

Elaboración de un catálogo de bacterias cultivables como línea base de aislamientos con potencial hidrocarbonoclasta, de dos zonas con alta influencia petrolífera en Colombia.

Establishment of a catalog of cultivable bacteria as a baseline of isolates with hydrocarbonoclastic potential, from two areas with high oil presence in Colombia.

Sandra Milena Enríquez Delgado

Tesis de maestría

Asesor:

PhD. Nicolás Pinel Peláez

Universidad EAFIT
Escuela de Ciencias Aplicadas e Ingeniería.
Maestría en Ciencias de la Tierra
Medellín
2022

Índice

1. Resumen	3
2. Introducción	4
3. Materiales y métodos	10
3.1. Origen y toma de muestras	10
3.2. Caracterización fisicoquímica del crudo	11
3.3. Caracterización química de sustratos	12
3.4. Medios de cultivo	13
3.4.1. Medio para el aislamiento de bacterias ambientales generales	13
3.4.2. Medio de cultivo para el aislamiento de bacterias ambientales hidrocar- bonoclastas	13
3.5. Cultivo, aislamiento de bacterias ambientales	13
3.6. Caracterización fenotípica y genética de aislamientos ambientales	14
3.6.1. Caracterización morfológica de bacterias ambientales	14
3.6.2. Caracterización bioquímica de aislamientos ambientales generales	14
3.6.3. Identificación molecular de aislamientos	16
3.6.4. Preparación de aislamientos para PCR directa de 16S ARNr	16
3.6.5. Caracterización molecular de aislamientos	17
3.6.6. Construcción filogenética	17
3.7. Identificación molecular consorcios bacterianos	18
3.8. Cultivo, aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarbonoclastas	18
3.8.1. Cultivo y aislamiento a partir de MBL suplementado con crudo al 1 % v/v	18
3.8.2. Cultivo y aislamiento a partir de MBS suplementado con crudo al 1 % v/v	19
3.8.3. Caracterización morfológica de aislamientos con potencial hidrocarbo- noclasta en R2A 0.1x	19
3.8.4. Caracterización bioquímica de aislamientos con potencial hidrocarbo- noclastas	19
3.9. Cuantificación de tasas de biodegradación de crudo	20
3.9.1. Biodegradación de crudo por consorcios bacterianos del sustrato: suelo	20
3.9.2. Selección de cepas para la cuantificación de tasas de biodegradación de crudo	20
3.9.3. Cálculo de curva de crecimiento (UFC/mL)	20
3.9.4. Cuantificación de porcentajes de biodegradación	21
3.10. Caracterización fenotípica complementaria de bacterias hidrocarbonoclastas (BHCC's)	22
3.10.1. Prueba deshidrogenasa en BHCC's	22

3.10.2. Microscopia electrónica de barrido	22
3.10.3. Prueba de fluorescencia para BHCC's	23
4. Resultados	23
4.1. Caracterización fisicoquímica del crudo	23
4.2. Concentración de HTP en el suelo	25
4.3. Cultivo, aislamiento y caracterización de bacterias ambientales generales	25
4.3.1. Cultivo y aislamiento de bacterias ambientales generales	25
4.3.2. Caracterización morfológica de aislamientos ambientales generales	27
4.3.3. Caracterización bioquímica de aislamientos ambientales	27
4.4. Caracterización genética de aislamientos ambientales	35
4.5. Cultivo, aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarbonoclastas	35
4.5.1. Cultivo y aislamiento a partir de MBL suplementado con crudo al 1 % v/v	35
4.5.2. Cultivo y aislamiento a partir de MBS suplementado con crudo al 1 % v/v	35
4.5.3. Identificación genética de bacterias con potencial hidrocarbonoclasta	40
4.5.4. Caracterización bioquímica de aislamientos con potencial hidrocarbo- noclastas	40
4.6. Biodegradación de crudo	44
4.6.1. Cuantificación de porcentajes de biodegradación en consorcios bacterianos	44
4.6.2. Selección de cepas para la cuantificación de tasas de biodegradación de crudo	44
4.6.3. Cálculo de curvas de crecimiento (UFC/mL)	44
4.6.4. Cuantificación de porcentajes de biodegradación en aislamientos hidro- carbonoclastas	47
4.7. Caracterización fenotípica complementaria de bacterias hidrocarbonoclastas (BHCC's)	48
5. Discusión	57
6. Conclusiones	65
7. Referencias	66

1. Resumen

Desde suspensiones de sustratos ambientales (agua, suelo y sedimento) de dos zonas con alta influencia petrolífera del país (Magdalena y Casanare) se aislaron a través de medios convencionales de cultivo, 200 cepas que conformaron la línea base de un catálogo de interpretación biológica bacteriana. En este estudio se hizo énfasis en el proceso de cultivo, aislamiento e identificación integral (morfológica, bioquímica y genética) de los aislamientos, con miras a la comprensión del repertorio y su dinámica funcional. La identificación molecular se basó en análisis genómicos a partir de la secuenciación de ADN y amplificación directa del gen 16s rARN desde biomasa bacteriana. Adicionalmente, a través del uso de un medio mínimo de sales suplementado con hidrocarburos al 1% v/v como única fuente de carbono, se identificaron 27 cepas con potencial hidrocarbonoclasta. Las cepas identificadas como tolerantes al crudo y consorcios bacterianos inoculados de muestras de suelo directamente, se sometieron a pruebas de biodegradación, evaluando la transformación porcentual de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en 30 días de incubación. Las tasas de biodegradación de HTP, se determinaron bajo un análisis de cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID) y se relacionaron con la cinética de crecimiento (UFC/mL) de los aislamientos a través del tiempo de incubación (30 días). Bajo el tiempo de observación y posterior a la **identificación molecular** se evidenció la biodegradación de los aislamientos miembros de géneros como: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*, en un rango entre el 53.66 y 82 % y en uno de los consorcios del 91.28 %. Las cepas evaluadas demostraron un importante potencial enzimático para degradar hidrocarburos y brindan la oportunidad de continuar con el estudio del potencial de biorremediación en áreas afectadas por contaminación de hidrocarburos.

2. Introducción

El crudo es un compuesto orgánico conformado principalmente por carbono e hidrógeno, producto de la degradación anaeróbica y meteorización de la materia orgánica en condiciones de alta temperatura y presión, durante varios millones de años en el subsuelo (Vargas, 2012). Los derivados del crudo o petróleo son conocidos como hidrocarburos, siendo definidos como una mezcla extremadamente compleja de compuestos orgánicos, donde varía su peso molecular en función de sus cadenas hidrocarbonadas (Rodríguez, 2008; Rossi, 2002). Los hidrocarburos totales de petróleo (HTP) pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares tales como cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos (Petro & Mercado, 2014). Los HTP se clasifican según su estructura molecular en cuatro grandes grupos: i) asfaltenos, la fracción más pesada y viscosa; ii) saturados e insaturados, como las parafinas y olefinas; iii) aromáticos, compuestos simples policíclicos; iv) compuestos polares de alto peso molecular como resinas (Jiménez H.G. et al., 2018; Rodríguez, 2008).

Los hidrocarburos y sus derivados son fuente fósil primaria de gran demanda, que se explota directamente en el sector industrial de transportes, comercial y de energía global con el objetivo de satisfacer la demanda de consumo de la humanidad (Al-Hawash et al., 2018; Jiménez H.G. et al., 2018). La necesidad de cumplir con el incremento de los estándares de vida contemporáneos y su producción comercial en el mundo, ha resultado en un incremento del 1.3% en la producción mundial de petróleo anual durante la década 2010-2020 (IEA, 2021; Olade, 2021).

La extracción, transporte, producción y exportación de crudo son la base de la industria petrolera alrededor del mundo. La infraestructura de producción de las petroleras depende de transportar el crudo y sus subproductos a través de oleoductos desde los pozos de explotación hasta las refinerías (Ecopetrol, 2019). La alta vulnerabilidad a siniestros por derrames de crudo comprende todas las etapas desde la exploración hasta la explotación y el transporte de hidrocarburos vía oleoductos, exacerbada por los altos índices en ataques y el mal mantenimiento de la infraestructura petrolera. El derrame de miles de barriles de crudo a causa de la explotación petrolífera es uno de los problemas ambientales de mayor impacto por la contaminación de sustratos edáficos, atmosféricos e hídricos con hidrocarburos de petróleo en todos los países productores y exportadores de crudo (Al-Hawash et al., 2018; Ecopetrol, 2019; Jiménez H.G. et al., 2018).

La cruda realidad es que los hidrocarburos, al entrar en contacto con un ecosistema natural, activan una serie de procesos fisicoquímicos simultáneos e intersistémicos entre el aire, el agua y el suelo (Martínez & Vergara, 2016; Miranda & Restrepo, 2005). En el aire, la combustión o volatilización de compuestos orgánicos del petróleo generan contaminantes particulados o volátiles (de Gouw et al., 2020; GCE, 2006). La calidad del aire se ve fuertemente afectada, en caso de un derrame, por la rapidez de la volatilización de los compuestos aromáticos

del petróleo, como el benceno, el tolueno y el naftaleno, siendo estos considerados gases de alta toxicidad (Middlebrook et al., 2011). De igual forma, en caso de un derrame derivado de una explosión se generan incendios a través de la combustión de los hidrocarburos. Los hidrocarburos en combustión terminan contaminando la atmósfera por la producción de material particulado y la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) directa e indirectamente relacionados con la producción de aerosoles (Miranda & Restrepo, 2005; Paulo Emílio V, 2013).

Los GEI que comúnmente se generan en el proceso de combustión de hidrocarburos son: el dióxido de carbono (CO_2); monóxido de carbono (CO); metano (CH_4) y compuestos orgánicos volátiles distintos del metano (COVDM) (de Gouw et al., 2020; GCE, 2006). Las emisiones de dióxido de carbono se derivan de la oxidación del carbono a partir de los combustibles durante la combustión. Las condiciones de combustión varían en función de la temperatura, presión y cantidad de hidrocarburos en disposición (Cerquera, 2016; GCE, 2006). En caso de que las condiciones de combustión sean óptimas, el contenido total de carbono de los combustibles debería convertirse en CO_2 . No obstante, en un sistema natural y no controlado la reacción de combustión no está perfectamente balanceada y termina en la subproducción de carbono no oxidado. El carbono no oxidado se puede liberar en pequeñas porciones a la atmósfera en forma de CO, CH_4 o COVDM (GCE, 2006; Miranda & Restrepo, 2005; Paulo Emílio V, 2013).

