

DETECCIÓN DE *Pseudomonas* spp. EN LA BAHÍA DE CARTAGENA

DETECTION OF *Pseudomonas* spp. IN THE BAY OF CARTAGENA

Rabelo-Florez, Roger-Alberto; Cuadrado-Cano, Bernarda-Soraya;
Márquez-Gómez, Marco-Antonio; Quintero-Caviedes, Jose-Ramiro;
De La Rosa-Martínez, Darwin

Roger-Alberto Rabelo-Florez

roger.rabelo@unad.edu.co

Universidad Nacional Abierta y a Distancia,
Colombia

Bernarda-Soraya Cuadrado-Cano

Universidad de Cartagena, Colombia

Marco-Antonio Márquez-Gómez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia,
Colombia

Jose-Ramiro Quintero-Caviedes

Universidad Nacional Abierta y a Distancia,
Colombia

Darwin De La Rosa-Martínez

Universidad Nacional Abierta y a Distancia,
Colombia

Revista de Investigaciones Universidad del Quindío

Universidad del Quindío, Colombia

ISSN: 1794-631X

ISSN-e: 2500-5782

Periodicidad: Anual

vol. 32, núm. 1, 2020

riuq@uniquindio.edu.co

Recepción: 07 Julio 2020

Aprobación: 17 Diciembre 2020

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/517/5172930004/>

Resumen: Objetivo: El objetivo principal de esta investigación es obtener bacterias del género *Pseudomonas* spp. con capacidad biodegradadora de hidrocarburos en muestras de agua superficial de la Bahía de Cartagena de Indias. Material y Método: Diseño observacional, descriptivo, transversal y prospectivo. Se tomaron tres muestras de agua superficial de la Bahía de Cartagena de Indias, se sembraron para preadaptación y adaptación biológica de las bacterias en medio con sales minerales, ACPM 1% v/v y petróleo crudo 1% v/v, como única fuente de carbono y energía. Resultados: Las bacterias que crecieron en los medios con petróleo crudo fueron identificadas en 31 morfotipos de colonias bacterianas, de las cuales solo el 19,4% dio positivo para la presencia de *Pseudomonas* spp., y el 80,6% restante, pertenecientes a otros grupos bacterianos. Discusión: Se evidenció un cambio de color en el agar nutritivo durante el procedimiento de aislamiento de las bacterias de la muestra 2 relacionado con la presencia de especies de *Pseudomonas* en especial *P. aeruginosa*. Conclusión: Se reporta la presencia del género de *Pseudomonas* spp. con capacidad biodegradadora de petróleo en una de las muestras de agua recolectadas en la Bahía de Cartagena. Este estudio abre la posibilidad de futuros trabajos de bioprospección e identificación metabólica de las cepas aisladas.

Palabras clave: Adaptación biológica, petróleo, pseudomonas.

Abstract: Objective: The main objective of this research is to obtain bacteria of the genus *Pseudomonas* spp. with biodegrading capacity of hydrocarbons in surface water samples from the Bay of Cartagena de Indias. Material and Method: Observational, descriptive, cross-sectional and prospective design. Three samples of surface water were taken from the Bay of Cartagena de Indias, they were sown for pre-adaptation and biological adaptation of the bacteria in a medium with mineral salts, ACPM 1% v/v and crude oil 1% v/v, as the only carbon source and energy. Results: The bacteria that grew in the media with crude oil were identified in 31 morphotypes of bacterial colonies, of which only 19.4% were positive for the presence of *Pseudomonas* spp., And the remaining 80.6%, belonging to other bacterial groups. Discussion: A color change in the nutrient agar was evidenced during the isolation procedure of the bacteria from sample 2 related to the presence

of *Pseudomonas* species, especially *P. aeruginosa*. Conclusion: The presence of the genus of *Pseudomonas* spp. with oil biodegrading capacity in one of the water samples collected in the Bay of Cartagena. This study opens the possibility of future work on bioprospecting and metabolic identification of the isolated strains.

Keywords: Biological adaptation, petroleum, pseudomonas.

Introducción

La contaminación por hidrocarburos del petróleo es un problema de carácter mundial y amplia distribución geográfica, teniendo en cuenta que independiente de la zona afectada, ya sea por procesos biológicos y físicos, tienen como destino final los mares y océanos (Carpenter, 2019; Diez et al., 2019). Los derrames accidentales o provocados, afectan tanto el suelo como el agua, así como también causan una alteración a la calidad del paisaje (Serrano et al., 2013) y en la producción agrícola (Odukoya et al., 2019). En Cartagena de Indias, la calidad de las aguas costeras se ha visto alterada por los efluentes domésticos, industriales y agrícolas, como por el transporte terrestre, fluvial y marítimo y por las descargas de la industria del petróleo (Echeverri et al., 2010; Eljaiek-Urzola et al., 2019).

La bahía de Cartagena se encuentra rodeada por islas que forman conjuntamente canales naturales, permitiendo así una comunicación directa entre la bahía y el mar Caribe y la renovación periódica de sus aguas (Cogua et al., 2012; Tosic et al., 2017). Además, se ven afectados a causa de los derrames de compuestos químicos derivados del petróleo, los sistemas de producción, la salud, la economía y las formas de vida de las poblaciones, debido a los efectos (mutagénicos y carcinogénicos) en los seres humanos y para los demás seres vivos (Cavazos et al., 2014; Tosic, et al., 2017).

En ecosistemas que han sido alterados por derrames accidentales o provocados de petróleo o sus derivados, se han identificado procariotes que han logrado sobrevivir a esas condiciones medioambientales adversas y reciben el nombre de bacterias nativas biodegradadoras de hidrocarburos y cuya presencia y aprovechamiento gana importancia día a día, dentro de las cuales se pueden mencionar especies del género *Pseudomonas* (Wu et al., 2018). Es por ello, que el objetivo del presente estudio es obtener bacterias del género *Pseudomonas* spp. con capacidad biodegradadora de hidrocarburos, a partir de muestras de agua superficial, extraídas de los cuerpos de agua de la Bahía de Cartagena de Indias.

