%. Se esterilizo a 121 °C por quince minutos, excepto el etanol, el cual fue agregado posteriormente en condiciones de esterilidad.

Las cepas bacterianas se reactivaron en 2 ml de caldo nutritivo y se les incubo a 37 °C por 24 horas. Luego se repartico en matraces de 100ml, 18ml de medio Mínimo de Goldman et al. (1982) con extracto de levadura al 3%. Se adiciono después los 2 ml de cultivo. Los matraces se incubaron a 30 °C por 72 horas en agitación constante. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a centrifugar el cultivo a 5000 rpm por 30 minutos.

Se obtuvieron 10 ml del sobrenadante en tubos de prueba de 16x150 mm, previa decantación luego se le agregó a cada tubo con sobrenadante de 0,2 ml de petróleo crudo y se agito manualmente por 5 minutos. Se trasvasaron 5 ml de la preparación anterior a tubos Spectronic de 13x100 mm para la lectura de la absorbancia a 540 nm de longitud de onda.

El blanco fue un tubo conteniendo el medio de cultivo sin inoculación y se procedió de la misma forma que con 5 muestras. La absorbancia leída se convirtió en unidades de actividad emulsificante por mililitro (UAE/ml), siendo 0,816 de absorbancia equivalente a una unidad de actividad emulsificante por mililitro.

### **Determinación de la actividad degradativa de las cepas bacterianas.**

La actividad degradativa sobre el petróleo se evaluó según la metodología de Mills, Breuil, y Colwell (1978). Las cepas bacterianas se reactivaron en Caldo nutritivo y se les incubo a 30 °C por 12 horas. Se utilizó el Medio Mineral propuesto por Mills et al. (1978), al cual se le añadió crudo de petróleo como única fuente de carbono.

Se repartieron 9 ml, del medio en tubos y se le añadió 1ml de cultivo, incubando por 30 días a temperatura ambiente. El crecimiento se midió por la turbidez visible en el medio de cultivo. Se consideró como blanco negativo un tubo conteniendo los componentes de medio descrito sin inoculación. Las lecturas se hicieron tomando en cuenta que una turbidez de dos (2+), equivalente a una población superior da  $6 \times 10^8$  m.o/ml, en la escala de turbidimetria de Mc Farland, corresponde a un crecimiento regular, una turbidez de tres (3+) con una población superior a  $9 \times 10^8$  m.o/ml, equivale a un crecimiento bueno, y una turbidez de cinco (5+) con una población superior a  $15 \times 10^8$  m.o/ml, igual a un crecimiento muy bueno.

## **RESULTADOS**

### **Aislamiento:**

Evaluación de presencia o ausencia de *Pseudomonas* se sustentó en el aislamiento de las bacterias, de las 10 muestras recogidas se encontró presencia en 5 de los talleres de automóviles *Pseudomonas sp.*

Presencia: MBAT-1, MBAT-2, MHCT-1, MHCT-2 y MSTT-1.

### **Identificación**

De las 5 *Pseudomonas sp.* se determinó que son *P. aeruginosa* como se indica en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Pruebas bioquímicas para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa*.

ENSAYOS Código	RESULTADOS				
	MBAT-1	MBAT-2	MHCT-1	MHCT-2	MSTT-1
Prueba de sensibilidad a l temperatura(42 °C)	+	++	++	+++	+
Prueba con agar urea	+	+	+	+	+
Prueba con motilidad en medio solido	+	+	+	+	+
Prueba de producción de piocianina	+	+	+	+	+
Prueba de catalasa	+	+	+	+	+
Prueba de licuefacción de la gelatina	+	+	+	+	+
Siembra en agar citrato de Simons	+	+	+	+	+
Siembra en agar TSI	K/K	K/K	K/K	K/K	K/K
Siembra en agar Mac Conkey	Colonias de color blanco	Colonias de color blanco	Colonias de color blanco	Colonias de color blanco	Colonias de color blanco
Tinción Gram	Bacilo Gram negativos	Bacilo Gram negativos	Bacilo Gram negativos	Bacilo Gram negativos	Bacilo Gram negativos
Tinción simple	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo

### Actividad emulsificante de las bacterias degradadoras de petróleo

Según la prueba de actividad emulsificante,

estuvo entre 1,02 UAE/ml y 2,75 UAE/ml.

En la Tabla 3 se observan que las bacterias que presentan mayor actividad emulsificante son: MBAT-2 y MHCT-2.

**Tabla 3.** Actividad emulsificante de las bacterias degradadoras de petróleo.

N°	Código	Lectura a 540nm	Actividad emulsificante(UAE/mL)
1	MBAT-1	0,8649	1,06
2	MBAT-2	21,950	2,69
3	MHCT-1	12,321	1,51
4	MHCT-2	22,440	2,75
5	MSTT-1	0,8323	1,02

## Determinación de la actividad degradativa de las cepas bacterianas.

La actividad degradativa de las cepas bacterianas fue entre regular (+2) y buena (+3). Tabla 4.

**Tabla 4.** Actividad degradativa de las cepas bacterianas

N°	Código	Actividad degradativa
1	MBAT-1	2
2	MBAT-2	3
3	MHCT-1	2
4	MHCT-2	3
5	MSTT-1	2

## DISCUSIÓN

Silva et al. (2008) sustenta que las comunidades microbianas en áreas contaminadas son dominadas por los organismos capaces de utilizar o sobrevivir a compuestos tóxicos, como los ambientes contaminados con hidrocarburos, tal es el caso del género *Pseudomonas*. La *P. aeruginosa* ha sido identificada como un género destacado en diversos procesos de degradación (Röling, Head y Larter, 2003) y es la que con mayor frecuencia se aísla de ambientes contaminados con hidrocarburos.