El sistema hídrico comúnmente es afectado en caso de un derrame de crudo, por la contaminación de las aguas superficiales mediante escorrentía o por la infiltración de crudo a través de las aguas subterráneas (Benavides et al., 2006; Miranda & Restrepo, 2005). Uno de los impactos más evidentes al sistema hídrico es la mancha generada por los hidrocarburos vertidos en sistemas lóticos (Benítez et al., 2021; Miranda & Restrepo, 2005). Los hidrocarburos, al entrar en contacto con el sistema modifican su composición química natural y estructura física. El crudo flota en la superficie por diferencia de densidad impidiendo la entrada de luz y el intercambio gaseoso (Benítez et al., 2021). La reducción de luz en el ecosistema incide directamente en la reproducción de los organismos fotosintéticos a cargo de la producción de oxígeno en el medio (Miranda & Restrepo, 2005). La disminución del oxígeno disuelto disponible genera una condición de envenenamiento del medio y afecta desde el tratamiento convencional para su potabilización y consumo humano; hasta la estructura biológica de toda la cadena trófica en el ecosistema (Benítez et al., 2021; Mills et al., 2003). Se ha logrado registrar el incremento en la presencia de especies reconocidas como oportunistas en medios contaminados por crudo, quienes son capaces de alterar y desplazar a las especies nativas, (Mills et al., 2003; Miranda & Restrepo, 2005; Rendón & Castro, 2012).

La ruptura o modificación significativa de la composición biológica se resumen en la desestabilización de la estructura biótica del ecosistema (Mills et al., 2003; Rendón & Castro, 2012). Los cambios abruptos en la dinámica biológica del medio reducen su potencial de auto regeneración, debido a que la cadena trófica se altera por completo y lo que finalmente queda

es probablemente un ecosistema diferente, con dinámicas de composición biológicas y relaciones abióticas entre sí no constitutivas (Benítez et al., 2021; Mills et al., 2003; Miranda & Restrepo, 2005).

Dependiendo de la magnitud del derrame, la profundidad freática y las condiciones geofísicas del área afectada, la infiltración de los compuestos más ligeros del crudo, pueden transportarse hasta los acuíferos en el subsuelo (Benítez et al., 2021; Rendón & Castro, 2012). La contaminación de los acuíferos con hidrocarburos implica la afectación a los reservorios más importantes, ya que representan más del 95 % del agua dulce disponible para consumo humano (Rendón & Castro, 2012). Sin embargo, los compuestos de petróleo más pesados tienden a acumularse en los primeros horizontes del suelo, formando una capa hidrofóbica que incide directamente sobre la dinámica funcional de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas del ecosistema completo (Atlas, 1991).

Los derrames de petróleo dan como resultado un desequilibrio en la composición de los bioelementos del suelo, siendo la relación adecuada entre el carbono, el hidrógeno el oxígeno y el nitrógeno (C:H:O:N) un parámetro fundamental para que las dinámicas bióticas se desarrollen con normalidad (Atlas, 1991; Petro & Mercado, 2014). La alteración física que los derrames de hidrocarburos ocasionan sobre los primeros horizontes del sistema edáfico resultan en la formación de agregados que induce a la pérdida de porosidad y terminan por afectar la cantidad de oxígeno disuelto en el medio, compactando el suelo y restringiendo la disponibilidad del oxígeno en perfiles más profundos (Atlas, 1991; Miranda & Restrepo, 2005; Petro & Mercado, 2014). La relación carbono-hidrógeno-nitrógeno (C:H:N), se ve obstruida por la presencia de hidrocarburos dada su estructura química basada en cadenas de carbono e hidrógeno (Atlas, 1991; Rossi, 2002). En resumen, los hidrocarburos son capaces de generar un desbalance químico general y provocar un déficit de nitrógeno (N) en suelos contaminados con crudo, a causa del aumento desproporcionado de hidrones (H^+), carbono (C) y la reducción de oxígeno disuelto (O_2) en el sistema (Benavides et al., 2006; Petro & Mercado, 2014; Rossi, 2002).

La alteración que los derrames de hidrocarburos causan sobre las propiedades físicas y químicas del suelo impactan directamente dentro del hábitat de la biota modificando el ecosistema completo (Díaz-martínez et al., 2013; Rossi, 2002). La reproducción de las poblaciones microbianas es alterada, al igual que la cobertura vegetal es inhibida (Petro & Mercado, 2014; Romero et al., 2008). La presencia de hidrocarburos en el suelo puede inhibir el crecimiento de las plantas mediante un fenómeno de sofocación atribuida al bajo desplazamiento del aire de los poros del suelo o el aumento de la actividad microbiana, induciendo a la insuficiencia de las reservas de oxígeno en las raíces de las plantas. (Atlas, 1991; Benavides et al., 2006; Romero et al., 2008). Asimismo, los cambios en la actividad microbiana afectan la dinámica de descomposición de la materia orgánica (M.O.) y en la producción de carbono orgánico (C.O.) (Atlas, 1991; Miranda & Restrepo, 2005; Petro & Mercado, 2014). El conjunto de alteraciones de condiciones abióticas en el sustrato son determinantes en el ciclo de vida de

la micro y macrofauna por el envenenamiento de su medio, que se resume en la muerte de millones de individuos por intoxicación. Sin embargo, también se generan nuevas redes tróficas relacionadas con el cambio en la composición y disposición de elementos en el medio (Miranda & Restrepo, 2005; Petro & Mercado, 2014).

La contaminación por petróleo crudo tiende a persistir en los suelos hasta el punto de modificar a largo plazo las relaciones intersistémicas entre la fase biótica y abiótica. La regulación y abastecimientos de nutrientes a través de la conformación de los ciclos biogeoquímicos son las principales actividades ecosistémicas que la biota ofrece al medio que habita (Frene et al., 2018; Petro & Mercado, 2014). La presencia de compuestos hidrocarbonados en el sustrato edáfico transforman la relación y composición de nutrientes disponibles para la microfauna y la conformación de redes tróficas, modificando el tipo de reacciones metabólicas y la estructura funcional entre el sustrato y sus microorganismos. (Díaz-martínez et al., 2013; Miranda & Restrepo, 2005; Petro & Mercado, 2014; Rossi, 2002).

La posibilidad de entender y aprovechar la funcionalidad metabólica que los microorganismos pueden ofrecer al medio alterado que habitan, ha motivado el interés en ampliar el conocimiento de las comunidades microbianas nativas presentes en medios con alta explotación petrolífera (Bidja et al., 2019; el-Din Sharabi & Bartha, 1993; Lors et al., 2010). La descripción de la riqueza funcional y diversidad molecular de las comunidades bacterianas en un bioma en condiciones ambientales alteradas, es la línea base que permite una visión holística de las relaciones intersistémicas de un nicho en específico y su potencial funcional. Un acercamiento en la estructura microbiana nativa debe estar compuesto por el registro y análisis en función de: i) composición de especies (diversidad); ii) abundancia (UFC/mL); iii) características fenotípicas y metabólica (Atlas, 1991; Jiao et al., 2021). La caracterización completa de un consorcio o grupo de bacterias dentro de una línea base, contribuye al conocimiento de la diversidad microbiana asociada y a la búsqueda de microorganismos eficientes, los cuales cumplen con funciones especializadas de interés dentro del ecosistema (Harcourt et al., 2006; Jiménez H.G. et al., 2018; Wu et al., 2017).

A partir de los resultados y categorización funcional de comunidades bacterianas en áreas afectadas por crudo, se ha comprobado que algunas especies de bacterias cuentan con la capacidad de metabolizar **algunos compuestos** de hidrocarburos, de manera que la presencia de poblaciones mixtas con diferentes capacidades metabólicas es necesaria para degradar mezclas complejas de hidrocarburos (Balba et al., 1998; Harcourt et al., 2006; Zhang et al., 2012). Las comunidades bacterianas que cuentan con la capacidad de degradar el petróleo para mineralizarlo como única fuente de carbono, se denominan bacterias hidrocarbonoclastas (BHCC) (Gogoi et al., 2003; Stefani et al., 2015; Wu et al., 2017; Zhang et al., 2012). Durante los procesos de biodegradación, las BHCC rompen los enlaces de H:C de los hidrocarburos, produciendo dióxido de carbono, metano y agua. Las BHCC se han convertido en objeto de estudio crucial como agentes biodegradantes y atenuantes naturales de ambientes contaminados por crudo (Baoune et al., 2019; Bidja et al., 2019; Wu et al., 2017; Zhang et al., 2012).

El proceso de biodegradación de hidrocarburos a través de BHCC varía en función de la estructura química del crudo y de la capacidad de metabolización del repertorio bacteriano (Balba et al., 1998; Ferrari et al., 2008; Petro & Mercado, 2014). El potencial de degradación de los hidrocarburos se asocia directamente con la longitud de cadenas hidrocarbonadas para los alcanos, alquenos y alquinos, siendo las más cortas los compuestos de más fácil asimilación (Bento et al., 2003; Ferrari et al., 2008; Fuentes et al., 2016). Para los compuestos más complejos como los aromáticos y saturados, su degradación varía en función del número de ramificaciones, anillos y presencia de otras moléculas; siendo más probable la degradación de estructuras más sencillas (Balba et al., 1998; Gogoi et al., 2003; Petro & Mercado, 2014).

Por otro lado, la metabolización de los compuestos de crudo está favorecida por la amplia capacidad enzimática de las BHCC (Alvaro et al., 2017; Iqbal et al., 2019; Silva et al., 2008). En general, la degradación inicial de los hidrocarburos simples requiere la acción principalmente de las enzimas oxigenasas y deshidrogenasas presentes en la membrana citoplasmática (Alvaro et al., 2017; Iqbal et al., 2019; Jiménez H.G. et al., 2018; Silva et al., 2008). Las oxigenasas son encargadas de catalizar la incorporación de los átomos de oxígeno para formar dihidroles, los cuales a su vez son oxidados a derivados hidroxilados que son los encargados del rompimiento de los enlaces de carbono en las cadenas hidrocarbonadas (Balba et al., 1998; Baoune et al., 2019; Jiménez H.G. et al., 2018). Finalmente, los compuestos hidroxilados se degradan a ácidos asimilables para síntesis celular y producción de energía (Bento et al., 2003). En el caso de los hidrocarburos policíclicos, el proceso se repite procesando primero los compuestos de menor peso molecular (Baoune et al., 2019; Jiménez H.G. et al., 2018; Petro & Mercado, 2014; Zhao et al., 2017). La degradación de los hidrocarburos aromáticos requiere la activación del anillo, para posteriormente lograr su ruptura. La activación de los anillos aromáticos se logra a partir de la deshidroxilación del núcleo o incorporación de oxígeno, transformándose en compuestos de menor peso molecular (Baoune et al., 2019; Bento et al., 2003; Jiménez H.G. et al., 2018; Wu et al., 2017; Zhao et al., 2017)

Los procesos de biodegradación de crudo por parte de las BHCC han mostrado un mejor resultado a partir del estudio de comunidades endógenas de lugares con antecedentes de contaminación constante por hidrocarburos en áreas de alta explotación petrolífera (Fuentes et al., 2016; Yergeau et al., 2012). Las comunidades endógenas nativas que han logrado ser aisladas, caracterizadas y asociadas a procesos hidrocarbonoclasticos, son en su mayoría procedentes de sistemas edáficos y miembros de géneros como: *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Streptomyces*, *Penicillium*, *Enterobacter*, *Serratia* y *Chrysporium* (Baoune et al., 2019; Iqbal et al., 2019; Spago et al., 2014; Varjani, 2017; Wu et al., 2017; Zhang et al., 2012). Las comunidades bacterianas son el grupo de microorganismos más abundante en los suelos, y probablemente el reservorio más grande de bacterias asociadas a procesos hidrocarbonoclastas (Banfield & Nealson, 1998; Silva et al., 2008; Stefani et al., 2015). Sin embargo, las tecnologías basadas en la manipulación de las comunidades microbianas todavía carecen de una base sólida de conocimiento sobre la ecología de los microorganismos, ya que menos del 1%

de las bacterias del suelo son cultivables hasta el momento (Bollmann et al., 2007; Chaudhary et al., 2019; Jiao et al., 2021; Mulligan & Yong, 2004; Zhang et al., 2012).