Metodología

Diseño del estudio: Observacional descriptivo, transversal y prospectivo.

Area de estudio

El procedimiento de muestreo se realizó según el Standard Methods 2012 edición 22, APHA et al., (2012). Las muestras de agua se tomaron en septiembre de 2019, en la Bahía de Cartagena de Indias en el sector Barrio

Albornoz, ya que esta zona es de acceso libre en inmediaciones del vertimiento final de una industria petroquímica, en los siguientes puntos: Muestra 1: 10°22'06.8"N 75°30'31.3"W, Muestra 2: 10°22'06.9"N 75°30'31.3"W, Muestra 3: 10°22'06.7"N 75°30'31.3"W, siendo transportadas previa rotulación (Echeverri et al., 2010; DES, 2018) bajo condiciones de refrigeración, para su procesamiento en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD CCAV Cartagena.

Procesamiento de la muestra y análisis microbiológico

Las muestras fueron procesadas en dos fases, 1) preadaptación biológica y 2) adaptación biológica de las bacterias, siguiendo los protocolos publicados (Narváez et al., 2008; Samanez, 2008 y Echeverri et al., 2010), con algunas modificaciones.

Fase de preadaptación biológica. Se realizó bioestimulación la cual consiste en promover la proliferación de microorganismos nativos del medio contaminado mediante la adición de nutrientes (Reyes-Reyes et al., 2018). Para ello, de cada muestra se prepararon diluciones 1/10 con caldo de preadaptación $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ (MAP) (modificado de Narváez et al., 2008) con ACPM al 1% v/v suministrado por una bomba de gasolina de la ciudad de Cartagena e incubando a 35°C con agitación permanente, durante siete días utilizando una plancha magnética de calentamiento a 35°C, con termómetro para medición de temperatura (Echeverri et al., 2010; Narváez et al., 2008).

Fase de adaptación biológica. Se estimuló el crecimiento microbiano tomando un mililitro de caldo de preadaptación, para hacer una dilución 1/10 con caldo medio mínimo de sales con petróleo crudo al 1% v/v, en un tubo de ensayo tapa rosca. El caldo enriquecido, se preparó con sales grado reactivo, K_2HPO_4 : 1.5g/L; KH_2PO_4 : 0.5g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 0.5g/L; NaCl: 0.5g/L; FeSO_4 : 0.002g/L, (modificado de Echeverri et al., 2010; y Narváez et al., 2008) mezclado con 1000 mL de agua destilada y suplementado con petróleo crudo al 1% v/v. El petróleo crudo fue suministrado por el laboratorio de Microbiología del CCAV Cartagena – UNAD. Las muestras fueron incubadas a 35°C por siete días empleando una plancha magnética de calentamiento a 35°C, con agitación magnética y verificación de la temperatura mediante el uso de un termómetro de mercurio (Echeverri et al., 2010; Narváez et al., 2008).

Selección de cepas. Una vez cumplido el tiempo de la fase de adaptación biológica de siete días, se tomaron 10 μL del caldo medio mínimo de sales con crecimiento y se sembraron por superficie con ayuda de un asa de Drigalsky en placas de agar nutritivo (Scharlab®) suplementadas con 1% v/v de petróleo crudo, incubándose a 35°C (Narváez et al., 2008). Se seleccionaron las colonias más representativas y de mejor crecimiento, de estas, un total de 31 colonias fueron sembradas por agotamiento en agar nutritivo e incubadas a 35°C durante 48 horas. Luego, se procedió realizar la descripción de los morfotipos de las colonias y la coloración de gram, para visualizar la morfología microscópica se usó del microscopio compuesto con el objetivo de 100X (Murray et al., 2014 y Čepl et al., 2016).

Las colonias de bacterias gram negativas según la coloración de Gram, fueron sembradas en agar base según King (Merck®), para aislamiento selectivo

de bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* spp., siendo consideradas pertenecientes a este género, aquellas colonias que cambiaron el medio a color amarillo verdoso.

Análisis estadístico: Con la información recolectada se construyó una base de datos en Excel bajo Windows, posteriormente se realizó un análisis descriptivo y univariado, presentando las variables cualitativas en proporciones y números absolutos. Se compararon los aislamientos con los resultados en la tinción de Gram, las características morfológicas, microscópicas y la identificación presuntiva lograda con el medio en agar B (Base) según King, por medio de la prueba Chi cuadrado (#2) o exacta de Fischer. Los valores de p menor a 0,05 fueron considerados como indicador de significancia estadística. Todos los análisis estadísticos se realizaron por medio del software IBM SPSS Statistics versión 22.0.

Resultados

Fase de preadaptación biológica: Luego de los siete días en incubación a 35°C se observó cambio de color en el caldo de cultivo en los tubos, pasando estos de cristalino a turbio y con mayor pérdida de la transparencia en las muestras 1 y 3, con respecto a la muestra 2 (Figura 1).