Exactamente esta *P. aeruginosa* fue nuestro interés debido a que era la más estudiada y frecuente, se aisló suelos contaminados con hidrocarburos, pero cabe acotar que hay más especies representativas que han sido aisladas de sedimentos como *Pseudomonas oleovorans*, *Pseudomonas synxatha*, *Pseudomonas reactans* (Liu, et al. 2010) y *Pseudomonas putida* (Zahed, Aziz, Isa, Mohajeri, y Mohajeri, 2010) que tan bien amerita hacer estudios de emulsión y degradación de crudo de petróleo.

Bailón, González, y Cervantes (2003) plantearon en su libro "Pruebas bioquímicas para bacteria" pruebas bioquímicas propias para el género *Pseudomonas* tales como:

prueba de motilidad en medio sólido, prueba de catalasa, prueba de licuefacción de la gelatina, siembra en agar citrato de Simons, siembra en agar urea, siembra en agar TSI.

Entre todas ellas nos faltó realizar una prueba típica para el reconocimiento de este género que fue la prueba oxidasa, teniendo en cuenta que las otras pruebas para identificarlas si se realizaron y se obtuvieron los resultados esperados.

Merino (1998), en su estudio determina que las cepas: *P. aeruginosa* KT1-1 y *Serratia rubidae*, son los microorganismos con mayor capacidad emulsificante y degradativa así mismo Dagher et al. (1997), realizaron un estudio en el que llegaron a la conclusión de que *P. aeruginosa* y *Sphingomonas* sp. Degradan con mayor eficacia hidrocarburos aromáticos.

Por tanto se puede afirmar que nuestros aislados de *P. aeruginosa* presentan una gran expectativa en el campo de degradación de hidrocarburos, cuya actividad degradativa y actividad emulsificante son relevantes en este campo.

## AGRADECIMIENTO

Nuestro sincero agradecimiento al docente de la Escuela Profesional de Biología con mención en Biotecnología José Luis Romero Bozzetta por su apoyo en el transcurso de la investigación y también a la Facultad de Medicina Humana - Laboratorio de Microscopía por los servicios prestados.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Bailón, L., González, R. & Cervantes, A. (2003). *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias*. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
- Benavides, L. J., Quintero, G. & Ostos, O. (2006). Aislamiento e identificación de diez Bacterias desnitrificantes a partir de un suelo Agrícola contaminado con abonos nitrogenados proveniente de una finca productora de cebolla. *Nova-Publicación Científica*, 4(6), 50-54.

- Dagher, F., Deziel, E., Lirette, P., Paquette, G., Bisaillon, 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.
- Goldman, S., Shabtai, Y., Rubinovitz, C., Rosenberg, E. & Gutnick, D. L. (1982). Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: distribution of cell-free and cell-associated cross-reacting material. *Applied and environmental microbiology*, 44(1), 165-170.
- Merino, F. (1998). *Estudio de microorganismos nativos productores de Emulsificantes de Petróleo*. Tesis para la obtención del Título de Magister en Biotecnología. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Mills, A. L., Breuil, C. & Colwell, R. R. (1978). Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(5), 552-557.
- Silva, R. M. P., Pozo, M. I. C., de Oca, J. M. G. M., Rodríguez, A. Á., Viñas, M. & Moreno, D. C. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 39(1), 44-51.
- Restrepo, R. (2002). Derrame de hidrocarburos. Impacto en los ecosistemas tropicales. *ECOPETROL Instituto Colombiano de Petróleo*.
- Rockne, K. Chee-Sanford, J., Sanford, R., Brian, P., James, T. & Staleyand, S. (2000). Anaerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate reducing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1595-1601.
- Röling, W. F., Head, I. M. & Larter, S. R. (2003). The microbiology of hydrocarbon degradation in subsurface petroleum reservoirs: perspectives and prospects. *Research in Microbiology*, 154(5), 321-328.
- Sayler, G. S., Hooper, S. W., Layton, A. C. & King, J. H. (1990). Catabolic plasmids of environmental and ecological significance. *Microbial Ecology*, 19(1), 1-20.
- Schmidt, W. (2000). Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible. *Corporación técnica alemana (GTZ)*.
- Sivakumaran, S., Clothier, B. & McNaughton, D. (2004). Bioremediation of soils contaminated with organic compounds.
- Valdeiglesias, F. M. (2007). *Estudio de Factibilidad Económica para la Conversión de Vehículos Gasolineros a Gas Licuado de Petróleo*. Tesis para optar el Título de Segunda Especialización Profesional en Ingeniería del Gas Natural, Lima: Universidad Nacional de Ingeniería.
- Von Wedel, R. J., Mosquera, J. F., Goldsmith, C. D., Hater, G. R., Wong, A., Fox, T. A. & Wiegand, J. W. (1988). Bacterial biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater: in situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in California. *Water Science and Technology*, 20(11-12), 501-503.
- Whyte, L.G., Bourbonniere, L. & Greer, C.W. (1997). Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways, *Applied and environmental Microbiology* 63(9), 3719-3723.
- Liu, Y. C., Li, L. Z., Wu, Y., Tian, W., Zhang, L. P., Xu, L. & Shen, B. (2010). Isolation of an alkane-degrading *Alcanivorax* sp. strain 2B5 and cloning of the alkB gene. *Bioresource technology*, 101(1), 310-316.
- Zahed, M. A., Aziz, H. A., Isa, M. H., Mohajeri, L. & Mohajeri, S. (2010). Optimal conditions for bioremediation of oily seawater. *Bioresource technology*, 101(24), 9455-9460.

**Correo electrónico:**

jean\_19\_2014@hotmail.com

**Revisión de pares:** 15-04-2016**Recibido:** 03-05-2016**Aceptado:** 22-06-2016