Con base en el bajo porcentaje de bacterias que hasta el momento se han logrado desarrollar como cultivables, ha iniciado el establecimiento de catálogos bacterianos como línea base de estudios de repertorio funcional. Los catálogos bacterianos consisten en bases de datos de bacterias conservadas, mantenidas puras y estables morfológica y genéticamente, de tal manera que puedan conservar sus características originales para ponerlos al servicio de la comunidad científica de acuerdo a intereses particulares de investigación científica (Gonzales & Jimenez, 2013). Los catálogos microbianos presentan ventajas, a nivel investigativo como servir de soporte de estudios, obviar el proceso de caracterización para estudios posteriores que dependan de características anteriormente investigadas y son un indicador importante de biodiversidad y riqueza de la zona de estudio (Gonzales & Jimenez, 2013).

Recientemente, proyectos internacionales relacionados con generación de bases de datos o catálogos bacterianos han iniciado a construirse con la intención de mejorar nuestra comprensión de la extensión y distribución de microbios en el planeta; entre ellos está incluido el Catálogo Global de Microorganismos (GCM) (Jiao et al., 2021), en el cual se cuenta con la representación de Colombia a través de las publicaciones de los aportes realizados por la facultad de Ciencias de la Universidad Javeriana. Este catálogo en línea proporciona una interfaz uniforme para que la comunidad científica e industrial accedan a la información completa sobre recursos microbianos. Se espera que el GCM sea un sistema robusto, confiable y fácil de usar para ayudar a las colecciones de cultivos a administrar, difundir y compartir la información relacionada con sus existencias (Jiao et al., 2021; Xu et al., 2021).

En Colombia la diversidad funcional bacteriana aún es un gran misterio. Esta perspectiva aborda la razón del esfuerzo que los estudios y análisis de caracterización microbiana demandan, e ilustra los desafíos y oportunidades en el estudio futuro de estos enigmas (Espinosa, 2019; Miranda & Restrepo, 2005; Petro & Mercado, 2014). El desconocimiento del repertorio funcional y diversidad de poblaciones bacterianas en torno a procesos hidrocarbonoclasticos genera la necesidad de profundización en estudios, para solventar la creciente problemática alrededor de la contaminación de ecosistemas con crudo y sus derivados en el país (Espinosa, 2019; Thompson et al., 2017).

En los últimos 10 años, los principales oleoductos de Colombia han sufrido atentados terroristas en más de mil ocasiones, generando el derrame de casi 3.7 millones de barriles de crudo (Asociación Colombiana de Petroleo(ACP), 2021). A las cifras se suman los barriles perdidos a través de válvulas ilícitas, a manos de grupos al margen de la ley (Martinez & Vergara, 2016). Afirma Ecopetrol que, en el país entre enero y junio del año 2021, se identificaron y retiraron cerca de 450 válvulas en los ductos de transporte de hidrocarburos (Ecopetrol, 2021). En el 70 % de los casos, la intervención ilegal de los oleoductos termina ocasionando explosiones y derrames de crudo sobre océanos, ríos y suelos (Avellaneda Cusarúa, 2013; Miranda & Restrepo, 2005).

El mal manejo de la infraestructura de antiguos oleoductos es también en causal de derrames, siendo los errores en cierres de pozos antiguos la razón más común de afloramientos de hidrocarburos en zonas de alta influencia petrolífera (Ecopetrol, 2020). Los derrames de crudo en Colombia se pueden derivar de causas naturales, logísticas, políticas o sociales. Sin embargo, aunque las causas varíen, las consecuencias no (Avellaneda Cusarí, 2013; Miranda & Restrepo, 2005). A pesar de las sucesivas bonanzas que el petróleo genera, la problemática afecta la calidad de vida de comunidades aledañas a las zonas de influencia petrolera en Colombia por el envenenamiento de sus ecosistemas (Cerquera, 2016). El crudo destruye recursos naturales y atrae situaciones de conflicto que se proyectan más allá de las regiones directas de extracción (Martínez & Vergara, 2016).

El propósito general de este estudio es el mejoramiento del conocimiento de riqueza microbiana nativa en dos zonas de alta influencia petrolífera de Colombia (Casanare y Magdalena), mediante la creación de una línea base de interpretación biológica del repertorio funcional y un análisis informático con anotaciones genómicas de aislamientos bacterianos de consorcios y aislados biodegradadores, con potencial biorremediador de suelos. El análisis central se basa en comparar las tasas de biodegradación de los aislamientos y consorcios bacterianos de las dos zonas de estudio, en correlación con las propiedades fisicoquímicas (% de HTP) de los suelos cada área. Las tasas de biodegradación de HTP, se evaluaron bajo un análisis de cromatografía de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID). El aislamiento y caracterización molecular consiste en análisis genómicos a través del enriquecimiento de sustratos con crudo, la secuenciación de ADN y amplificación del gen 16S rARN de aislamientos de suelos con y sin trazas de hidrocarburos de petróleo.

3. Materiales y métodos

3.1. Origen y toma de muestras

Las muestras fueron extraídas de dos zonas petrolíferas de Colombia, seleccionadas por Ecopetrol y el Instituto Alexander von Humboldt bajo el marco del programa de *cooperación Fibras*. Por solicitud de Ecopetrol, se ha excluido de este documento la información de georreferenciación de cada uno de los sitios de muestreo. La primera zona de estudio corresponde al Piedemonte Llanero en el departamento de Casanare (en adelante, Casanare). Según el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM), esta zona está ubicada en la transición entre la Cordillera Oriental y la Altillanura inundable, siendo definida como una subregión que se encuentra entre los 300 y 700 msnm, con temperaturas medias de 23 a 30 °C (IDEAM, 2012; Pabón, 2012). En el Piedemonte Llanero se eligieron 9 sitios de muestreo alrededor de la zona de explotación petrolífera (ver Figura 1). Un tercio de los puntos muestreados, fueron afectados en el 2020 por derrames a causa de ataques terroristas.

La segunda zona muestreada se ubica en el Magdalena Medio (en adelante, Magdalena), región que corresponde al valle interandino del río Magdalena desde la ciudad de Honda en el departamento del Tolima hasta la entrada del río a las llanuras costeras del mar Caribe (IDEAM, 2012). El Magdalena medio se caracteriza por ser una de las áreas más prolíficas en reservas hidrocarburíferas de la Cordillera de los Andes y de las regiones más cálidas de Colombia, con una temperatura media diaria máxima de 32 °C (Pabón, 2012). Para este muestreo se tomó el área de la región que corresponde al departamento de Santander. En esta zona se tomaron 12 sitios de muestreo (ver Figura 2), teniendo registro de que todos los puntos fueron afectados por derrames y/o afloramientos de crudo dentro del último año. La información obtenida de los antecedentes de cada punto fue proporcionada directamente por Ecopetrol S.A., en el año 2020.

En cada punto se tomaron muestras de tres sustratos (agua, suelo y sedimento), dependiendo de la disponibilidad en campo de cada área de estudio. Por cada punto y sustrato se tomaron muestras por triplicado separados entre sí por 30 m. Cada una de las muestras colectadas fue homogeneizada a partir de tres muestras. Las muestras se tomaron a 10 cm de profundidad, 500 g de suelo/sedimento y 1 L de agua. Inmediatamente después del muestreo, el material fue almacenado en neveras de icopor y se mantuvieron refrigeradas.

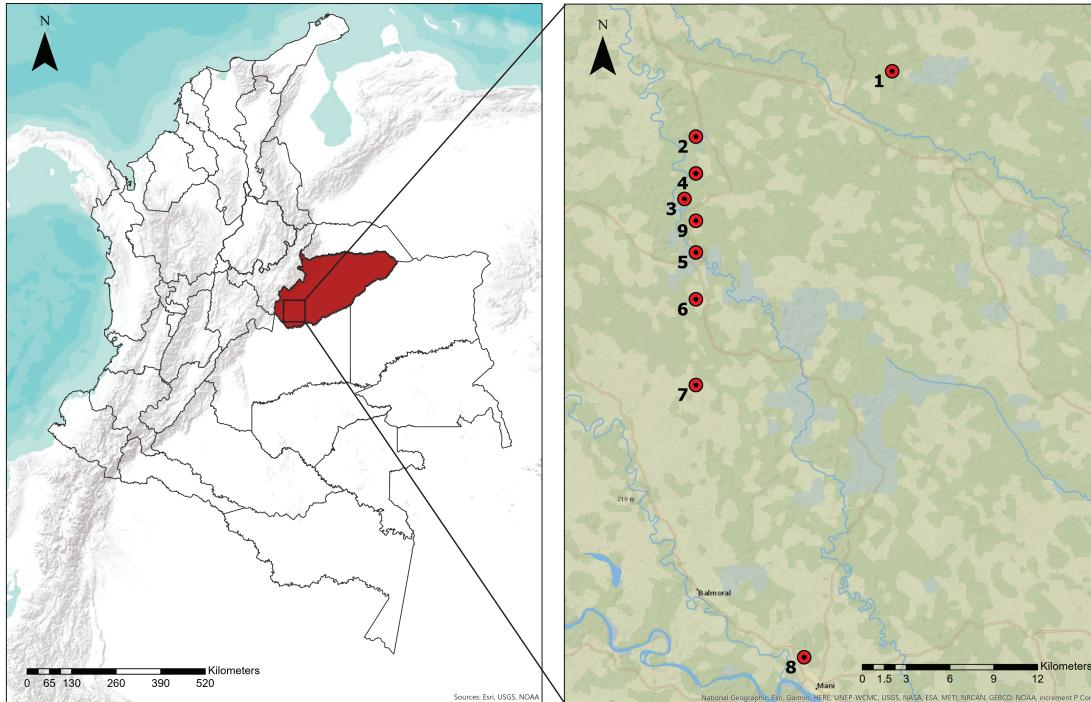


Figura 1: Puntos de muestreo área: Casanare. En la figura se visualizan los 9 puntos de recolección de muestras para los tres sustratos: agua suelo y sedimento. *La ubicación de todos los puntos en el mapa ha sido distorsionada ligeramente de manera aleatoria para ocultar la ubicación exacta del sitio de muestreo, a pedido de Ecopetrol.*