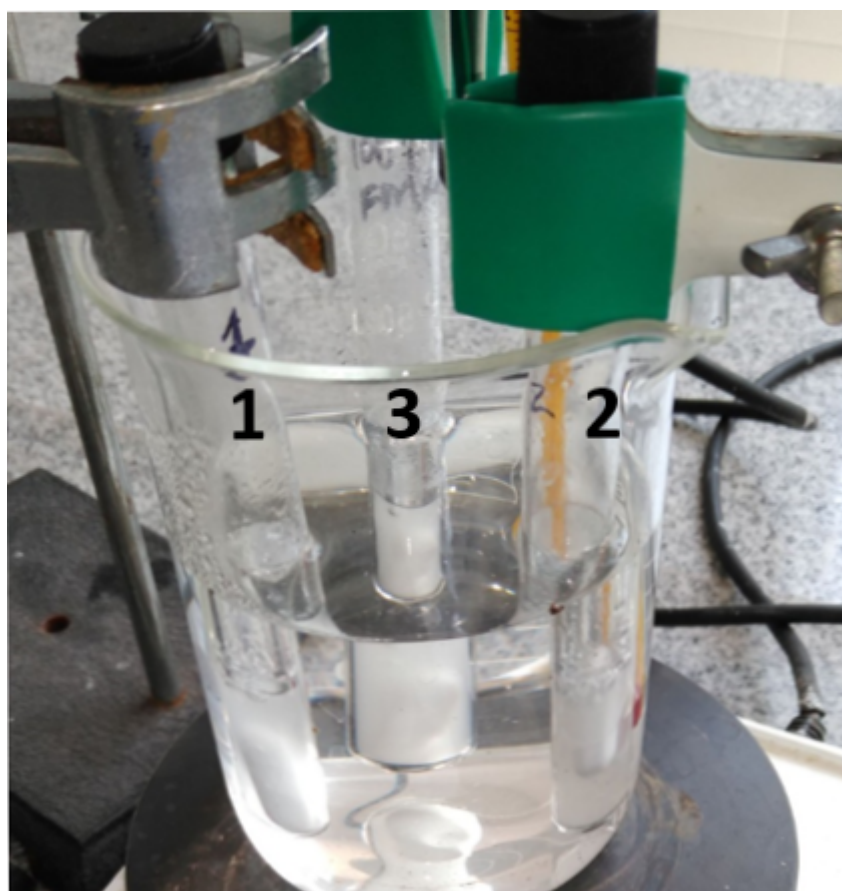


Figura 1
Tubos con caldo de MAP con ACPM al 1% v/v y muestras de agua

Fase de adaptación biológica. A los siete días de incubación se observó en todos los tubos con caldo medio mínimo de sales con petróleo crudo al 1% v/v, cambio de color, apreciándose en las muestras 1 y 2 mayor turbidez y aparición de un color café claro, con respecto a la muestra 3 (Figura 2).

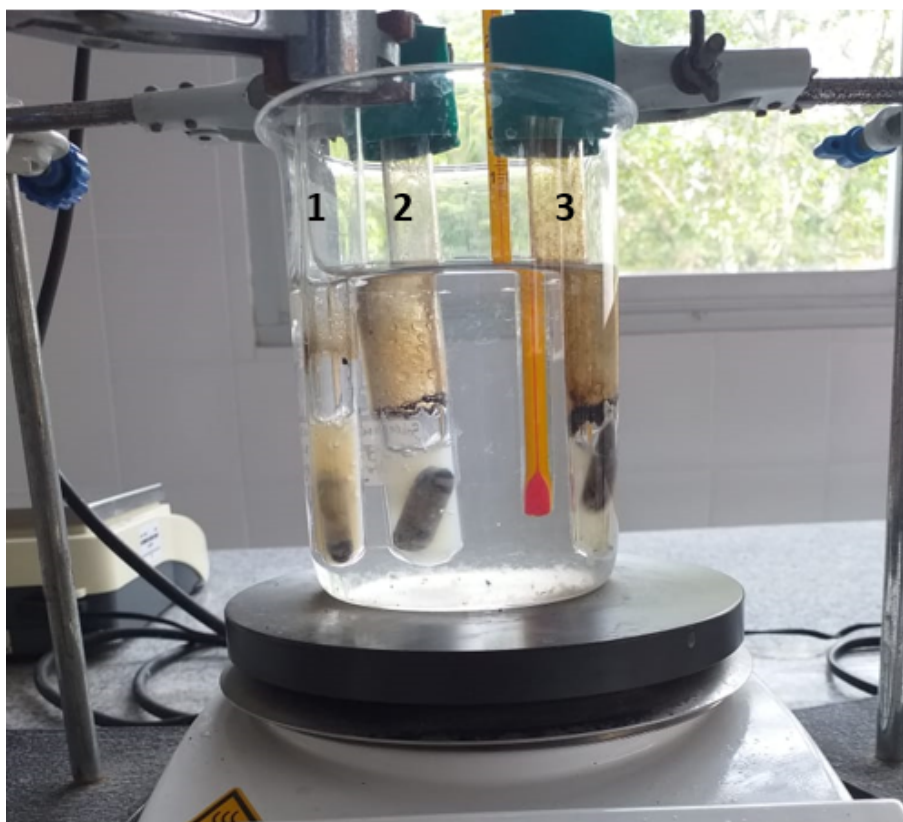


Figura 2.

Tubos con caldo Medio Mínimo de sales y Petróleo crudo 1% v/v y muestras de agua

Morfotipos. Terminado el tiempo de incubación a 35°C durante 72 horas, se observó que sobre el agar nutritivo al 1% p/v de petróleo crudo crecieron colonias que generaron desaparición parcial de la coloración oscura del crudo de petróleo, produciendo colonias translúcidas (Figura 3).



Figura 3.

Colonias en agar nutritivo con petróleo crudo al 1% p/v obtenidas de las tres muestras de agua

De las colonias sembradas por aislamiento en agar nutritivo (Figura 4), de las tres muestras, solo las de la muestra 2 produjeron un cambio en el color ambar normal del medio de cultivo hacia uno ligeramente ocre.

