

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad
degradadora de hidrocarburos, comprobando su actividad
enzimática

Daniel Guillermo Carrasco Cabrera

Proyecto presentado como requisito para la obtención del título de
B.S. en Biotecnología

Quito

Mayo de 2007

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO
COLEGIO DE CIENCIA BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO

Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad degradadora de
hidrocarburos, comprobando su actividad enzimática

Iván Aveiga del Pino

**Director de Tesis y miembro
del comité de Tesis**

María de Lourdes Torres, Ph. D.

Comité de Tesis

Sonia Zapata, Dr.

Comité de Tesis

Hugo Valdebenito, Ph. D.

Decano del Colegio

Quito, Mayo 2007

© **Derechos de autor:**
Daniel Guillermo Carrasco Cabrera

Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, comprobando su actividad enzimática

Resumen:

En este trabajo se aisló e identificó cepas bacterianas capaces de degradar hidrocarburos derivados del petróleo, en muestras de Papallacta, Sacha Central y del Pozo Guanta 10, lugares donde se dieron derrames. De las muestras tomadas se hizo un rescate bacteriano haciendo un enriquecimiento con caldo de cultivo LB (Luria-Bertulli), para luego sembrar por extensión en placa en agar LB. Después con estriaciones consecutivas en agar LB se logró aislar cepas bacterianas a las que se sometió a vapores de hexano, como método de selección y así asegurar presenten una actividad degradadora de hidrocarburos.

Las bacterias fueron identificadas utilizando el sistema BIOLOG^{®*}. En las muestras de Papallacta se identificaron 11 cepas bacterianas que corresponden a *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae ss pneumoniae*, *Raultella terrigena*, *Pseudomonas* spp. *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp., *Aeromonas* sp.. De las muestras de Sacha Central se aislaron 5 cepas bacterianas que son *Enterobacter* sp, *Enterobacter* sp., *Enterobacter aerogenes (Klebsiella mobilis)*, *Cellulosimicrobium cellulans* y la 5ta cepa no da una identificación positiva pero por su bioquímica probablemente se trata de *Corynebacterium* sp. De las muestras del Pozo Guanta 10 se logró aislar 4 cepas bacterianas *Alcaligenes faecalis ss faecalis*, *Enterobacter* sp. y 2 cepas más que no dan una identificación positiva pero su bioquímica nos hace pensar que son *Kurthia ginsonii* y *Cellulomonas* sp. De todas las cepas aisladas el 75% corresponde a bacilos Gram negativos, el 15% a bacilos Gram positivos y el 10% a cocos Gram negativos. A todas las cepas identificadas, se les realizó la prueba del índol-azul, con el fin de comprobar la presencia y actividad de enzimas oxigenasas; responsables de la oxidación extracelular de muchos compuestos, entre ellos los hidrocarburos.

De esta manera, en este trabajo se obtuvo bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos.

* BIOLOG[®], un sistema de pruebas bioquímicas y un software de identificación de bacterias.

Abstract:

In this work bacterial strains able to degrade hydrocarbons were isolated and identified, from samples taken from the following locations: Papallacta, Sacha Central and Pozo Guanta 10, where oil spills had occurred. The first step was a bacterial rescue with LB (Luria-Bertulli) broth, after this those bacteria were isolated in LB agar, where consecutive isolation was made to achieve pure growth. Those isolated bacteria were put under hexane steam, a hydrocarbon of high bactericidal effect, to assure bacterial degradation process.

The bacteria were identified using system BIOLOG[®]. In the samples from Papallacta 11 bacteria were identified that corresponded to *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae ss pneumoniae*, *Raultella terrigena*, *Pseudomona* spp. *Escherichia coli*, *Burkholderia* sp., *Aeromona* sp.. From the samples of Sacha Central 5 bacteria were isolated which corresponded to *Enterobacter* spp., *Enterobacter aerogenes (Klebsiella mobilis)*, *Cellulosimicrobium cellulans*. The 5th type of bacteria with out a positive identification, but by biochemistry it probably was *Corynebacterium* sp. From the samples of the Pozo Guanta 10, 4 bacteria were isolated wich corresponded to *Alcaligenes faecalis ss faecalis*, *Enterobacter* sp and 2 with out a positive identification but by biochemistry they probably were *Kurthia ginsonii* and *Cellulomonas* sp. The isolated bacteria were: 75% Gram negative bacillus, 15% Gram Positive bacillus, 10% Gram negative coccus.

To all the identified bacteria, the indol-blue test was performed, to verify the presence and activity of oxigeneses enzymes, responsible for the extracellular oxidation of many compounds, including hydrocarbons.

The goal to isolate and identify bacteria with hydrocarbon degradative activity was achieved.

Tabla de contenidos

1. Introducción	8
<i>1.1. Ambientes contaminados con hidrocarburos</i>	8
<i>1.2. Las bacterias degradadoras de hidrocarburos</i>	10
1.2.1. Los microorganismos biodegradadores	10
1.2.2. Algunas estrategias genéticas que utilizan los microorganismos para responder ante un agente toxico	12
<i>1.4. La degradación de los hidrocarburos</i>	15
1.4.1. Bioremediación de benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos (BTEX)	16
1.4.2. Bioremediación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)	17
2. Justificación	19
3. Objetivos generales	20
4. Objetivos específicos	20
5. Área de estudio	20
6. Materiales	21
7. Métodos	21
<i>7.1. Recuperación de microorganismos de suelos contaminados</i>	21
<i>7.2. Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos</i>	21
<i>7.3. Identificación de cepas</i>	22
<i>7.4. Prueba de actividad enzimática mediante la prueba del índol-Azul</i>	22
8. Resultados	23
<i>8.1. Bacterias identificadas</i>	23
<i>8.2. Prueba del Azul – índol</i>	24
9. Discusión	24

<i>9.1. Identificación de bacterias degradadoras</i>	24
<i>9.2. Prueba del Índol-Azul</i>	25
10. Conclusiones	27
11. Recomendaciones	28
10. Referencias	30
Tablas	33
Figuras	37

1. Introducción

1.1. Ambientes contaminados con hidrocarburos

El uso masivo del petróleo y sus derivados como fuente de energía y materia prima, ha ocasionado el fenómeno de la contaminación ambiental en todo el mundo, liberando diferentes gases tipo invernadero por el uso de combustibles. Además, se liberan al ambiente otros derivados como los policíclicos aromáticos, lo que produce un deterioro sostenido y progresivo en la calidad del medio ambiente, generando amenazas a la salud pública, así como la extinción de especies vegetales y animales (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

Este tipo de contaminación genera cambios en las poblaciones microbianas presentes, provocando un stress que produce una selección y una disminución de la diversidad (Rivera-Cruz, 2002). Esta diversidad se ve directamente influenciada por la complejidad de mezclas químicas presentes y por el periodo de tiempo que se encuentran expuestas a los contaminantes (Ara, 2004).