3.2. Caracterización fisicoquímica del crudo

Todos los análisis fisicoquímicos del crudo, fueron realizados por el laboratorio de ensayos PROASEM S.A.S. El crudo en análisis fue proporcionado por Ecopetrol, extraído del campo Lisama TK-0202 en el Magdalena. Para la determinación de las distintas familias de hidrocarburos en la muestra se usó el método ASTM D7169-19, siendo una prueba estándar para la distribución del punto de ebullición de muestras con residuos como petróleo vacío mediante cromatografía de gases de alta temperatura. Los análisis de estructura física incluidos viscosidad, punto de inflamación y gravedad API, se determinaron bajo las normas ASTM D445-19, ASTM D56-16a, ASTM D5002-19 respectivamente. Las pruebas de composición química en cuanto contenido de sales totales, metales pesados, asfaltenos y parafinas se analizaron siguiendo los protocolos ASTM D3230-19, ASTM D5863-00a, ASTM D6560-17, y UOP 46-85, respectivamente. La concentración de fracciones livianas de crudo en gases tales como me-

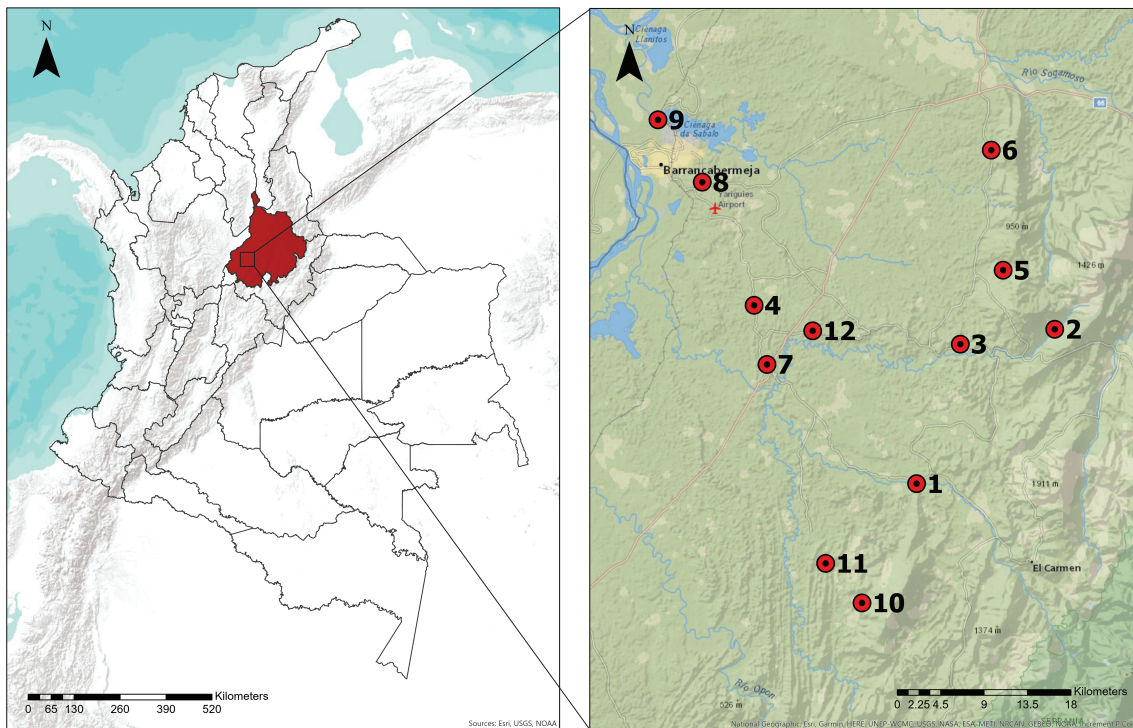


Figura 2: Puntos de muestreo área: Magdalena medio. En la figura se visualizan los 12 puntos de recolección de muestras para los tres sustratos: agua suelo y sedimento. *La ubicación de todos los puntos en el mapa ha sido distorsionada ligeramente de manera aleatoria para ocultar la ubicación exacta del sitio de muestreo, a pedido de Ecopetrol.*

tano, etano, propano, iso-butano, *n*-butano, *iso*-pentano, *n*-pentano y 2,2-dimetilpropano, se realizaron siguiendo los parámetros descritos en la norma ITM-6008-18.

3.3. Caracterización química de sustratos

Las muestras de ambas áreas de estudio de los sustratos de agua, suelo y sedimento fueron enviadas a los laboratorios de la Universidad Industrial de Santander para análisis de concentración de hidrocarburos totales de petróleo al igual que de grasas y aceites. La cuantificación de concentración en porcentaje (p/v) de hidrocarburos totales de petróleo (% HTP), grasas y aceites (%), se realizó aplicando el método gravimétrico/SM 520 B y F.

3.4. Medios de cultivo

La preparación de los distintos medios de cultivo, se basaron en las metodologías aplicadas por (Omari et al., 2018; Stefani et al., 2015; Ueno et al., 2007), con algunas adaptaciones según se describe a continuación.

3.4.1. Medio para el aislamiento de bacterias ambientales generales

Para el aislamiento de bacterias ambiental generales se utilizó el medio sólido R2A de CHD (New Delhi, India), preparado a una concentración de 0.1x sobre la concentración estándar, usando agar al 1.5 % (p/v) (Sigma-Aldrich; San Louis, MO, USA) como agente gelificante. Con el fin de restringir el crecimiento de organismos eucariotas (hongos, oomicetos, etc.), el medio se suplementó con cicloheximida (CDH; New Delhi, India) a concentraciones finales de 100 mg/L. Los cultivos axénicos fueron mantenidos en medio R2A (0.1x) sin cicloheximida.

3.4.2. Medio de cultivo para el aislamiento de bacterias ambientales hidrocarboclastas

El proceso de aislamiento de BHCC's se realizó en Medio Basal Líquido (MBL) y Medio Basal Sólido (MBS); ambos suplementados con crudo al 1 % originario de cada una de las zonas de estudio (Magdalena o Casanare). El crudo usado en esta investigación fue puesto a disposición por Ecopetrol S.A. directamente. La fracción basal de ambos medios se compone por litro de: 1 g, NH_4NO_3 ; 0.1 g, KH_2PO_4 ; 0.4 g, CaCl_2 ; 0.06 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Posterior a su esterilización, el medio fue suplementado con 1 mL de Solución Stock (1000x) de vitaminas, la cual se compone por litro: 2 mg, biotina; 2 mg, ácido fólico; 10 mg, piridoxina; 5 mg, tiamina; 5 mg, riboflavina; 5 mg, ácido nicotínico; 5 mg, pantotenato de calcio; 0.1 mg, cobalamina; 5 mg, ácido *p*-aminobenzoico. El MBS se preparó adicionando agar bacteriológico (1.5 % p/v) como agente gelificante al MBL. El crudo se adicionó al medio previamente esterilizado en una concentración de 1 % (v/v).

3.5. Cultivo, aislamiento de bacterias ambientales

Para el cultivo, aislamiento de todos los aislados puros se tuvo en cuenta los protocolos de: (Abasolo & Morante, 2019; Esaú López-Jácome et al., 2014; Fernández, 2017; MacFaddin, 2003; Stefani et al., 2015), con algunas adaptaciones según se describe a continuación.

De cada una de las muestras compuestas por punto se tomó 1 g de suelo, 1 g de sedimento o 1 mL de agua según el sustrato. Las muestras se llevaron a suspensión con 9 mL de agua

estéril y a partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas con relación 1:10, desde 10^{-4} hasta 10^{-7} . Se usaron tubos plásticos tipo Eppendorf con 900 μL de agua estéril y 100 μL de muestra para cada dilución. Se sembraron 100 μL por plateo en cajas de Petri sobre medio R2A 0.1x, para ser incubados durante 6 días a temperatura ambiente (20–22 °C). Posterior al tiempo de incubación se realizó la cuantificación bacteriana, buscando la dilución contable (entre 30-300 colonias) y se calcularon las unidades formadoras de colonia (UFC/mL). Posteriormente, se realizaron repiques sucesivos mediante agotamiento por estría en medio R2A 0.1x, hasta la obtención de aislamientos puros.

3.6. Caracterización fenotípica y genética de aislamientos ambientales

3.6.1. Caracterización morfológica de bacterias ambientales

Una vez los cultivos iniciaron a mostrar crecimiento en placa, se procedió con la codificación y registro de las diferentes características físicas de las colonias, evaluándolas en función de su tamaño, forma, elevación, borde, margen, textura y color. La descripción celular de cada uno de los aislados se realizó mediante tinción de Gram, con la intención de verificar morfología, coloración y rectificar la pureza de los aislamientos. De cada uno de los aislados se documentó su morfología celular y de colonia a partir de evidencia fotográfica.

3.6.2. Caracterización bioquímica de aislamientos ambientales generales

La identificación de las rutas metabólicas de los aislamientos se evaluó a través de pruebas bioquímicas, usando las galerías del sistema API 20E y API 20Strep (BioMérieux, Marcy-l'Étoile; France). En función del resultado de la coloración en la tinción de Gram, se discriminó el uso de la galería API 20E para las bacterias Gram-negativas, por lo contrario, los aislados identificados como Gram-positivos se testearon con la galería API 20Strep. Cada una de las galerías API se compone por 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados, la discriminación de los sustratos para cada galería se encuentran en la **tabla 1**. Los microtubos se inocularon de acuerdo al protocolo del fabricante con una suspensión bacteriana que reconstituye los sustratos deshidratados. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos. A partir de los resultados de cada reacción, se realizó un dendrograma de similitud, a partir de la normalización de datos bajo la función: *Decostand* y posteriormente ejecutando una función de distancia euclidiana: *vegdist*, los resultados fusionados secuencialmente se expresaron gráficamente en RStudio Version 1.3.1056.

Tabla 1 : Abreviaturas de los test para las galería API 20Strep y 20E. La tabla contiene los diferentes sustratos a los que fueron puestos a prueba los distintos aislados bacterianos. Cada una de las abreviaturas, representa una enzima y su reacción al virar de color.