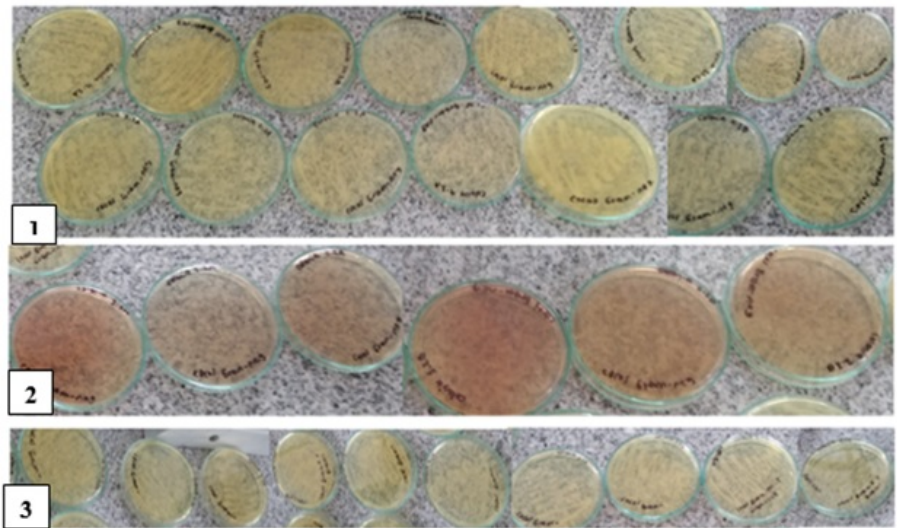


Figura 4.

Agar nutritivo con morfotipos bacterianos de las tres muestras de agua. 1) Muestra 1, 2) Muestra 2 con cambios de color del medio de cultivo y 3) Muestra 3

Dependiendo de la muestra, se lograron sembrar de la número 1, 15 colonias (48,4%), de la 2, 6 (19,4%) y de la 3, 10 (32,3%). En el agar nutritivo se observó que todas las colonias mantuvieron el tamaño previo en el agar nutritivo con petróleo crudo al 1% siendo consideradas como grandes (Figura 4). La forma más frecuente fue la de tipo irregular (81%); y según el tipo de borde, el que predominó fue el lobulado (74%) seguido del ondulado (16%). En cuanto a la elevación la de mayor frecuencia fue la de tipo convexa (77%) y la plana (23%); por otro lado, la superficie que más abundó fue la lisa (61%) seguida de la rugosa (39%). La consistencia que predominó, fue la dura (52%), siendo el resto blanda (29%) y mucoide (19%), mientras que el aspecto de mayor frecuencia fue la brillante (81%), seguida de la opaca (19%). Con relación al color, predominó el beige (58%), seguido del ocre (23%) y en tercer lugar, el translucido (19%) (Tabla 1).

Tabla 1.

Características morfológicas de las 31 colonias aisladas a partir de agar Agar nutritivo con petróleo crudo al 1% p/v.

Morfotipo	Forma		Borde			Elevación		Superficie	
Tipo de Morfotipos	Circular	Irregular	Continuo	Ondulado	Lobulado	Plana	Convexa	Rugosa	Lisa
Cantidad Morfotipos	6	25	3	5	23	7	24	12	19
Porcentaje %	19	81	10	16	74	23	77	39	61
Total Morfitipos	31		31			31		31	

Morfotipo	Consistencia			Aspecto		Color		
Tipo de Morfotipos	Blanda	Dura	Mucoide	Opaca	Brillante	Translucido	Ocre	Beige
Cantidad Morfotipos	9	16	6	6	25	6	7	18
Porcentaje %	29	52	19	19	81	19	23	58
Total Morfitipos	31			31		31		

Observación microscópica. En la tinción de Gram realizada a las 31 colonias se identifica en su mayoría gram negativos (90,3%) y unos pocos Gram positivos (9,7%), de los cuales, el 71,7% son cocos gram negativos, 19,4% bacilos gram negativos y 9,7% cocos gram positivos (Tabla 2).

En la muestra 1, la totalidad de las 15 colonias que se aislaron correspondieron a cocos gram negativos, mientras que en la muestra 2, las 6 eran bacilos gram negativos y en la muestra 3, de las 10, el 70% a cocos gram negativos y el 30% a cocos gram positivos agrupados en sarcinas, cadenas tipo estreptococos y racimos tipo estafilococos. Al comparar los aislamientos con los resultados en la tinción de gram, se presentaron diferencias estadísticamente significativas con $p < 0,05$.

Tabla 2.

Características microscópicas de bacterias aisladas de agar nutritivo con petróleo crudo al 1% p/v.

	Cocos Gram positivos	Cocos Gram negativos	Bacilos Gram negativos	Total
Forma y Tinción de Gram	3	22	6	31
% Porcentaje	10	71	19	100

Identificación como *Pseudomona* spp. Únicamente las colonias de la muestra 2 y que presentaron cambios en el agar nutritivo, al ser sembradas en agar B (Base) según King, dieron lugar a un cambio del medio de ambar a color a verde amarillento, indicando la presencia de *Pseudomonas* spp. (Figura 5).



Figura 5.

Cultivo de bacterias aisladas de las tres muestras de agua en agar Base según King

Las colonias identificadas como pertenecientes al género *Pseudomonas* desde el punto de vista de sus características morfológicas y microscópicas son de tamaño grande, forma circular, borde lobulado, elevación convexa, superficie lisa, consistencia mucoide, aspecto brillante, color traslúcido y bacilos gram negativos, encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), entre las características morfológicas y microscópicas y la identificación presuntiva lograda con el medio en agar B (Base) según King.

También se resalta que una de las cajas de la muestra del tubo 2, presentó mayor pigmentación verde, indicando la presencia presuntiva de *Pseudomona fluorescens* y *P. aeruginosa* de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial (Scharlab Grupo de Abastecimiento de Laboratorio, 2020 y Bio-Rad, 2020)

(Figura 6), sin embargo se establece que aunque los demás morfotipos de la muestra 2, no presentaron mayor pigmentación verde, no significa que no sea posible la presencia de *P. fluorescens* y *P. aeruginosa*, debido a una baja producción de pioverdina.