La presencia de hidrocarburos orgánicos volátiles en el derrame produce la muerte inmediata de varios tipos de organismos, especialmente aquellos que estén en etapas larvarias. En el caso de derrames en cuerpos de agua, la temperatura puede provocar la evaporación de este tipo de hidrocarburos en uno o dos días, y en aguas frías este proceso puede tardar hasta una semana (Lomelí, Tamayo, 2000).

Otro tipo de sustancias químicas permanecen en el agua superficial y forman burbujas de alquitrán o musgo flotante (Lomelí, Tamayo, 2000).

En los lugares que han sufrido derrames de petróleo, el daño es directo, y los principales factores que van a determinar el grado de contaminación son: tipo de petróleo (crudo o refinado), cantidad, tamaño del sitio contaminado, época del año, condiciones atmosféricas, temperatura (Lomelí, Tamayo, 2000).

El petróleo derramado sufre procesos de evaporación, y de degradación natural en un proceso muy lento mediado por bacterias y/u otros microorganismos (Lomelí, Tamayo, 2000).

De los lugares que han sufrido estos impactos se ha afirmado que: “Entre las más severas contaminaciones destacan las que se produjeron y todavía se producen a causa de la extracción y el manejo del petróleo en todos los países productores de hidrocarburos en América Latina; principalmente en Venezuela, Brasil, México, Argentina y Ecuador” (Schmidt, 2002).

Específicamente en el Ecuador, las provincias orientales con mayor número de pozos son, Sucumbíos y Orellana, con un total de 801 pozos. Los cantones que mantienen el mayor número de pozos son Orellana, Lago Agrio, Joya de los Sachas y Shushufindi (FLACSO, 2003).

Hay que recordar que en el país antes de 1993, las actividades de exploración y producción de hidrocarburos, no contaban con regulaciones ambientales (FLACSO, 2003).

Durante el periodo del consorcio Texaco-Gulf, luego CEPE-Texaco y Petroecuador-Texaco, se dieron muchos daños ambientales que hoy están claramente identificados y ocurrieron en sitios y alrededor de las actividades de exploración, producción, transporte, refinación y comercio de combustibles derivados del petróleo (FLACSO, 2003).

Como consecuencia tenemos que la contaminación producida ha acarreado graves daños para el medio ambiente. Tan solo en el período comprendido desde 1972 hasta 1993, más de 30 mil millones de galones (114 mil millones de litros) de desechos tóxicos y petróleo sin refinar fueron descargados hacia las tierras y vías fluviales de la Amazonía ecuatoriana. Esta cifra supera, con mucho, los 10,8 millones de galones (40,9 millones de litros) que se derramaron en el accidente del tanque “Exxon Valdez” en

Alaska, uno de los peores derrames marítimos de petróleo que jamás se hayan producido (Sebastian, 2004).

Ante esta problemática generalizada nace la bioremediación, que es una herramienta para sanear áreas afectadas. Esta, explota el uso de diferentes microorganismos, para transformar los contaminantes en sustancias menos peligrosas como dióxido de carbono y agua (Borden, 1994).

Para mejorar los procesos de bioremediación se suele añadir microorganismos autóctonos de la zona a ser remediada, que tienen una actividad degradadora comprobada. Por este motivo es importante mantener la búsqueda de diferentes organismos degradadores. Esta búsqueda nos permite seleccionar aquellos organismos que están más adaptados a diversas condiciones, como por ejemplo la capacidad de usar hidrocarburos como única fuente de energía (Borden, 1994).

1.2. Las bacterias degradadoras de hidrocarburos

1.2.1. Los microorganismos biodegradadores

Las poblaciones bacterianas que se encuentran en mayor cantidad en los lugares contaminados se adaptan al medio gracias a que poseen características metabólicas que les permiten usar como fuente de carbono al contaminante o una fracción del mismo. Cuando la fuente de carbono es un substrato insoluble como un hidrocarburo, los microorganismos facilitan la biodisponibilidad produciendo sustancias como carbohidratos, ácidos grasos, enzimas y biosurfactantes. (Aveiga, Comunicación personal).

Se ha logrado identificar una gran variedad de microorganismos con la capacidad de degradar compuestos derivados del petróleo. De estos se ha observado que la mayor parte corresponden a eubacterias, encontrándose también arqueobacterias y eucariotes (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

Algunos géneros de microorganismos que se han logrado identificar con capacidad de degradar hidrocarburos son: *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Candida*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* (Ollivier; Magot, 2005).

Aunque no han sido caracterizados en su totalidad, se ha podido comprobar que muchos de estos microorganismos poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas, esto les permite oxidar diferentes fracciones del petróleo. La oxidación puede ser más ó menos específica dependiendo de la capacidad enzimática de la bacteria y de las condiciones ambientales, esto permite cambiar ciertas propiedades de los compuestos haciéndolos más susceptibles a una transformación hasta llegar a dióxido de carbono y agua (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

Para que la toxicidad del compuesto disminuya no es necesario llegar siempre a una transformación completa a dióxido de carbono, en muchos casos es necesario que se de una sola oxidación para que la toxicidad disminuya o para que este se vuelva mucho más soluble, la combinación entre aumentar la solubilidad y la disminución de la toxicidad por efecto de la oxidación hace que aumente la biodisponibilidad del contaminante (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

Para entender como un microorganismo es capaz de reaccionar ante un compuesto al que nunca antes había estado expuesto, debemos entender que para todo organismo lo más importante es mantener la vida, por lo que cualquier condición ambiental o nutricional que reduzca su probabilidad de reproducirse despertará una reacción inmediata en su metabolismo y posteriormente a nivel genético (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

1.2.2. Algunas estrategias genéticas que utilizan los microorganismos para responder ante un agente toxico

1.2.2.1. Reclutamiento

Cuando un organismo se encuentra ante una condición ambiental completamente nueva por la aparición de un contaminante, puede usar para su supervivencia las “herramientas” que ya posee. Es decir, que puede hacer uso de alguna actividad enzimática que ya posee. Un ejemplo de esta habilidad son las bacterias con capacidad de degradar la lignina de la corteza de los árboles, las mismas que pueden ayudar en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

1.2.2.2. Transferencia horizontal

Es ampliamente conocido que las bacterias pueden incorporar material genético de organismos similares gracias al uso de mecanismos celulares de transferencia (conjugación), pero son capaces también de hacerlo de organismos distantes e inclusive completamente diferentes por la acción de un virus (transducción) o directamente del medio (transformación). El material genético incorporado puede integrarse al de la bacteria, produciendo un enriquecimiento en su repertorio metabólico otorgándole nuevas funciones, entre las que se puede incluir aquellas que permitan degradar compuestos xenobióticos. Las pseudomonas, por ejemplo, son capaces de pasar por transferencia, genes que se asocian a la degradación de fenoles en suelos (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

1.3. Mecanismos generales usados por las bacterias para desintoxicar un ambiente

Las rutas metabólicas microbianas son variadas; fermentaciones, respiraciones anaeróbicas, acción de exoenzimas y procesos quimiolitótrofos (Piana, 2003).