Galería_20Strep		Galería_20E	
Test	Enzima/reacción	Test	Enzima/reacción
VP	Cetona/producción	ONPG	Orto-Nitrofenil-βDgalactopiranosidasa
ESC	glucosidasa (ESculina)/hidrólisis	ADH	Arginina-Dihidrolasa
PYRA	PIRolidonil Arilamidasa	LCD	Lisina Decarboxilasa / Lisina
aGAL	a-GALactosidasa	ODC	Ornithine Decarboxilase
bGUR	β-GALactosidasa	CIT	CITrato/Alcalinización
BGAL	β-GLUconidasa	H2S	Producción de H2S
PAL	Fosfatasa Alcalina	URE	UREasa
LAP	Leucina AminoPeptidasa	TDA	Triptofano DeAminasi / Triptofano
ADH	Arginina-Dihidrolasa	IND	INDol/producción
RIB	RIBosa/acidificación	VP	Cetona/producción
HIP	Ácido HIPúrico/ hidrólisis	GEL	Gelatinase (GELatine) / Gelatinasa
ARA	ARAbinose/acidificación	GLU	GLUCosa/Fermentación
MAN	MANitol/acidificación	MAN	MANitol/acidificación
SOR	SORbitol/acidificación	INO	INOSitol/oxidación
LAC	LACTosa/acidificación	SOR	SORbitol/acidificación
TRE	TREhalosa/acidificación	RHA	RHAMnosa/acidificación
INU	INULina/acidificación	SAC	SACarosa
RAF	RAFinosa/acidificación	MEL	AMYgdalin/Oxidación
AMD	AIMiDón/acidificación	AMY	MELibiosa/Fermentación
GLIG	GLICóGeno/acidificación	ARA	ARAbinose/acidificación
		NO2	Reducción al estado N2
		N2	Producción de NO2

3.6.3. Identificación molecular de aislamientos

Para la caracterización genética de todos los aislamientos, incluidos los aislamientos hidrocbonoclastas, se recuperó la biomasa sólida seca con el objetivo de generar suspensiones de ADN a partir de cultivos líquidos bacterianos para amplificación de fragmentos genómicos de interés mediante PCR directa sin extracción de ácidos nucleicos.

3.6.4. Preparación de aislamientos para PCR directa de 16S ARNr

Una vez confirmada la pureza de la totalidad de los aislamientos, se procedió a sembrar cada una en caldo de soja triptico por sus siglas en inglés (TSB). Los aislamientos fueron inoculados en tubos Eppendorf con 1 mL de medio líquido TSB. La incubación se realizó durante 48 horas a temperatura ambiente (22 °C – 24 °C). Posterior a la incubación, los aislamientos fueron centrifugados a 12000 rpm por 3 min en 3 repeticiones (la primera centrifugación permitió desechar el sobrenadante del medio líquido, las dos siguientes se aplicaron añadiendo agua estéril con el fin de eliminar trazas de medio). Una vez la biomasa se recuperó se sometió a choque térmico par ayudar a la rotura celular, pasando por una fase de de 4 horas a -80 °C, continuando por 10 min, a 94 °C en baño María y regresando a -80 °C por 4 horas, para finalmente ser liofilizada en un liofilizador (Virtis 4K, SP Scientific; NY) durante 4 horas a 41 mlb y a una temperatura de -75 °C.

La biomasa de los aislamientos fue suspendida en 50 μ L de agua estéril. A partir de la suspensión se realizaron dos diluciones una en relación 1:50 y la otra en relación 1:100. El gen ribosomal 16S ARNr fue amplificado usando los cebadores 8F (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'). El *master mix* se preparó de acuerdo a lo indicado en la Tabla 1. La cepa *Escherichia coli* DPFV 052 y agua libre de nucleasas (LDN), fueron usados como control positivo y negativo, respectivamente. Todos los reactivos empleados para la PCR fueron obtenidos de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA; USA). Los componentes de la reacción de amplificación se detallan en la tabla 2. La reacción de PCR se programó en termociclador (Bio Rad C100), bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de pre-desnaturalización a 94 °C por 5 min; 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 segundos; la temperatura anillamiento fue de 54 °C por un min; 72 °C por 1 min y medio de extensión y 72 °C por 5 min para la extensión final. Las muestras producidas posterior a la PCR se procesaron en un gel con una concentración de agarosa al 1.2 % de Panreac (Glenview, IL USA) y de TBE (1X) de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA; USA). Se utilizó un Ladder de 1 Kb de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA; USA). El gel se corrió por 90 min a 70 V, con el fin de corroborar la amplificación.

Tabla 2: Composición de reacciones de amplificación.

Reactivo	Inicial	Volumen
Buffer Taq	10x	2 μL
$MgCl_2$	25mM	1.2 μL
dNTP's	10mM	0.4 μL
Primer F	10mM	0.2 μL
Primer R	10mM	0.2 μL
Taq	5U/ μL	0.08 μL
Suspensión celular	–	1 μL
H_2O libre de nucleasas	–	para volumen total de 20 μL

3.6.5. Caracterización molecular de aislamientos

A partir de la amplificación del gen del 16S ribosomal, los productos de PCR fueron secuenciados usando Sanger, en el centro de secuenciación de la Universidad de los Andes (Bogotá). Desde los resultados de las secuencias entregadas se ensambló las lecturas “forward” y “reverse”, eliminando los fragmentos laterales con el software Geneious Prime. Las secuencias crudas generadas, se identificaron mediante la base de datos Silva en su última versión 138.1 actualizada en agosto del 2020.

3.6.6. Construcción filogenética

La construcción filogenética se realizó con base en los protocolos de (Darriba et al., 2012; Minh et al., 2020), con algunas modificaciones como se describe a continuación.

Todas las secuencias se alinearon en Geneious Prime, usando parámetros de alineación predeterminados en MUSCLE. Los árboles de genes de entrada se estimaron en IQ-TREE v.2.1.2. El modelo de evolución de sustitución de nucleótidos más adecuado para cada locus se determinó según el criterio de información bayesiano (BIC) implementado en jModelTest2. El soporte de la sucursal se evaluó con 5000 réplicas de arranque utilizando la aproximación de arranque ultrarápida. La visualización final y edición de características especiales de árboles de genes, fue desarrollado en Itool.

3.7. Identificación molecular consorcios bacterianos

Para la caracterización genética de las bacterias presentes en los medios enriquecidos con crudo, se procedió a realizar una recuperación de la biomasa sólida. El proceso de recuperación de biomasa sólida se inició desde los enriquecimientos en estado líquido, siendo el MBL suplementado con crudo al 1%, la fuente directa de la recuperación de biomasa. La liofilización de la biomasa recuperada a partir de los enriquecimientos se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita previamente. La biomasa una vez liofilizada se usó como muestra directa para la extracción de ADN a partir del kit comercial NucleoSpin™ Soil (Machery-Nagel™). De forma general, la extracción se llevó a cabo usando aproximadamente 500 mg de la biomasa liofilizada de cada una de las muestras, siguiendo el protocolo y las recomendaciones del fabricante. El protocolo de extracción se siguió hasta obtener el ADN retenido en las columnas con membranas de sílice. Las columnas con el ADN extraído fueron preservadas en seco y depositadas en contacto con perlas de gel de sílice para remover la humedad. En total se obtuvieron 12 extracciones de ADN, las cuales fueron enviadas al centro de secuenciación de la Universidad de los Andes (Bogotá) para su posterior elución, cuantificación y secuenciación metagenómica. Los pormenores del proceso de secuenciación metagenómica y metabarcoding se encuentran a cargo de la agencia contratante. Información que hasta el momento se encuentra en procesamiento.

3.8. Cultivo, aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarbonoclastas

3.8.1. Cultivo y aislamiento a partir de MBL suplementado con crudo al 1% v/v

A partir de las suspensiones obtenidas en campo por cada uno de los tipos de muestra (suelo, agua, sedimento), se realizó la inoculación de los medios suplementados con crudo. La inoculación fue aplicada en tubos Hungate a partir de 100 μL de cada muestra directamente sin diluciones en MBL suplementado con crudo al 1%. Los medios fueron colocados horizontalmente en la incubadora a 37 °C con agitación de 120 rpm por 15 días. Pasado el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 100 μL de cada repetición y fue sembrado en medio MBS suplementado con crudo al 1% v/v, mediante el método de esparcimiento en placa. Los medios fueron monitoreados en los días 3, 6 y 10 de incubación. Después del décimo día, los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente, dado que temperaturas entre los 20-22 °C pueden alargar la vida útil del cultivo.

3.8.2. Cultivo y aislamiento a partir de MBS suplementado con crudo al 1 % v/v

Una vez los cultivos en placa con MBS suplementado con crudo al 1 % iniciaron a mostrar crecimiento, se realizaron repiques sucesivos mediante agotamiento por estría en MBS suplementado con crudo al 1 %, hasta la obtención de aislamientos puros. Las propiedades físicas del crudo usado dificultó el proceso de la caracterización morfológica de los cultivos, por lo cual se procedió a realizar repiques sucesivos en medio general R2A 0.1x, y se verificó su crecimiento nuevamente en MSB suplementado con crudo al 1 % v/v. Los aislamientos que mostraron resistencia al medio y cumplieron con la verificación de crecimiento posterior a tres repiques en MBS con crudo al 1 %, se categorizaron como bacterias con potencial hidrocarbonoclasta.

3.8.3. Caracterización morfológica de aislamientos con potencial hidrocarbonoclasta en R2A 0.1x

Las cepas caracterizadas con potencial hidrocarbonoclasta a partir de la confirmación del crecimiento en MBS con crudo originario de cada zona al 1 % como única fuente de carbono, se caracterizaron inicialmente a partir de los aislamientos en R2A 0.1X. La morfología colonial fue evaluada en función de: tamaño, forma, elevación, borde, margen, textura y color. La descripción celular de cada uno de los aislados se realizó mediante tinción de Gram, con la intención de verificar morfología, coloración y rectificar la pureza de los aislamientos. De cada uno de los aislados se documentó su morfología celular y en colonia a partir de evidencia fotográfica.

3.8.4. Caracterización bioquímica de aislamientos con potencial hidrocarbonoclastas

Los aislamientos definidos como hidrocarbonoclastas, por ser organismos con rutas metabólicas de interés especial, fueron sometidos a los sustratos de las galerías API20E y API 20Strep en conjunto, con la intención de ampliar el espectro de metabolismos a analizar. Cada una de las galerías API, se compone por 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados. Los microtubos se inocularon de acuerdo a su protocolo con una suspensión bacteriana que reconstituye los sustratos deshidratados. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos. A partir de los resultados de cada reacción, se realizó un dendrograma de similitud, a partir de la normalización de datos bajo la función: *Decostand* y posteriormente ejecutando una función de distancia euclidiana: *vegdist*, los resultados fusionados secuencialmente se expresaron gráficamente en RStudio Version 1.3.1056.

3.9. Cuantificación de tasas de biodegradación de crudo

Para la evaluación de las tasas de biodegradación de los aislamientos previamente identificados como hidrocarbonoclastas y los consorcios en enriquecimientos se tuvo en cuenta los protocolos de:(Alvaro et al., 2017), con algunas adaptaciones según se describe a continuación.