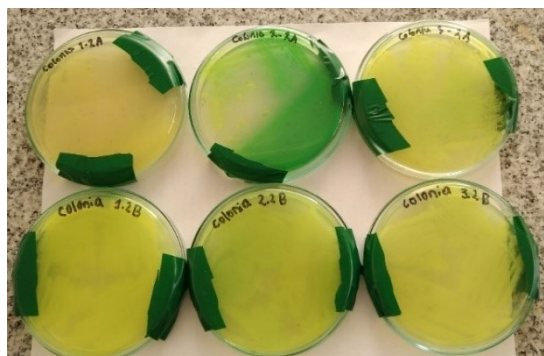


Figura 6.

Cultivo de colonias de la muestra de agua 2 en agar Base según King con coloración verde amarillenta

Discusión

Se identificó la presencia del género de *Pseudomona* spp. con capacidad biodegradadora de petróleo en una de las muestras de agua recolectadas en la Bahía de Cartagena.

En las fases de preadaptación biológica se observó que, mientras la muestra 2 no presentó casi crecimiento, determinado por la presencia de turbidez; en la fase de adaptación biológica, fue la única muestra donde las bacterias biodegradaron el petróleo casi en su totalidad, con resultados similares a los obtenidos en la muestra 1, presentándose disgregación del petróleo, situación acorde con lo registrado por (Echeverri et al., 2010 y Mwaura, 2017). Al pertenecer al género *Pseudomona*, se infiere que la vía utilizada para la biodegradación es la aerobia en especial porque los cultivos se dieron en agitación con aireación constante y además, porque según Madigan et al., (2015) y Brzeszcz y Kaszycki, (2018) en cuanto a la vía aeróbica, tanto los hidrocarburos alifáticos como los aromáticos, utilizan unas enzimas llamadas oxigenasas, que pueden ser monooxigenas y dioxigenasas, dando como resultado acetyl-CoA en (HA), acetyl-CoA, succinato y piruvato en (HAr), el cual se van a integrar en el ciclo de Krebs, causando aumento de la concentración microbiana y por ende aparición de turbidez en los cultivos (Salam et al., 2016).

Por otro lado, los resultados están de acuerdo con lo expresado por Ordoñez-Burbano et al., (2018), quien establece que las bacterias biodegradadoras logran tolerar elevadas concentraciones de hidrocarburos porque han desarrollado mecanismos para mantener la integridad de sus membranas, tales como el incremento en la rigidez de la membrana, por descenso en el contenido de ácidos grasos insaturados, la alteración en la conformación cis/trans de los fosfolípidos y la presencia de estructuras o enzimas capaces de metabolizar o degradar el contaminante, situación que se observó en especial con la muestra 2, que en la fase de preadaptación biológica aparentemente no creció, pero en la fase de adaptación biológica pudo lograr un buen desarrollo.

Es de resaltar que, mientras en la primera fase, la turbidez que adquirieron los cultivos fue blanquecina; en la segunda fase, la turbidez correspondió a un tono

parduzco debido al disgregado del petróleo (Echeverri et al., 2010 y Mwaura, 2017). Además, aproximadamente, después del día siete de la primera fase, se logró observar la formación de un color amarillo en la superficie del caldo, por lo que se infiere en especial en la muestra 2, es debido a la organización de una biopelícula ya sea por crecimiento microbiano reportado en especies de *Pseudomona*, por su metabolismo aerobio estricto oxidativo o por el acúmulo de metabolitos propios de la degradación del petróleo, situación que coincide con la investigación realizada por Lasa, (2005), en donde establece que, la etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia sobre la superficie, proceso observado en las bacterias Gram negativas como la *Pseudomonas aeruginosa* y en donde según Lasa (2005), los flagelos cumplen un rol importante en la etapa de adherencia primaria, también que la motilidad, pareciendo que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. De igual forma, en una investigación mas reciente Abadia et al., (2019), demostró que *P. aeruginosa*, tiene la capacidad de formación de biopelículas, lo que apoyarían los resultados obtenidos.

Es de anotar que en el agar nutritivo al 1% p/v de petróleo, todas las colonias que crecieron sobre la superficie del medio eran translúcidas y rodeadas de un halo del hidrocarburo, situación contraria a lo reportado por Echeverri et al., (2010), quienes describen colonias negras y puntiformes. Lo anterior hace pensar que dichos autores pudieron haber tomado como colonias, restos de petróleo sin biodegradar.

Por otro lado, el cambio de color evidenciado en el agar nutritivo durante el procedimiento de aislamiento de las bacterias de la muestra 2, no ha sido registrado en ninguno de los reportes relacionados con biodegradación de petróleo, pero si en las especies de *Pseudomonas* en especial *P. aeruginosa*, que produce piomelanina un pigmento de color café claro y que aumenta su síntesis con temperatura menor a 37 grados centígrados (Ausina y Moreno, 2005; Martínez, 2017), situación que ayuda a su identificación.

Llama la atención que las únicas bacterias que fueron bacilos gram negativos correspondieron a la muestra 2, y a su vez pertenecen al género *Pseudomonas*, lo cual está de acuerdo con lo reportado desde el punto de vista de la microscopía, ya que las bacterias Gram negativas, son las de mayor presencia en la biodegradación de hidrocarburos, en comparación con las bacterias Gram positivas. Esto se evidenció, en los estudios realizados por Napoles y Diaz (Napoles et al., 2019; Díaz et al., 2018), quienes emplearon un consorcio bacteriano integrado por bacterias Gram negativas: *Xanthomonas* sp., *Acinetobacter bouvetii*; *Shewanella* sp.; *Deffluviobacter lusatiensis*, y *Pseudomona* spp, entre otras, para biodegradar hidrocarburos presentes en agua de mar, creciendo el medio de cultivo agarizado como colonias amarillas, amarillas – anaranjadas, blanco amarillentas, con bordes lisos, de tamaño mediano y grandes, redondas, brillantes, poco elevadas, abultadas, cremosas y opacas. De igual manera, Nisperuza y Montiel (2018), a partir de muestras del pozo petrolero, lograron la identificación bioquímica de 40 cepas bacterianas que correspondían a 6 géneros de bacilos Gram negativos: *Pseudomona*, *Burkholderia*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. En otro estudio similar realizado por Largo (2011), utilizaron la bacteria Gram negativa *Alcanivorax venutensis*, para biodegradar hidrocarburo tipo alcanos y, Pardo et al., (2017), a partir de aguas residuales de la industria

de petróleo, aislaron e identificaron bacterias Gram negativas: *Pseudomonas* sp., *Pseudomonas putida*, *Achromobacter* sp. situación que comprueba la presencia del género *Pseudomonas* y su potencial biodegradador de hidrocarburos.