Existen dos formas como la microflora puede degradar el contaminante.

a) La sustancia favorece el crecimiento microbiano y es empleada como fuente de carbono, energía y raras veces como fuente de nitrógeno, azufre, etc..

El número de microorganismos aumenta y el aislamiento se realiza utilizando el contaminante como única fuente de nutrientes. Luego de que el compuesto fue degradado las poblaciones decrecen (Piana, 2003).

b) Por cometabolismo, el compuesto no actúa directamente como fuente nutritiva, sino que se debe emplear otras como la glucosa, que al disminuir inducen la producción de enzimas necesarias para la degradación del contaminante (Piana, 2003).

Estas reacciones catabólicas ocurren principalmente cuando las dosis de contaminante son altas y la estructura química permite su degradación (Alexander, 1999).

Esto indica una serie de reacciones que pueden ser realizadas por microorganismos heterótrofos sobre los contaminantes: (Piana, 2003).

Detoxificación

Conversión de una molécula tóxica en otra no tóxica (*Arthrobacter* spp) (Piana, 2003).

Degradación

Transformación de una sustancia compleja en productos más simples Ej. La mineralización que da como resultado la aparición de CO₂, H₂O, NH₃, etc. (*Pseudomonas* spp) (Piana, 2003).

Conjugación

Formación de compuestos por reacciones de adición, en donde el microorganismo combina el contaminante con metabolitos celulares (adición de aminoácidos, ácidos orgánicos, etc.) (Piana, 2003).

Hidrólisis

La adición de agua para dividir un enlace, es un proceso común por el cual los microorganismos inactivan compuestos tóxicos. Esta reacción puede ser una simple hidrólisis de un ester (Alexander,1999).

Hidroxiación

La adición de un grupo hidroxilo a un compuesto aromático o alifáticos es una manera muy simple de disminuir su toxicidad (Alexander,1999).

Dehalogenación

Muchos compuestos tóxicos o peligrosos, contienen cloro u otros halógenos, la remoción del halógeno generalmente es suficiente para convertir al producto en inocuo. El reemplazo del halógeno se puede hacer por un hidrógeno lo que se conoce como una dehalogenación reductiva, y si el cambio se da por un grupo Hidroxi es una dehalogenación hidrolítica. También se puede dar el caso que junto al halógeno se retire también un hidrógeno adyacente en este caso se conoce el proceso como dehidrohalogenación. Estos procesos son sorprendentes por la cantidad de energía que poseen los enlaces (Alexander,1999).

Demetilación u otras dealquilaciones

Compuestos tóxicos suelen contener grupos metilos o alquilos sustituyentes, estos en ocasiones están unidos a N o O; la demitalación o la dealquilacion de estos compuestos mediada por microorganismos reduce su toxicidad o la anula (Alexander,1999).

Metilación

Este proceso es de utilidad cuando se trata de limpiar fenoles, consiste en la adición de uno o varios grupos metilos (Alexander,1999).

Nitro reducción

Los compuestos nitrogenados son tóxicos para muchos organismos, la reducción del grupo nitro (NO₂) en amino (NH₃) ayuda a reducir la toxicidad de los mismos (Alexander,1999).

Deaminacion

Existen microorganismos que son capaces de remover el nitrógeno de los compuestos, reduciendo su toxicidad (Alexander,1999).

División de éteres

Se ha estudiado que compuestos con enlaces éter pierden su efecto toxico cuando se divide esta unión C-O-C (Alexander,1999).

1.4. La degradación de los hidrocarburos

Un hidrocarburo es un compuesto orgánico que esta formado exclusivamente por carbono e hidrógeno (Rittmann, 2001). Los hidrocarburos de acuerdo a su estructura química son más o menos degradables, varían en su habilidad de ser degradados. Cuando los derrames ocurren en el agua tienden a formar láminas en la superficie en donde el viento y el oleaje crean microscópicas emulsiones. Esta condición de emulsiones permite que los microorganismos predominantemente bacterias (*pseudomonas*, *corinebacterias* y *micobacterias*), algunas levaduras y hasta algas verdes tengan una mayor superficie de contacto con las partículas de hidrocarburo, lo que vuelve al hidrocarburo más asequible a la degradación (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

En los derrames, la fracción de hidrocarburo más volátil se evapora con facilidad dejando componentes alifáticos y aromáticos menos volátiles, compuestos ramificados

y policíclicos; para ser oxidados por diversos grupos de microorganismos (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

En el agua los procesos de bioremediación se ven limitados por la disponibilidad de nutrientes, ya que estos generalmente se encuentran en bajas concentraciones, lo que obliga a realizar una adición de nutrientes. Se suele añadir nitrógeno y fósforo, para estimular el crecimiento de los microorganismos con potencial de degradar hidrocarburos (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

Al ocurrir el derrame en suelos el proceso varía al del agua; ya que la oxidación que llevan a cabo hongos y bacterias se ven afectados por los procesos de humificación, que tiende a atrapar el residuo haciéndolo más persistente. En suelos el factor limitante no son los nutrientes, es la cantidad oxígeno presente y su disponibilidad, por lo que se suele airear el suelo o añadir agentes químicos que agreguen oxígeno, para permitir la oxidación (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

En los ambientes que han sufrido derrames, se observa un incremento de las bacterias con capacidad oxidativa entre mil y un millón de veces, a corto tiempo después del derrame. Con las condiciones favorables se puede oxidar el 80% de los componentes en un periodo de 6 a 12 meses (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

1.4.1. Bioremediación de benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos (BTEX)

La gasolina está compuesta o formada por cientos de hidrocarburos, de los cuales la mayoría son saturados y tienen entre 4 y 12 carbonos, siendo muy común encontrar benceno, tolueno, etilbenceno y los isómeros del xileno (BTEX). Estos compuestos son tóxicos y ligeramente más solubles en el agua que otros hidrocarburos que forman el petróleo (Rittmann, 2001).