3.9.1. Biodegradación de crudo por consorcios bacterianos del sustrato: suelo

A partir de las suspensiones obtenidas en campo (1 g de suelo a 9 mL de agua) de todos los puntos de muestreo, se realizó la inoculación de los medios suplementados con crudo. La inoculación se desarrolló en tubos Hungate a partir de 100 μ L de cada suspensión directamente sin diluciones en MBL suplementado con crudo al 1% v/v por triplicado. Los medios fueron puestos horizontalmente en la incubadora a 37 °C con agitación de 120 rpm durante los 30 días del experimento. Los ensayos de biodegradación para comunidades bacterianas, fueron aplicados únicamente a las 12 muestras de suelo del área de Magdalena, siendo el área que previamente se vio afectada por hidrocarburos y se corroboró vía análisis químico que el suelo fue el sustrato que indicó concentraciones más altas de THP.

3.9.2. Selección de cepas para la cuantificación de tasas de biodegradación de crudo

La cuantificación de tasas de degradación de crudo, demandó contar con una muestra de hidrocarburos previamente analizada y caracterizada. Para efectos de este estudio, se realizaron lo análisis fisicoquímicos completos para la zona de Magdalena, siendo esta una información de base fundamental para dar inicio a los análisis de degradación. Aquellos aislamientos del área de Casanare con su caracterización fenotípica completa a partir de los medios suplementados con crudo al 1% v/v propio de la zona, se evaluaron usando crudo de la zona de Magdalena al 1% v/v, a consecuencia de la falta de información y descripción fisicoquímica completa del hidrocarburo del área de Casanare. Los aislamientos que confirmaron la resistencia al hidrocarburo de Magdalena como única fuente de carbono en MBS al 1% v/v, se usaron para las pruebas de degradación.

3.9.3. Cálculo de curva de crecimiento (UFC/mL)

A cada una de las BHCC's seleccionadas para la determinación de tasas de biodegradación se le evaluó en función de la capacidad degradativa porcentual de HTP y su densidad celular (UFC/mL). Para el cálculo de UFC/mL se activó cada

una de las cepas hidrocarbonoclastas en tubos de ensayo que contenían 10 mL de MBL sin crudo. El MBL se preparó a una concentración de 0.1 x, por litro con: 0.5 g, extracto de levadura; 0.5 g, de peptona; y 0.5 g, C₆H₁₂O₆ como fuentes de carbono. Los tubos inoculados fueron puestos horizontalmente en la incubadora a 37 °C con agitación de 120 rpm por 24 horas. Durante el tiempo de incubación se evaluó la cinética de crecimiento a partir de la densidad óptica (DO). La DO se midió en un espectrofotómetro UV-Visible Genesis 180 de Thermo Scientific (Waltham, MA; USA) con una longitud de onda de 600 nm, cada 6 horas por triplicado.

Una vez determinada la curva de crecimiento para cada una de las BHCC's, se procedió a estandarizar el tiempo de inoculación de todos los aislados a una DO₆₀₀ de 0.3. A partir de 100 µL de muestra extraída de los MBL sin crudo, se inoculó en tubos Hungate que contenían 10 mL de MBL suplementado con crudo al 1 %. Los medios fueron puestos horizontalmente en la incubadora (37 °C/120 rpm) por 30 días. La verificación y conteo de colonias en cada repetición se realizó al momento de inoculación y cada 5 días hasta el día 30. Para obtener el cálculo de las UFC/mL, se realizaron diluciones seriadas (10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸) a partir de 100 µL de inóculo extraídas del MBL con crudo al 1 %. Posteriormente, se tomaron 100 µL de cada una de las diluciones y fueron sembradas por triplicado bajo el método de esparcimiento en caja en un medio R2A (0.05 x), y fueron incubadas a 37 °C por un máximo de 48 horas. El recuento de colonias y cálculo de UFC/mL total se registró a las 12, 24 y 48 horas posteriores a la siembra en caja para intentar documentar el número asintótico de de UFC.

3.9.4. Cuantificación de porcentajes de biodegradación

Los análisis de porcentajes de biodegradación se realizaron a partir de una alícuota de 100 µL, extraída de: i. Los 12 ensayos para comunidad bacteriana en MBL con suspensión directa de suelo y crudo al 1 % v/v; ii. Cada una de las 12 cepas hidrocarbonoclastas inoculadas en MBL suplementado con crudo al 1 %. El proceso de muestreo se repitió cada 15 días hasta el día 30 desde el momento de incubación, tomando este punto como el día 0. Las muestras se tomaron por triplicado para los análisis de degradación de HTP en los días días 0, 15 y 30 para cada una de las cepas. La degradación de HTP fue verificada por GC-FID, usando un cromatógrafo de gases Perkin Elmer Modelo Autosystem XL. Los componentes fueron separados sobre una columna Elite - 5 de Perkin Elmer (60 m x 0.32 mm ID x 0,10 µm), la temperatura del inyector se llevó a 50 °C por dos minutos y posteriormente fue programada a 250 °C por 5 minutos. La temperatura del inyector y del detector fueron 200 °C y 250 °C respectivamente. El flujo de gas fue helio de 0.5 mL/min a 6.0 psi; el volumen de inyección fue 1 µL.

Con base a los resultados de la cromatografía, se logró relacionar el tiempo de retención (minutos), con el área (µV.s), expresada en porcentaje %.

Los HTP fueron clasificados según su tiempo de retención en compuestos livianos (0-15 minutos), medianos (15-30 minutos) y pesados (30-46 minutos). Se determinó la fluctuación del área en % para cada uno de los compuestos de HTP, luego de permanecer en incubación con los aislados hidrocbonoclastas en el día 15 y 30 de muestreo. Por último, se cuantificaron los porcentajes de degradación de compuestos pesados, medianos y livianos tomando como referente la cromatografía y caracterización físico química en el día 0 de muestreo.

3.10. Caracterización fenotípica complementaria de bacterias hidrocbonoclastas (BHCC's)

3.10.1. Prueba deshidrogenasa en BHCC's

A partir de los aislamientos puestos en incubación en MBL suplementado con crudo al 1 % v/v; se extrajo 100 μ L a los 30 días de incubación, como inóculo para sembrar bajo el método de esparcimiento en placa, en medio R2A en concentración 0.1x con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) (CDH; New Delhi; India) al 10 % v/v, como indicador redox de compuestos orgánicos a partir de la catalización de la enzima deshidrogenasa (coloración roja/rosa). Los cultivos se incubaron a 37 °C por 48 horas. Las colonias cultivadas bajo este método se aislaron y caracterizaron por separado. Se registró la morfología de cada colonia en este medio en función de: tamaño, forma, elevación, borde, margen, textura y color. De cada uno de los aislados se documentó su morfología celular y en colonia a partir de evidencia fotográfica.

3.10.2. Microscopia electrónica de barrido

De cada una de las BHCC's se obtuvo muestra de biomasa a partir de cultivo fresco en R2A 0.1x. Las células bacterianas fueron fijadas usando glutaraldehído al 2.5 % (v/v) en PBS 0.06M con pH 7.5 como buffer. Se tomó 1 mL de buffer por cada muestra en tubos Eppendorf y se dejó en suspensión por 12 horas a 4 °C. Posterior al tiempo de fijación, se retiró el buffer centrifugando a 10000 rpm por 3 minutos a 4°C. Una vez retirado el buffer, se enjuagó las muestras con 1 mL de PBS 0.06 y se descartó el sobrenadante posterior a repetir el proceso de centrifugación. Con la muestra ya fijada, se continuó con la deshidratación progresiva de las muestras usando etanol en concentraciones (v/v) del 30, 50, 70, 80, 90 hasta el 100 % de alcohol. Las muestras fueron puestas en contacto con 1 mL de alcohol en sus distintas concentraciones por 15 minutos cada uno y dos veces en alcohol puro. Posterior al tiempo de contacto de la muestra en cada alcohol, se retiró el sobrenadante repitiendo las condiciones de centrifugación. Las muestras que no fueron analizadas inmediatamente se conservaron en 80 % de alcohol a 4°C concluyendo su deshidratación inmediatamente antes de su observación. Con la

biomasa bacteriana fijada y deshidratada en tubos Eppendorf, se resuspendieron las muestras en 30 μ L de alcohol al 100 %, se vertieron sobre trozos de papel filtro y se dejó secar por 30 minutos en cabina de flujo laminar. Con la muestra seca en los trozos de papel filtro, se procedió a congelar usando nitrógeno líquido. Las muestras en estado sólido fueron llevados inmediatamente a liofilizar en un liofilizador (Virtis 4K, SP Scientific; NY) durante 4 horas a 41 mlb y a una temperatura de -80 °C. Finalmente, Las células bacterianas liofilizadas, fueron metalizadas y llevadas al microscopio de barrido (EVO M10, Zeiss;DEU), para su procesamiento.

3.10.3. Prueba de fluorescencia para BHCC

Con el objetivo de verificar la producción de pigmentos verde-amarillo solubles en agua en las cepas aisladas y previamente identificadas como hidrocarbonoclastas, se procedió a cultivar cada una en medio King B, compuesto de 1 L por: 15 g de agar bacteriológico (Sigma-Aldrich; San Louis, MO, USA); 20 g de peptona, 1.5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1.5 de K_2HP0_4 ; y 10 mL de glicerol. Los cultivos se realizaron en placa, sembrando por punto 15 μ L de cada una de las cepas en medio líquido. Todas las muestras se cultivaron en repetición al lado de una colonia de *Pseudomonas fluorescens* como control positivo de fluorescencia. La incubación se realizó a 37 ° C por 24 horas.

4. Resultados

4.1. Caracterización fisicoquímica del crudo

Los resultados de la caracterización para algunas propiedades físicas y químicas de los hidrocarburos, en la muestra de crudo extraída de Magdalena (Campo Lisama TK-0202) se encuentran resumidas dentro de la Tabla 2, con su respectivo valor y unidad asociada. Las propiedades físicas analizadas se enfocan a la determinación de calidad del crudo en extracción (Viscosidad mm^2/s , Gravedad API°API, Densidad Kg/m^3). Las propiedades químicas rastreadas son el fundamento de la estructura, relación y caracterización química (CH) de los compuestos petroquímicos presentes (% de asfaltenos, parafinas y compuestos volátiles). Los reportes de la cromatografía de gases FID, realizada en los laboratorios de la Universidad EAFIT para el crudo puro, se analizaron teniendo en cuenta los valores de las señales de retención (μ V/s) a lo largo de la corrida (45 min), expresando (%) de área bajo la curva total. Los valores de % de área bajo la curva, se tomaron de los reportes respaldo que la cromatografía arroja y se representaron gráficamente como % total de hidrocarburos de petróleo (HTP), para cada muestra (Figura 3). Los porcentajes de HPT obtenidos con la muestra pura, se tomaron como los resultados referencia del crudo previo a contacto con las cepas bacterianas (día 0).