Por otro lado, otras publicaciones avalan los resultado del presente estudio ya que están de acuerdo con lo reportado por Mayz y Manzi, (2017) en donde el género *Pseudomonas* fue aislado e identificado de forma predominante en ecosistemas contaminados y con gran capacidad para biorremediar suelos y cuerpos de aguas. Mayz y Manzi (2017), evaluaron la actividad de *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida* y *P. aeruginosa*, para biorremediar la rizosfera de una leguminosa de un suelo contaminado con hidrocarburos. De igual forma, en otras investigaciones (Acuña et al., 2010; Bacosa et al., 2018 y He et al., 2019), encontraron diferentes géneros de bacterias, entre ellos *Pseudomonas* spp. para biodegradar hidrocarburos. Cui et al., (2019), de manera similar, hallaron en muestras de agua recolectadas de los pozos de inyección y producción de pozos petroleros, bacterias del género *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Marinobacter*, *Klebsiella*, *Vibrio*, *Marinobacterium*, *Chromonhalobacter* y *Thioclava*. También, en el estudio realizado por García et al., (2019), emplearon un consorcio bacteriano integrado por *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp. y *Mycobacterium* sp, para biorremediar aguas servidas contaminadas con hidrocarburos, provenientes de un local de lavadora de carros.

En este estudio se evidenció que de las 31 colonias seleccionadas, solo el 19,4% dio positivo para la presencia de *Pseudomona* sp., mientras que el 80,6% a otros grupos bacterianos. Resultados acordes con las investigaciones realizadas por Gallegos et al., (2018) y Mayz y Manzi (2017), en donde predominó el género *Pseudomonas* sp., a lo largo de todas las fases de cultivo. Cui et al., (2019) y Pucci et al., (2015), encontraron que al inicio en las muestras tomadas de agua de pozos petroleros y muestras de sedimentos del tanque de almacenamientos de petróleo respectivamente, hubo predominio de este género, pero en las fases posteriores disminuyó el crecimiento de esta bacteria, situación en contraposición con lo obtenido en este estudio y que pudo deberse a las condiciones fisicoquímicas presentes en el sitio donde se tomaron las muestras y que no fueron evaluadas y que podrían explicar también, el porqué el porcentaje de *Pseudomonas* sp. en las muestras tomadas pudo no ser muy significativa.

La relación encontrada entre las similitudes de las colonias aisladas y sus características microscópicas y a la vez con el género *Pseudomona* sp., está en concordancia con lo reportado en los trabajos realizados por Narváez et al., (2008) y Echeverri et al., (2010). Sin embargo, en gran parte de los trabajos reportados aquí, no describen el número de colonias aisladas y su correspondiente característica morfológica. En cuanto al crecimiento de bacterias en medios que contenían petróleo crudo, es similar a lo reportado por Narváez et al., 2008; Echeverri et al., 2010; Liu J., et al., 2017 y He et al., 2019, donde hubo una adaptación biológica microbiana a la contaminación por hidrocarburos. Se reitera la presencia de la bacteria perteneciente al género *Pseudomona*, en los medios de cultivo de la muestra 2, sembradas en el agar Base según King, por presentar una coloración amarillo verdoso, indicando la producción del pigmento pioverdina en las bacterias del genero *Pseudomona* spp. (Ausina y Moreno, 2005).

Como limitaciones del presente estudio se pueden mencionar, la no identificación plenamente de la identidad de las bacterias del grupo *Pseudomonas* spp., además, no se identificaron las otras bacterias no *Pseudomonas*, tampoco se logró evaluar las rutas metabólicas de como las bacteria pueden degradar hidrocarburos, así como establecer las características físicoquímicas del ambiente donde se recolectaron las muestras. Por otro lado, las bacterias de la muestra 2, no crecieron tanto en la fase de preadaptación biológica, como si lo hizo en la fase de adaptación biológica, quizás debido a que la muestra fue muy pequeña, o porque el género *Pseudomonas* spp. tiene mas afinidad para biodegradar el petróleo que el ACPM; sin embargo, no hay que descartar otra hipótesis, en la fase de adaptación biológica el caldo medio mínimo de sales contenía mayor diversidad de sales, situación que le pudo brindar a los microorganismos una similar condición salina a la del mar, mientras que en la fase de preadaptación biológica solo tenía un tipo de sal.

Se concluye que el género *Pseudomonas* spp. se logró detectar en los cuerpos de agua de la Bahía de Cartagena y logró biodegradar tanto el hidrocarburo ACPM como petróleo crudo. El género *Pseudomonas* spp, se aisló en 6 colonias del total de 31 seleccionadas. Lo anterior evidencia que este genero de bacteria, mantiene la vigencia como biodegradadora de hidrocarburo.

Este resultado de investigación, tiene como fortaleza que es un punto de partida para seguir estudiando el género *Pseudomonas* spp, como bacteria potencial biodegradadora de petróleo, y es por ello, que se sugiere investigar el porcentaje de biodegradación de hidrocarburos de este género en la bahía de Cartagena de Indias y cuál compuesto químico específico derivado del petróleo es capaz de biodegradar mejor. Por otro lado, se hace necesario a futuro el investigar la capacidad de biodegradar estos compuestos químicos en condiciones anóxicas, en especial empleando aquellas bacterias que se aislaron y no caracterizadas como *Pseudomonas* spp.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia – UNAD, por su apoyo logístico y financiación de este proyecto, a través de las convocatorias internas de apoyo a grupos y semilleros de investigación. También, agradecen al líder zona caribe de los laboratorios el químico Andres Ariza Arnedo, por el apoyo en la organización de los materiales y reactivos en el laboratorio. También agradecen a la Universidad de Cartagena y en especial al grupo de Investigación en Microbiología y Sistemas Simbióticos por el apoyo en esta investigación, tanto en ejecución como en la elaboración del manuscrito.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen conflictos de intereses con respecto al contenido del presente manuscrito.