Al producirse un derrame de gasolina, ésta se filtra en el suelo, pudiendo alcanzar aguas subterráneas, en donde se reparten los compuestos BTEX; compuestos que son poco

comunes en las aguas naturales, sin embargo su presencia se ha generalizado por el amplio uso de los BTEX (Rittmann, 2001).

Los BTEX al ser productos naturales, son biodegradables por oxidación aerobia, proceso que lo pueden realizar un sinnúmero de bacterias ampliamente distribuidas en el medio ambiente. Sin embargo algunos microorganismos son capaces de degradarlos en condiciones anaerobias mediante la carboxilación (Rittmann, 2001).

1.4.2. Bioremediación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son de gran interés en la remediación por sus propiedades mutagénicas, tóxicas, y cancerígenas. En los derrames es fácil encontrar estos compuestos, generalmente en altas concentraciones (Piana, 2003).

Las HAPs son absorbidos por el suelo donde muchos de ellos se volatilizan y pasan a la atmósfera, aquellos que no; sufren la acción de microorganismos, pero aquellos que tienen dos o más anillos bencénicos en forma simple o múltiple, son más resistentes a la acción enzimática, y entre mayor sea la cantidad de anillos, mayor será su resistencia (Piana, 2003).

Sohgen y Stormer a principios del siglo XX, fueron quienes iniciaron los estudios sobre la degradación de los HAPs, aislando microorganismos de medios acuáticos, usando compuestos aromáticos como fuentes de carbono. Lograron aislar e identificar diferentes géneros de bacterias como: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flabobacterium*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* (Piana, 2003).

Cerniglia y Heitkamp en 1989 sugirieron los siguientes principios aplicados a la degradación de los HAPs:

- 1) Una gran variedad de bacterias, hongos y algas tienen la habilidad de degradarlos.

- 2) La hidroxylación de los HAPs envuelve la incorporación de oxígeno molecular.
- 3) Los microorganismos procariotas metabolizan los HAPs con un ataque inicial de una dioxigenasa para dar cis, dihydrodiol que además es oxidado para formar dihydroxidos.
- 4) HAPs con más de 3 anillos de benceno no sirven como sustrato para el crecimiento bacteriano lo que hace que deba estar sujeto a una transformación co-metabólica.
- 5) Muchos de los genes son codificados por plásmidos.
- 6) HAPs de bajos pesos moleculares como el naftaleno son degradados rápidamente mientras que aquellos de alto peso como el antraceno o el benzopyreno son más resistentes.
- 7) La biodegradación ocurre con mayor eficiencia en la interfase sedimento/agua.
- 8) La adaptación microbiana puede ocurrir por continuas exposiciones a los HAPs (Piana, 2003).

La importancia que tiene el conocer y mantener bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, nace como una necesidad por los daños ambientales que éstos producen. Por lo que en este trabajo se aisló, seleccionó, identificó y comprobó la acción enzimática de bacterias rescatadas de lugares contaminados; en este caso en particular de la laguna de Papallacta, de Sacha Central y del Pozo Guanta 10.

2. Justificación

Teniendo en cuenta que el Ecuador lista entre los países latinoamericanos que más contaminación ha causado por derrames de hidrocarburos, ante el grave impacto que producen los derrames de hidrocarburos, nace la inquietud de identificar bacterias con capacidad de degradar estas sustancias, viendo a las bacterias como una posible herramienta para ayudar en la remediación de lugares afectados.

En la revisión de bibliografía se encontró que, para mejorar los procesos de bioremediación se suele añadir microorganismos autóctonos de la zona a ser remediada, que tienen una actividad degradadora comprobada. Por este motivo es importante mantener la búsqueda de diferentes organismos degradadores. Esta búsqueda nos permite seleccionar aquellos organismos que están más adaptados a diversas condiciones, como por ejemplo la capacidad de usar hidrocarburos como única fuente de energía (Borden, 1994). Es importante que para el proceso de bioremediación se rescaten las bacterias capaces de degradar hidrocarburo de una manera rápida y efectiva (Levin, 1997).

En el Ecuador no se permite la adición de bacterias introducidas o modificadas, haciendo muy importante la investigación continua de poblaciones bacterianas en las áreas afectadas por derrames, para ayudar a su recuperación (PETROECUADOR, 2001).

Motivo por el cual se decidió tomar muestras de lugares afectados, en nuestro caso se escogió Papallacta, Sacha Central, y el Pozo Guanta 10, por ser lugares que en el momento de iniciar el proyecto se encontraban contaminados por derrames de petróleo.

Este trabajo aportara a tener un mejor conocimiento sobre los microorganismos degradadores de hidrocarburos, y lograr así formular estrategias de biorremediación, para los sitios de estudio.

3. Objetivos generales

Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, de sitios contaminados, en este caso de la Laguna de Papallacta, Sacha Central y Guanta.

4. Objetivos específicos

Cultivar bacterias de suelos contaminados con hidrocarburos

Aislar bacterias con capacidad de degradar hexano

Obtener cultivos puros de las cepas aisladas

Identificar las cepas de los cultivos puros

Comprobar la actividad de enzimas oxidativas (Oxigenasas)

5. Área de estudio

Se tomaron 4 muestras de suelo contaminado del lecho de la laguna de Papallacta (Mayo-2004), 3 muestras de lodo contaminado del pozo Guanta 10 y 2 muestras de Sacha Central (Junio-2004). Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito y posteriormente en los laboratorios de la empresa Biox-Ecuavital.

6. Materiales

Insumos y medios principales

Caja Hermética (General Glassblowing Co.; USA)

Hexano

Luria Broth (Luria-Bertulli) (Invitrogen; Ecuador)

Luria Agar (Luria-Bertulli) (Invitrogen; Ecuador)

Minimal Agar (Ver Tabla 1)

BIOLOG Agar (BIOLOG; USA)

Sistema de identificación BIOLOG (BIOLOG; USA)

Espectrofotometro UV/Vis (Beckman DU 520; USA)

7. Métodos

7.1. Recuperación de microorganismos de suelos contaminados

Para cada muestra se tomó 10grs. de suelo o lodo contaminado (Ver Figura 1). Mediante técnicas asépticas se colocó la muestra en un Erlenmeyer de 1000 ml, se añadieron 90 ml de caldo LB (Luria-Bertulli) (Ver Tabla 2) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 24 horas (Ver Figura 2). Luego se tomaron 0.1 ml del caldo incubado con el lodo y se sembró por técnica de extensión en placa en cajas petri con agar LB (Ver Figura 3 y Tabla 3). Se dejó incubar por 24 horas. Se realizó este procedimiento por duplicado para cada muestra tomada.