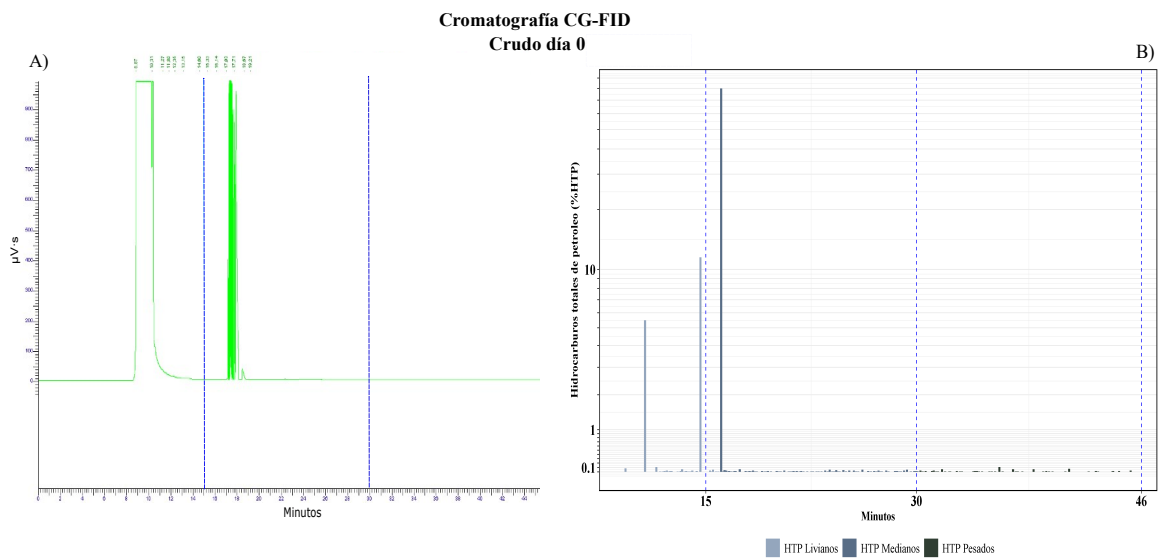


Figura 3: Cromatografía de gases del crudo originario de la región de Magdalena Medio (ver el análisis de composición en la **tabla 3**). La gráfica expresa en porcentaje (%) de área bajo la curva los distintos picos de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) detectados en el crudo adicionado al medio de cultivo sin inocular. Los HTP se clasificaron en livianos, medianos y pesados de acuerdo al tiempo de retención (eje x).

Tabla 3: Resultados propiedades fisicoquímicas del crudo procedente de Magdalena (Campo LISAMA TK-0202). *API, American Petroleum Institute*

Propiedad	Unidades	Resultado
Viscosidad	mm^2/s	51.04
Gravedad API	°API	28.8
Azufre total	% masa	0.6
Densidad	Kg/m^3	882.5
Asfaltenos	g/100 g (%m/m)	1.7
Parafinas	g/100 g (%m/m)	< 6.0
Metano	% volumen	<0.01
Etano	% volumen	0.01
Propano	% volumen	0.08
iso-Butano	% volumen	0.07
<i>n</i> -butano	% volumen	0.15
iso-pentano	% volumen	0.25
<i>n</i> -pentano	% volumen	0.10
2,2-dimetilpropano	% volumen	<0.01

4.2. Concentración de HTP en el suelo

Los análisis químicos reportados por la Universidad Industrial de Santander, en relación a la concentración en porcentaje de p/v de HTP, grasas y aceites se encuentran discriminados gráficamente dentro de la Figura 4. Los resultados son valores que representan un promedio de la concentración (%) de HTP, grasas y aceites de las sub muestras por cada uno de los puntos para el sustrato edáfico. Los valores en las gráficas corresponden a las muestras de suelo para los 9 puntos en la zona de Casanare y los 12 en Magdalena.

4.3. Cultivo, aislamiento y caracterización de bacterias ambientales generales

4.3.1. Cultivo y aislamiento de bacterias ambientales generales

Las bacterias ambientales generales con capacidad para crecer en medio R2A 0.1x se cuantificaron y aislaron a partir de las muestras de suelo, agua y sedimento de los 9 puntos escogidos en el Casanare y los 12 en Magdalena. Se logró determinar con base a la cuantificación de colonias, los valores de abundancias (UFC/mL); para todos los sustratos. En Casanare se registró un total de $4.66E+09 \pm 9.74E+07$ UFC/mL, distribuidos de mayor a menor abundancia así: $3.78E+09 \pm 2.88E+08$ UFC/mL encontrados en suelo, $4.99E+08 \pm 5.79E+07$ UFC/mL en se-

Concentración de: grasas aceites e hidrocarburos totales

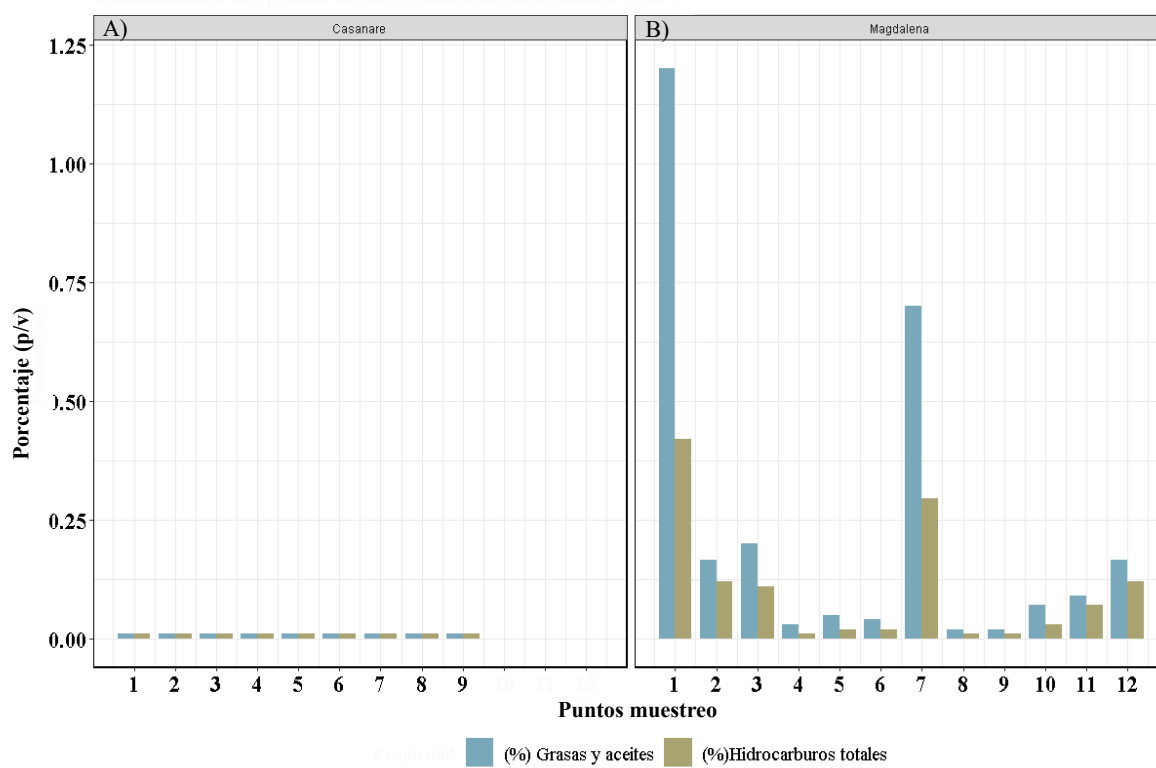


Figura 4: Concentración (p/v), de grasas, aceites e hidrocarburos totales para suelos en los 21 puntos de muestreo, distribuidos entre Magdalena y Casanare. A) Gráfica de resultados para los 9 puntos de muestreo en Casanare. B) Gráfica de resultados para los 12 puntos de muestreo en Magdalena.

dimento y $3.83\text{E}+08 \pm 1.19\text{E}+08$ UFC/mL en agua (ver en la Figura 6). A partir del número total de colonias, se restringió el aislamiento a morfotipos únicos por cada placa y repetición en cada sustrato. Del área del Casanare se consiguieron aislar un total de 83 cultivos bacterianos, distribuidos así: de sedimento se obtuvieron 45 aislados bacterianos, seguidos por 28 obtenidos suelo y 10 del agua.

Los resultados de abundancia $8.41\text{E}+09 \pm 2.96\text{E}+08$ ias (UFC/mL) en el área de Magdalena se distribuyeron de mayor a menor así: $9.85\text{E}+09 \pm 9.45\text{E}+08$ UFC/mL en el sustrato de suelo; UFC/mL en sedimento y $8.23\text{E}+08 \pm 5.74\text{E}+08$ UFC/mL en agua; constituyendo un total de $1.91\text{E}+10 \pm 2.66\text{E}+08$ UFC/mL (ver en la Figura 6). Del total de muestras obtenidas, se lograron obtener 90 aislados. De suelo 52 aislados bacterianos, siendo este más abundante y diverso, seguido por 24 sedimento y 14 de agua. La distribución del total de aislados obtenidos por cada sustrato y la discriminación por área de muestro se encuentra en la Figura 7. Ejemplos de algunos morfotipos obtenidos por cada tipo de muestra se representan en la Figura 8.

4.3.2. Caracterización morfológica de aislamientos ambientales generales

Con la finalidad de realizar una identificación más precisa de las características morfológicas de las colonias, se realizaron observaciones a través del estereoscopio electrónico (Carl Zeiss, Manufacturing Company; Germany). Algunas colonias y sus morfologías se encuentran resumidas en la Figura 9. Las diferentes morfologías celulares por cada tipo de muestra identificadas posterior a la tinción de Gram, se representan en la Figura 10. Una descripción más detallada de las características macro y microscópicas de todos los aislados fueron registradas dentro del anexo 1.