Bibliografía

- Abadia, E., Rodríguez, O. y De La Cruz, A. (2019). Efectividad de la formación de biofilms por cepas de pseudomona y su capacidad de disminución de cloro y antagonica de bacterias coliformes. *Revista de Iniciación Científica*, 5, 74-78. <https://doi.org/10.33412/rev-ric.v5.0.2389>
- Acuña, AP., Graciela, MMJ y Pucci O. (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(1), 29-36. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-2556201000100007&lng=es&tlng=es.
- APHA, AWWA, WEF. (2012). *Standard Methods for examination of water and wastewater*. 22nd ed. Washington: American Public Health Association. 1360 pp. ISBN 978-087553-013-0
- Ausina, RV. y Moreno, GS. (2005). *Tratado de SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Buenos Aires; Madrid: Panamericana.
- Burbano, DEO., Medina, CAA., Tamayo, AE., Lasprilla, LMP., y Benítez, CN. (2018). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. *Revista de Ciencias*, 22(2). <https://dx.doi.org/10.25100/rc.v22i2.7917>
- Bio-Rad. (2020). Medio King B. Medio de diferenciación de *Pseudomonas*. Recuperado el 23 de mayo de 2020 de: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/inserts/CDG/es/55278_08_2009_ES.pdf
- Bacosa, HP., Erdner, DL, Rosenheim, BE., Shetty, P., Seitz, KW., Baker, BJ., y Liu, Z. (2018). Hydrocarbon degradation and response of seafloor sediment bacterial community in the northern Gulf of Mexico to light Louisiana sweet crude oil. *The ISME journal*, 12(10), 2532–2543. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0190-1>
- Brzeszcz, J., Kaszycki, P. (2018). Aerobic bacteria degrading both n-alkanes and aromatic hydrocarbons: an undervalued strategy for metabolic diversity and flexibility. *Biodegradation*, 29, 359–407. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9837-x>
- Cavazos, AJ., Pérez, AB. y Mauricio, GA. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 11(4), 539-550. <https://doi.org/10.22231/asyd.v11i4.16>
- Carpenter, A. (2019). Oil pollution in the North Sea: the impact of governance measures on oil pollution over several decades. *Hydrobiologia*, 845 (1), 109-127. <https://doi.org/10.1007/s10750-018-3559-2>
- Cogua, P, Campos, CNH y Duque, G. (2012). Concentración de mercurio total y metilmercurio en sedimento y seston de la bahía de cartagena, caribe colombiano*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*, 41(2), 267-285. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-97612012000200002&lng=en&tlng=es.
- Čepl, J., Blahůšková, A., Neubauer, Z., & Markoš, A. (2016). Variations and heredity in bacterial colonies. *Communicative & Integrative Biology*, 9(6), e1261228. <https://doi.org/10.1080/19420889.2016.1261228>
- Cui, K., Zhang, Z., Zhang Z., Sun, S., Li, H. y Fu, P. (2019). Stimulation of indigenous microbes by optimizing the water cut in low permeability reservoirs for green and

- enhanced oil recovery. Scientific reports, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52330-2>
- DES. 2018. Monitoring and Sampling Manual: Environmental Protection (Water) Policy. Brisbane: Department of Environment and Science Government.
- Díz, BLC., Leal, JCM., Díaz, DAA., Ferrer, SJC. y Avendaño, EDM. (2018). Consorcio microbiano autóctono para el tratamiento de aguas contaminadas con gasoil del puerto de Isla de Toas (Venezuela). Ciencia e Ingeniería Neogranadina, 28(2), 5-27. <https://doi.org/10.18359/rcin.2792>
- Diez, SM; Patil, PG., Morton, J., Rodriguez, DJ., Vanzella, A., Robin, D., Maes, T., Corbin, C. (2019). Marine Pollution in the Caribbean : Not a Minute to Waste (English). Washington, D.C. : World Bank Group. Disponible en: <http://documents.worldbank.org/curated/en/482391554225185720/Marine-Pollution-in-the-Caribbean-Not-a-Minute-to-Waste>
- Echeverri, JG., Manjarrez, PG. y Cabrera, OM. (2010). Aislamiento de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo en hábitats de ecosistemas costeros en la Bahía de Cartagena, Colombia. NOVA, 8(13), 76-86. <https://doi.org/10.22490/24629448.441>
- Eljaiek-Urzola, M., Romero-Sierra, N., Segrera-Cabarcas, L., Valdelamar-Martínez, D., & Quiñones-Bolaños, É. (2019). Oil and Grease as a Water Quality Index Parameter for the Conservation of Marine Biota. Water, 11(4), 856. <https://doi.org/10.3390/w11040856>
- García, J., Peñafiel, HD. y Rodríguez, R. (2019). Bioremediación de hidrocarburos en aguas residuales con cultivo mixto de microorganismos: caso Lubricadora Puyango. Enfoque UTE, 10(1), pp. 185 - 196. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v10n1.312>
- Gallegos, RM., Madera, SR., Castro, EG., Nájera, MM., Domínguez, LM., García, LE. y Vega, LA. (2018). Toxicokinetic and toxicodynamic symbiotic interactions among intestinal Pseudomonas degrading of hydrocarbons with its wild host fish Chirostoma jordani. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 34(4), 751-765. <http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2018.34.04.15>
- He, S., NiY., Lu, L., Chai, Q., Liu, H., y Yang, C. (2019). Enhanced biodegradation of n-hexane by Pseudomonas sp. strain NEE2. Scientific reports, 9(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52661-0>
- Largo, PE. (2011). Degradación de alcanos por células de alcanivorax venustensis inmovilizadas en hidrogeles adhesivos y biodegradables. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad del país Vasco. 212 p. <https://addi.ehu.es/handle/10810/12269>
- Lasa, I., Pozo, JL., Penadés, JR y Leiva, J. (2005). Biofilms bacterianos e infección. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 28(2), 163-175. Recuperado el 10 de mayo de 2020, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272005000300002&lng=es&tlng=es
- Liu, J., Techtman, SM., Woo, HL., Ning, D., Fortney, JL., y Hazen, TC. (2017). Rapid response of eastern Mediterranean deep sea microbial communities to oil. Scientific reports, 7(1), 5762. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05958-x>
- Madigan, MT., Martinko, JM., Bender, KS., Buckley, DH. y Stahl, DA. (2015). Biología de los microorganismos de Brock. Pearson Educación. 14a. edición
- Martínez R. I. (2017). Papel de EF-Tu en la interacción de Pseudomonas aeruginosa con los queratinocitos humanos. Universidad de las Islas Baleares. Recuperado de: <https://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/2654>