7.2. Aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos

Del crecimiento obtenido en las cajas después de la recuperación, se tomó una muestra al azar con un asa y se la sembró en un nuevo medio (LB Agar), con el fin de aislar colonias por la técnica de estriación, se dejó incubar por 24 horas a temperatura ambiente. Se repitió el proceso las veces necesarias hasta lograr colonias aisladas, variando el número de estriaciones en cada caso (Ver Figura 4).

Cuando se obtuvo colonias puras, se las sembró en cajas petri con agar minimal (Ver tabla 1), se las colocó abiertas en una caja hermética, la cual se saturó con vapores de hexano. Se dejó por 15 días a temperatura ambiente, al cabo de ese tiempo se recuperó las colonias que presentaron crecimiento (Ver Figura 5).

7.3. Identificación de cepas

Se siguió el protocolo de identificación BIOLOG[®].

A las colonias puras, se las sembró en agar BIOLOG[®], se incubó por 24 horas a 35°C; se realizó una tinción Gram, a las bacterias Gram negativas se les realizó la prueba de la oxidasa y a las Gram positivos se les realizó la prueba de la catalasa. De acuerdo al protocolo a seguir, se realizó una suspensión de las mismas en el líquido para suspensión de bacterias BIOLOG[®], siguiendo el estándar de turbidez para bacterias Gram negativas o Gram positivas, para luego sembrar una cantidad determinada de bacteria en los platos de identificación BIOLOG[®], dividido en 96 pocillos, se incubaron a 35°C de 24 a 48 horas, hasta observar resultados (Ver Figura 6).

Los platos BIOLOG[®] arrojan un resultado de acuerdo al color de cada pocillo, transparente o morado (Ver Figura 6), resultado que se introduce en el programa BIOLOG[®], el cual automáticamente nos da un resultado identificando la bacteria con un grado de probabilidad de certeza del mismo.

7.4. Prueba de actividad enzimática mediante la prueba del índol-Azul

La prueba del Índol-Azul tiene el propósito de confirmar la capacidad de las bacterias de producir enzimas monooxigenasas y excretarlas al medio, mediante la degradación biológica del índol a índigo, para lo que se sembraron las bacterias en agar minimal, con una concentración de índol 5mmol y se dejó incubar por 24 horas a 35°C.

8. Resultados

8.1. Bacterias identificadas

De las 4 muestras de lodo de lecho de la laguna de Papallacta, después de los procesos de aislamiento y de selección en vapores de hexano se logró aislar 11 cepas bacterianas que corresponden, de acuerdo a los resultados obtenidos con el sistema de identificación BIOLOG[®], a: *Escherichia coli* O157:H7, *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ss *pneumoniae*, *Raultella terrigena*, *Pseudomona* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomona* sp., *Burkholderia* sp., *Aeromona* sp. , *Pseudomona* sp.

Todas corresponden a Bacilos Gram negativos, el 55% son oxidasa negativa y el 45% oxidasa positivo (Ver Tabla 4).

De las 2 muestras de lodo de Sacha Central, después de los procesos de aislamiento y de selección en vapores de hexano se logró aislar 5 cepas bacterianas que corresponden, de acuerdo a los resultados obtenidos con el sistema de identificación BIOLOG[®] a: *Enterobacter* sp., *Enterobacter aerogenes* (*Klebsiella mobilis*), *Cellulosimicrobium cellulans*, *Enterobacter* sp., y 1 identificación no segura de *Corynebacterium* sp.

De las cuales el 80% son Gram negativos y oxidasa negativa, el 20% es Gram positivo y catalasa positivo (Ver Tabla 5).

De las 3 muestras de lodo del Pozo Guanta 10, después de los procesos de aislamiento y de selección en vapores de hexano se logró aislar 4 cepas bacterianas que corresponden, de acuerdo a los resultados obtenidos con el sistema de identificación BIOLOG[®] a: *Alcaligenes faecalis* ss *faecalis*, *Enterobacter* sp. y 2 identificaciones no seguras *Kurthia gibsonii* y *Cellulomonas cellasea*

De las cuales el 50% son bacilos Gram positivos y catalasa positivos, y el 50% son cocos Gram negativos que corresponde el 25% a oxidasa positivo y el 25% a oxidasa negativo (Ver tabla 6).

En conjunto de los tres sitios el 75% corresponde a Bacilos Gram negativos, el 15% a Bacilos Gram positivos y el 10% a Cocos Gram negativos.

8.2. Prueba del Azul – índol

Esta prueba dio negativo para todas las bacterias aisladas.

Para confirmar que, las cepas *Pseudomona* sp., *Burkholderia* sp., *Aeromona* sp., *Pseudomona* sp., Gram negativas, oxidasa positivas, pueden degradar el índol se las sembró en un medio minimal preparado con agar al 1.5% e índol a una concentración 5mmol, en donde se obtuvo crecimiento pero no la presencia visible y/o medible de índigo (Tabla 7). Las mediciones con espectrofotómetro entre 200 y 1000nm tampoco fueron útiles ya que no hubo una absorbancia para el color índigo a 445nm.

9. Discusión

9.1. Identificación de bacterias degradadoras

El proyecto logró comprobar la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos (hexano) en las muestras tomadas. De la laguna de Papallacta el 100% corresponde a bacilos Gram negativos, de Sacha Central el 80% son bacilos Gram negativos, y del pozo Guanta 10 el 50% son coco Gram negativo y el 50% son bacilos Gram positivos.

Si observamos un porcentaje de los tres sitios el 75% corresponde a Bacilos Gram negativos, el 15% a bacilos Gram positivos y el 10% a cocos Gram negativos. Revisando diferentes estudios se encuentra que en sitios contaminados con

hidrocarburos lo usual es encontrar una mayor proporción de bacilos Gram negativos (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000). Lo que se corrobora en este trabajo.

La desventaja del método que se utilizó para rescatar las bacterias en este proyecto, es que solo nos permite rescatar un porcentaje limitado de la población bacteriana total presente, logrando aislar bacterias de crecimiento rápido, aerobio estricto y/o facultativo, que representan el 1% de la población total bacteriana presente en un suelo contaminado (Valderrama, Téllez-Sosa, 2000).

Sin embargo es un método fácil de seguir y muy práctico; ya que en un proceso de bioremediación se desea rescatar y aislar las bacterias capaces de degradar hidrocarburo de una manera rápida y efectiva, y que las mismas sean de metabolismo alto para lograr el mejor y mayor efecto en el área afectada en el menor tiempo posible (Levin, 1997).

9.2. Prueba del Índol-Azul

La prueba del Índol-Azul, pretende comprobar la actividad de un tipo de enzimas, las oxigenasas, mediante la oxidación del índol a índigo.

Las enzimas oxigenasas; asociadas a la degradación de ciertos hidrocarburos y a la formación de índigo en la industria, realizan proezas químicas, pero lamentablemente son inestables y en muchas ocasiones su actividad catalítica es baja, como consecuencia se deben realizar procesos especiales para resolver estas dificultades (Meyer, 2002).

Bioquímicamente las oxigenasas son dependientes del NAD(P)H, de la tasa de transferencia de oxígeno al medio y de los efectos del sustrato o productos en la biocatalisis. La activación catalítica de las oxigenasas necesita de un donador de electrones sea el NADH o el NADPH; pero muchas enzimas que dependen de este intercambio de electrones tienen una tasa catalítica muy baja y necesitan de un medio adecuado. (Meyer, 2002).

Una desventaja fácil de evadir es la demanda tan grande de oxígeno que presentan las oxigenasas para realizar su proceso, de hecho necesitan más oxígeno que muchos organismos que respiran. Es así que muchas veces las condiciones del bioreactor son las que limitan su actividad, por la baja transferencia de oxígeno al mismo (Meyer, 2002).

El medio usado puede poseer una o más sustancias que inhiben a las oxigenasas, estas sustancias pueden estar presentes en cantidades con rangos micro o milimolares (Meyer, 2002).

Las enzimas que oxigenan el índol son fácilmente detectables por que los productos de la reacción son pigmentos inestables, estas enzimas están asociadas al citocromo P450. Se conoce que la enzima naftaleno dioxigenasa esta asociada a la formación de índigo mediante la oxidación del índol, al igual que la 3-hidroxyindol, que es un producto del citocromo P450. En todos los casos de oxidación del índol los productos son inestables y la oxidación final es espontánea (Meyer, 2002).

La degradación del índol no siempre produce índigo, existen tres compuestos conocidos de esta degradación el índigo, la indirubina y el isoíndigo, el compuesto que se forma al final depende de la oxidación catalizada del índol antes de la oxidación espontánea, de este modo la oxidación catalizada por enzimas del índol tienen también tres productos el indoxyl que luego se oxida en índigo; la isatina que se oxida en indirubina y el 2-hydroxyindol que se oxida en isoíndigo. Cada uno de los productos finales posee su propio color característico, el índigo de color azul-púrpura (Índigo), la indirubina es rojiza-rosado y el isoíndigo que es amarillento-cristalino. La isatina presenta un color amarillo (Rui, Wood; 2004).

En este proyecto ninguna de las bacterias presentó un cambio de coloración a índigo pero tomando en cuenta las rutas de degradación del índol, es probable que se haya producido isatina y luego indirubina, debido a que el medio después del periodo de incubación presentó una coloración amarillenta. No se pudo confirmar la presencia de estas sustancias, uno por que el interés fue obtener índigo como una confirmación de la

presencia de oxigenasas y dos por que no se contaba con los equipos necesarios para detectar y/o separar los otros posibles productos de la degradación del índol.

Dados los resultados negativos se buscó confirmar que las cepas gram negativas oxidasa positivas degradan el índol, para lo que se las sembró en un medio preparado con agar al 1.5% e índol en una concentración 5mmol, donde se obtuvo crecimiento, confirmando la capacidad de las bacterias de utilizar el índol como fuente de carbono y por tanto su capacidad de degradarlo.

La detección de indirubina mediante espectros UV/Vis no es posible por que su longitud de onda se encuentra en el rango del ruido que produce el medio (Trojanowicz, 2003). Este hecho impidió que los resultados obtenidos en el barrido realizado entre 200 y 1000nm en la búsqueda de índigo a 445nm con el espectrofotómetro sean de utilidad.

10. Conclusiones

El proyecto logró cumplir su objetivo general, de aislar y recuperar bacterias de los lugares escogidos para el proyecto, expuestos a contaminación con hidrocarburos.

En orden a los objetivos específicos planteados en el presente proyecto, se logró con éxito cultivar bacterias de los ambientes contaminados con hidrocarburos, el aislamiento de las mismas y su selección mediante la capacidad de degradar hexano.

Se logró la obtención de cepas puras de las bacterias aisladas y posteriormente identificadas.

El objetivo de identificación se consigue parcialmente ya que los resultados obtenidos con el sistema BIOLOG[®], no obtuvieron un rango de probabilidad lo suficientemente alto para dar un resultado confiable en 3 cepas bacterianas, de las 20 bacterias aisladas en el transcurso del proyecto.

La comprobación de la actividad de enzimas oxidativas se consigue por otras pruebas y no por la prueba del índol-azul en *Pseudomona* sp., *Burkholderia* sp., *Aeromona* sp., *Pseudomona* sp. siendo positivas para la prueba de la oxidasa y crecen en el medio con índol 5mmol.

11. Recomendaciones

Para lograr aislar bacterias con una mejor capacidad y resistencia a los lugares contaminados, se pueden usar medios con menor cantidad de nutrientes ya que en lugares contaminados al igual que en sitios donde se realiza bioremediación éstos están poco disponibles. Una manera fácil de conseguir esto es usar los medios conocidos y comerciales en menor concentración a la indicada en las instrucciones de uso de los mismos.

El uso de medios con menor cantidad de fuentes de carbono. Ayudaría a evitar el desplazamiento de bacterias que crecen lentamente y que generalmente son desplazadas por bacterias que crecen mejor en condiciones ideales, como las de los medios de cultivo.

Se puede mejorar el sistema de aislamiento en vapores de hidrocarburos usando sustancias más tóxicas que el hexano, como el tolueno y el xileno, usando cajas de vapor. Para evitar el uso de cajas de vapor se puede añadir al medio directamente la sustancia o mezclas de sustancias menos volátiles, como por ejemplo diesel o gasolina previamente esterilizados por filtración. Si se desea usar sustancias volátiles se las puede fijar haciendo soluciones en compuestos aún más volátiles como por ejemplo la acetona, para luego mezclarla en los medios, la evaporación de la acetona permite que el compuesto de interés permanezca en el medio.

Para comprobar la presencia de actividad enzimática, como por ejemplo la de oxidasas, es recomendable usar pruebas comercialmente disponibles y estandarizadas. Siendo poco práctico buscar pruebas bioquímicas con varios posibles resultados, como lo que

ocurre con la ruta metabólica de la oxidación del índol a índigo, en la prueba del índol-azul.

Para ayudar a una identificación con un mayor porcentaje de probabilidad de certeza se pueden combinar diferentes métodos bioquímicos; por ejemplo galería API, Biolog. Pudiendo complementar la identificación con identificaciones basadas en secuenciamento genético como la 16s RNA, o RSGP (reverse sample genome probe).