- Murray, PR., Rosenthal, KS. y Pfaller, MA. (2014). Microbiología médica. (7ma edición). Elsevier Health Sciences.
- Mayz, J., y Manzi, L. (2017). Bacterias hidrocarburoclásticas del género *Pseudomonas* en la rizosfera de *Samanea saman* (Jacq.) Merr. Revista Colombiana de Biotecnología, 19(1), 29-37. <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v19n1.57408>
- Mwaura, AN. (2017). Screening, Isolation And Characterization Of Hydrocarbonoclastic Bacteria From Oil Contaminated Soils. Recuperado de: <http://erepository.uonbi.ac.ke/handle/11295/101451>
- Napoles, AJ., Bahín, DL., Gutiérrez, RM., Del Toro, Á. y Abalos, RA. (2019). Degradación de diesel en agua de mar utilizando un consorcio bacteriano. Tecnología Química, 39(2), 403-420. Recuperado en 02 de diciembre de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852019000200403&lng=es&tlng=es.
- Narváez, FSL., Gómez, M. y Martínez, MM. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR, 37(1), 61-75. <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2008.37.1.182>
- Nisperuza, VAK. y Montiel, AM. (2018). Caracterización y evaluación de cepas bacterianas nativas con capacidad hidrocarburoclástica del pozo petrolero de San Sebastián, Lorica, Departamento De Córdoba (Doctoral dissertation). Disponible en: <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/123456789/969>
- Odukoya, J., Lambert, R. y Sakrabani, R. (2019). Comprensión de los impactos del petróleo crudo y sus tensiones abióticas inducidas en la producción agroalimentaria: una revisión. Horticulturae, 5 (2), 47. <https://doi.org/10.3390/horticulturae5020047>
- Ordoñez-Burbano, DE., Abella-Medina, CA., Echeverry-Tamayo, A., Paz-Lasprilla, LM., y Benítez-Campo, N. (2018). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. Revista de Ciencias, 22(2), 33-44. <https://dx.doi.org/10.25100/rc.v22i2.7917>
- Pardo, DS., Rojas, TD., Roldan, F., Brandão, P., y Almansa, ME. (2017). Biodegradación de fenol en aguas tratadas de la industria petrolera para re-uso en cultivos agrícolas. Revista de Biología Tropical, 65(2), 685-699. <http://dx.doi.org/10.15517/rbt.v65i2.23992>
- Pucci, GN., Acuña, ATN., Tiedemann, MC. y Pucci, OH. (2010). Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdoba, Argentina. Revista Peruana de Biología, 17(2), 237-244. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332010000200015&lng=es&tlng=es
- Pucci, G., Acuña, A. y Pucci, O. (2015). Biodegradación de hidrocarburos en fondos de tanques de la industria petrolera. Revista peruana de biología, 22(1), 97-101. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332015000100006&lng=es&nrm=iso
- Reyes-Reyes, MA., Puentes-Cala, EA., Casanova-Montes, EL., López-Deluque, F., Panqueva-Álvarez, JH. y Castillo-Villamizar, GA. (2018). Inmovilización de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo crudo en matrices orgánicas naturales y sintéticas. Revista internacional de contaminación ambiental, 34(4), 597-609. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.04.04>
- Salam, L.B. (2016). Metabolism of waste engine oil by *Pseudomonas* species. 3 Biotech 6, 98. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0419-5>

- Samanez, GE. (2008). Biodegradación bacteriana por bio-estimulación en suelos contaminados con petróleo crudo. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima – Perú. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/245/1/Samanez_ge.pdf
- Scharlab, GAL. (2020). King B Agar (F Agar). Recuperado el 23 de mayo de 2020 de: <https://scharlab.com/catalogo-productos-detalle-referencia.php?r=01-029-500&dw=King-B-Agar-F-Agar->
- Serrano, GMF., Torrado GLM. y Pérez RDD. (2013). Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *Revista Científica General José María Córdova*, 11(12), 233-244. <https://doi.org/10.21830/19006586.195>
- Tosic, M., Restrepo, J. D., Lonin, S., Izquierdo, A., & Martins, F. (2019). Water and sediment quality in Cartagena Bay, Colombia: Seasonal variability and potential impacts of pollution. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 216, 187-203. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.08.013>
- Wu T, Xu J, Xie W, Yao Z, Yang H, Sun C and Li X (2018). *Pseudomonas aeruginosa* L10: A Hydrocarbon-Degrading, Biosurfactant-Producing, and Plant-Growth-Promoting Endophytic Bacterium Isolated From a Reed (*Phragmites australis*). *Front. Microbiol.* 9:1087. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01087>