10. Referencias

- 1.- Demain, A. Davies, J. y colaboradores, Manual of industrial Microbiology and Biotechnology, Segunda edición, ASM Press, Washington, USA, 1999
- 2.- Norris, Hinchee, Brown, McCarty, Semprini, Wilson, Kampbell, Reinhard, Bouwer, Borden, Vogel, Thomas, Ward. Handbook of Bioremediation, Lewis Publishers, USA, 1994.
- 3.- Alexander, Martin. Biodegradation and Bioremediation, Segunda edición, Academic Press, USA, 1999.
- 4.- Dr. Wini Schmidt, Suelos contaminados con hidrocarburos: La bioremediación como una solución ecológicamente compatible. Corporación técnica alemana, 2002
- 5.- FLACSO, Petroecuador. Petróleo y desarrollo sostenible en Ecuador “Las reglas de juego”. RISPGRAF, Quito, Ecuador 2003
- 6.- Rittmann, B. McCarty, P. Biología del medio ambiente, Principios y aplicaciones. McGraw-Hill, Madrid – España. 2001
- 7.-Meyer, Andreas Jörg. Directed Evolution of 2-hydroxybiphenyl 3-Monooxygenase from *Pseudomonas azelaica* HBP1. Swiss federal Institute of Technology Zurich. 2002
- 8.- Rui, Lyngyun; Reardon, Kenneth; Wood, Thomas. Protein engineering of toluene ortho-monooxygenase of *Burkholderia cepacia* G4 for regiospecific hydroxylation of indole to form various indigoid compounds. Applied Genetics and molecular biotechnology [66: 422-429] . online publication 2004, printed 2005
- 9.- Szostek, Bogdan. Orska-Gawrys. Jowita. Surowiec, Izabella. Trojanowicz, Marek. Investigation of natural dyes occurring in historical Coptic textiles by high-performance

liquid chromatography with UV–Vis and mass spectrometric detection. Journal of Chromatography A Volume 1012, Issue 2 , 19 September 2003, Pages 179-192

10.- S.K. Samanta, O.V. Singh, R.K. Jain. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. Trends in biotechnology. 20 pgs 243-148. 2002

11.- M. Levin, M. Gealt. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Selección, estimación, modificación de microorganismos y aplicaciones. McGraw-Hill, Madrid, 1997

12.- Ollivier, Bernard; Magot, Michel, Petroleum microbiology, ASM Press, USA, 2005

13.- Miguel San Sebastián, Anna-Karin Hurting, Oil exploitation in the amazon basin of Ecuador: a public health emergency, obtenido en la web <http://publications.paho.org/spanish/news.cfm?ID=122>, publicado en línea el 2004)

14.- Brenda Valderrama, Juan Téllez-Sosa, Microbiología del petróleo y sus derivados, obtenido en la web <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap2/cap2.html>, publicado en línea el 2000

16.- Mauricio Gonzáles Piana, Bioremediación y Tratamiento de efluentes, obtenido en la web <http://ilustrados.com/publicaciones/EpZpulFkAZqbEiSfM.php>, publicado en línea el 2003

17.- PETROECUADOR Gerencia de protección ambiental –GPA- Gestión ambiental hidrocarburífera Volumen II Normas Relacionadas, obtenido en la http://www.petroecuador.com.ec/web04/proteccion/normas_relacionadas.pdf publicado en línea 2001

18.- M. Lomelí, R. Tamayo, A. Llaraza, Contaminación por petróleo. Universidad Nacional Autónoma de México; Colegio de ciencias y humanidades, obtenido en la web

http://www.sagan-gea.org/hojared_AGUA/paginas/14agua.html, publicado en línea el
2000

Tablas

Tabla 1. Composición del Agar Minimal

Ingredientes:	
NaCl	0.5g/100ml
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.1g/100ml
K ₂ HPO ₄	0.1g/100ml
MgSO ₄	0.002g/100ml
Agar	1.5%

Tabla 2. Composición del caldo LB (Luria-Bertulli)

Luria Broth

Ingredientes:	1 LITER	5 LITERS	10 LITERS
Tryptone	10 g	50 g	100 g
Yeast Extract	5 g	25 g	50 g
NaCl	10 g	50 g	100 g
Glucose	1 g	5 g	10 g
MgCl ₂ -6H ₂ O	1 g	5 g	10 g

Tabla 3. Composición del Agar Luria-Bertulli

Ingredientes:	LITER	5 LITERS	10 LITERS
Tryptone	10 g	50 g	100 g
Yeast Extract	5 g	25 g	50 g
NaCl	10 g	50 g	100 g
Glucose	1 g	5 g	10 g
MgCl ₂ -6H ₂ O	1 g	5 g	10 g
Agar	15 g	75 g	150 g
1M NaOH	2 ml	10 ml	20 ml

Tabla 4. Cuadro de identificación de las bacterias de Papallacta

Bacteria #	Gram	Oxidasa	TSI	Resultado BIOLOG [®]
P1	Bacilo -	Negativo	A/A	<i>E. coli</i> O157:H7
P2	Bacilo -	Negativo	A/A	<i>Klebsiella</i> sp.
P3	Bacilo -	Negativo	A/A	<i>Escherichia coli</i>
P4	Bacilo -	Negativo	A/A	<i>Klebsiella</i> <i>pneumonie</i> ss <i>pneumonie</i>
P5	Bacilo -	Negativo	A/A	<i>Raultella</i> <i>terrigena</i>
P6	Bacilo -	Positivo	K/K	<i>Pseudomona</i> sp.
P7	Bacilo -	Negativo	A/A	<i>Escherichia coli</i>
P8	Bacilo -	Positivo	K/K	<i>Pseudomona</i> sp.
P9	Bacilo -	Positivo	K/K	<i>Burkholderia</i> sp.
P10	Bacilo -	Positivo	—	<i>Aeromona</i> sp.
P11	Bacilo -	Positivo	K/K	<i>Pseudomona</i> sp.

Tabla 5. Cuadro de identificación de las bacterias de Sacha Central

Bacteria #	Gram	Prueba Bioquímica	Resultado BIOLOG [®]
S1	Bacilo -	Oxidasa -	<i>Enterobacter</i> sp.
S2	Bacilo +	Catalasa +	Too few positive matches (Probable <i>Corynebacterium</i>)
S3	Bacilo -	Oxidasa -	<i>Enterobacter aerogenes</i> (Kleb. <i>Mobilis</i>)
S4	Bacilo -	Oxidasa -	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>
S5	Bacilo -	Oxidasa -	<i>Enterobacter</i> sp.

Tabla 6. Cuadro de identificación de las bacterias del Pozo Guanta 10

Bacteria #	Gram	Prueba Bioquímica	Resultado BIOLOG [®]
G1	Bacilo +	Catalasa +	No ID (Probable <i>Cellulomonas</i>)
G2	Coco -	Oxidasa +	<i>Alcaligenes faecalis</i> ss <i>faecalis</i>
G3	Coco -	Oxidasa -	<i>Enterobacter</i> sp.
G4	Bacilo +	Catalasa +	<i>Kurthia</i> sp.

Tabla 7. Cuadro de las bacterias oxidasa positivo con crecimiento en agar con índol 5mmol

Bacteria	Gram	Prueba Oxidasa	Identificación del a cepa	Crecimiento en agar con índol 5mmol
P8	Bacilo -	Positivo	<i>Pseudomona</i> sp.	Positivo
P9	Bacilo -	Positivo	<i>Burkholderia</i> sp.	Positivo
P10	Bacilo -	Positivo	<i>Aeromona</i> sp.	Positivo
P11	Bacilo -	Positivo	<i>Pseudomona</i> sp.	Positivo

Figuras



Figura 1. Muestra de lodo de Papallacta



Figura 2. Erlenmeyers con 90ml de caldo LB y 10g de la muestra de lodo, el tamaño grande del erlemeyer es para asegurar un buen intercambio gaseoso.

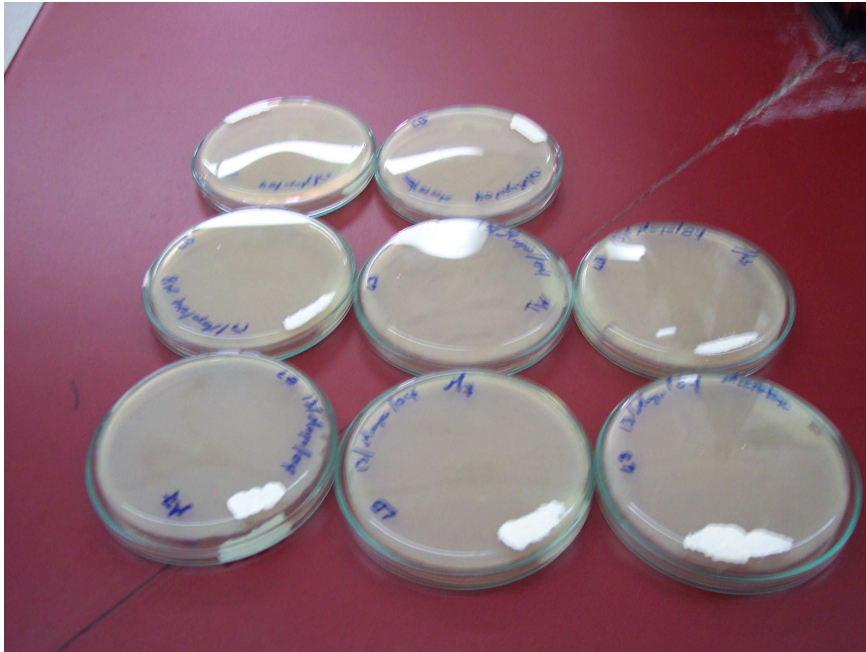


Figura 3. Cajas petri con LB Agar, en donde se sembró por extensión en placa, se observa el crecimiento obtenido después del periodo de incubación.



Figura 4. Para poder obtener colonias puras se realizaron varias estriaciones, hasta obtener colonias puras.



Figura 5. De este modo se colocó las cajas petri con agar minimal, dentro de una caja hermética con un frasco con hexano, para saturar la caja con vapores de este hidrocarburo volátil.

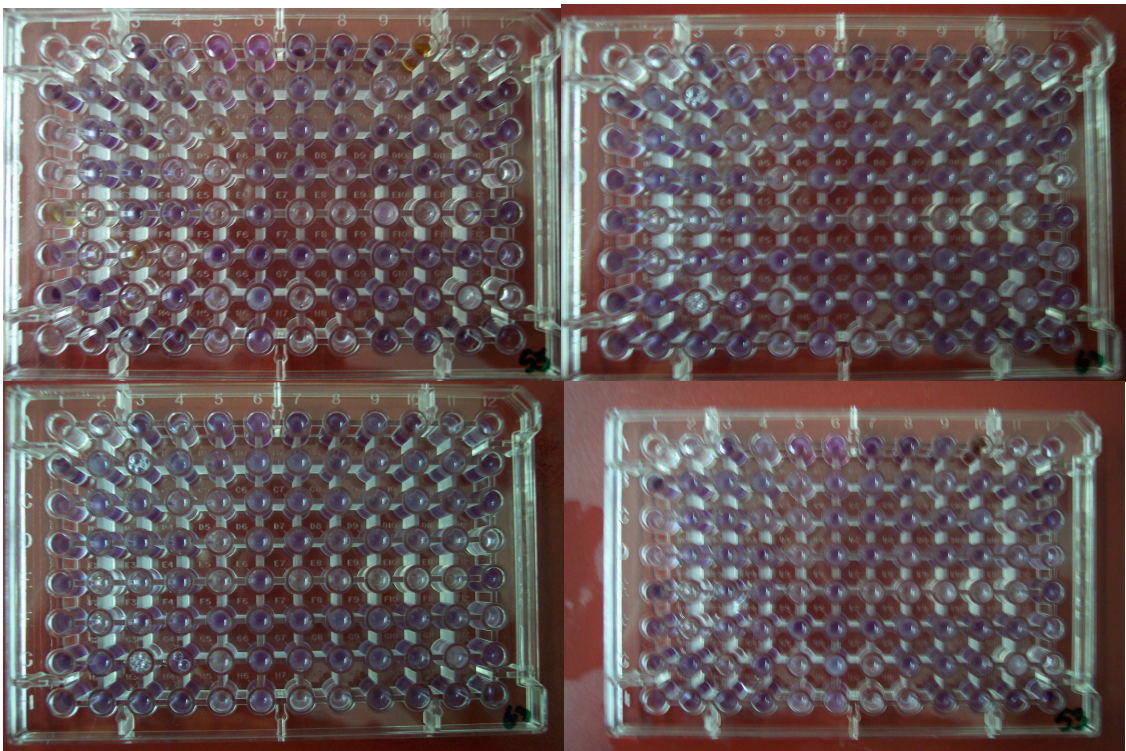


Figura 6. Resultados en el plato BIOLOG[®], los pocillos que tienen un color morado o azulado, son aquellos pocillos en los que la reacción es positiva, los pocillos incoloros o de otro color son reacciones negativas.