4.3.3. Caracterización bioquímica de aislamientos ambientales

Los resultados para cada una de las galerías API 20E y 20Strep fueron documentadas en una matriz expresando las reacciones positivas (1) y las negativas (0). Para cada una de las galerías se registró una matriz con la información correspondiente, esta información se encuentra ampliada en el anexo 1. Cada una de las matrices fue usada para generar un dendrograma de correlación de rutas metabólicas. Los resultados de los aislamientos puestos a prueba con los test de la galería API 20E, se aprovecharon para la inferencia de reacciones bioquímicas en las bacterias Gram negativas no exigentes. Dando uso a las agrupaciones a partir de las reacciones positivas de cada sustrato en evaluación, se generó el diagrama de resultados para la galería API 20E (ver Figura 11). Las agrupaciones que discriminan los grupos más grandes entre los aislados son los sustratos que tienen la capacidad de fermentar o no glucosa (GLU); reducir NO_2 ó producir N^2 ; la producción de acetona (VP) por la reducción del piruvato sódico al igual que la metabolización de la gelatina (GEL) de origen bovino gracias a la reacción

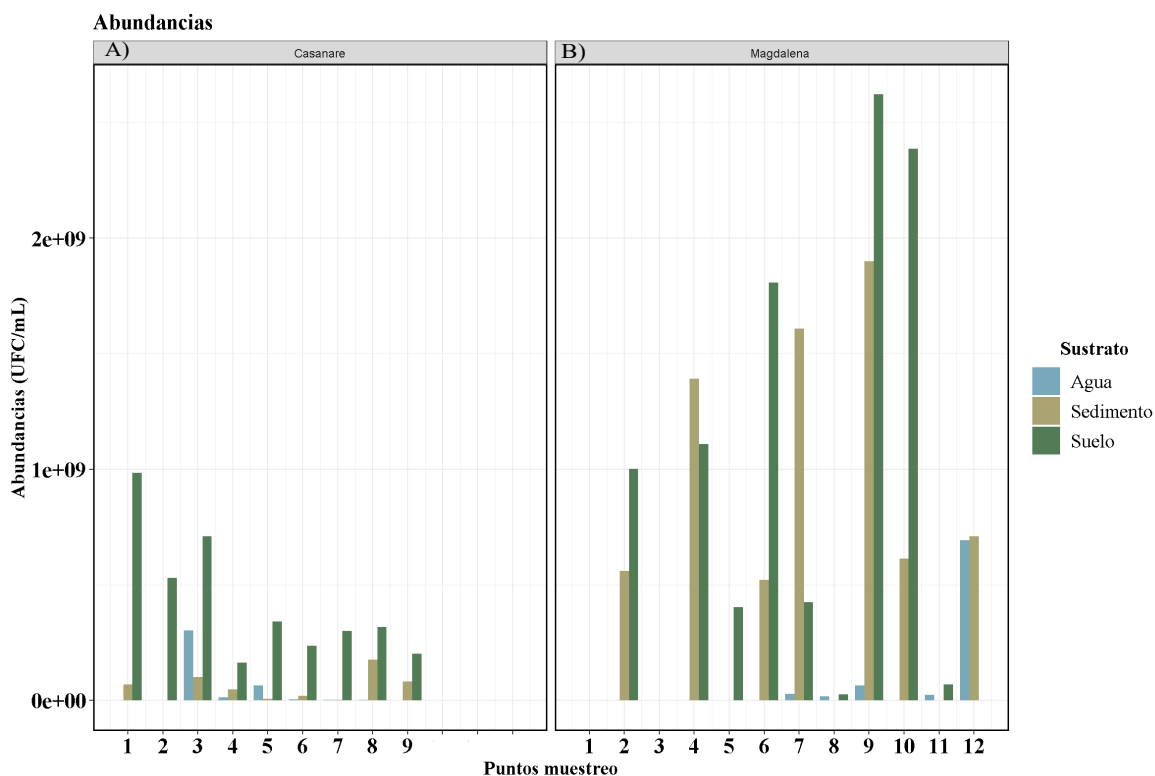


Figura 6: Abundancias (UFC/mL) por punto en cada zona de estudio (Casanare y Magdalena). A) Abundancias de densidad bacteriana expresada en UFC/mL en cada uno de los 9 puntos de muestreo, discriminando cada tipo de muestra por sustrato (agua, suelo o sedimento) de acuerdo a su disponibilidad en campo, dentro del área de estudio en Casanare. B) Abundancias de densidad bacteriana expresadas en UFC/mL en cada uno de los 12 puntos de muestreo, discriminando cada tipo de muestra por sustrato (agua, suelo o sedimento) de acuerdo a su disponibilidad en campo, dentro del área de estudio en Magdalena.

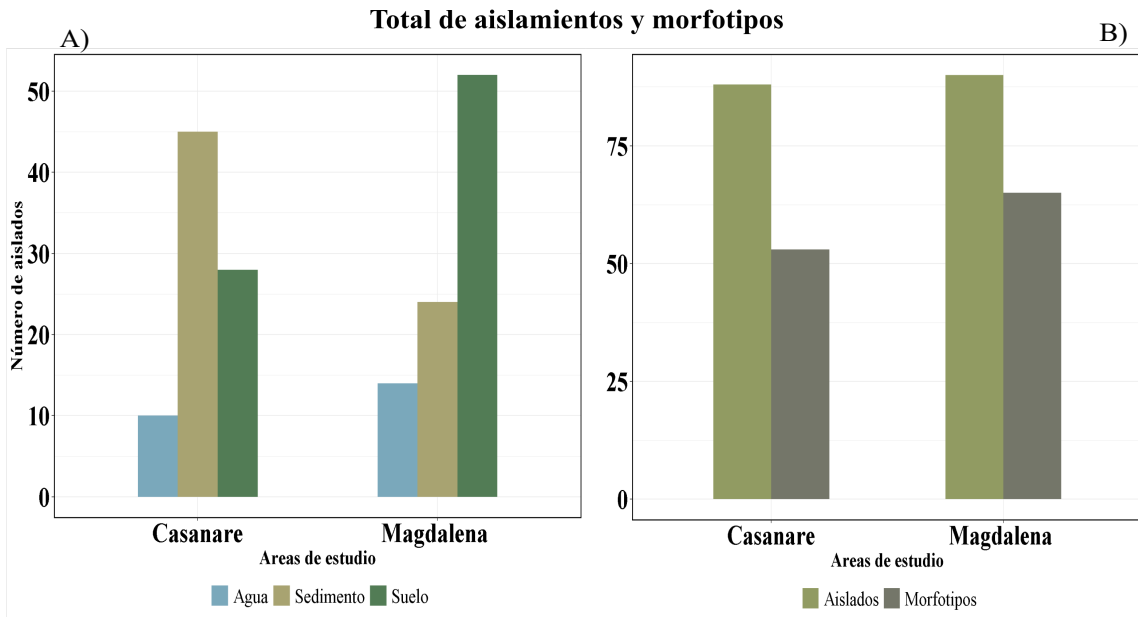


Figura 7: Aislamientos y morfotipos por sustrato y áreas de muestreo. A) la gráfica relaciona los valores totales de aislamientos (eje *y*), que se lograron cultivar y caracterizar por cada sustrato (agua, suelo y sedimento) en ambas zonas de estudio (Casanare, Magdalena). B) Resumen del total de morfotipos que se obtuvieron a partir del total de aislamientos por zona de estudio.

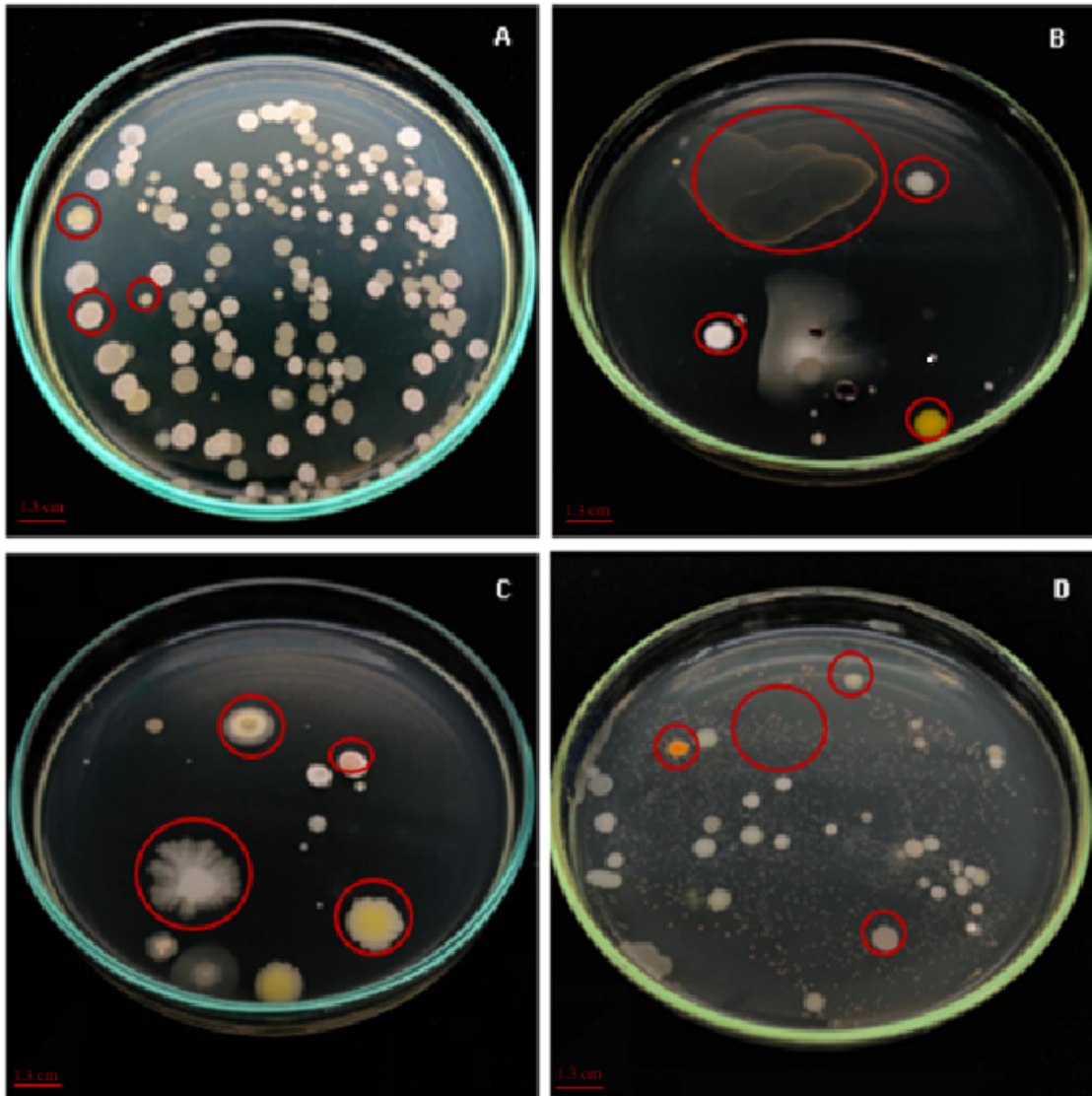


Figura 8: Cultivos bacterianos crecidos en medio R2A 0.1x mediante el método de plateo en placa, tras 4 días de incubación. A) Cultivo de una muestra de sedimento diluida al 10% v/v como inóculo. A) Colonias circulares de diferentes tamaños en distintas tonalidades de blanco. B) Cultivo de una muestra de agua diluida 10% v/v como inóculo. Se observaron colonias blancas, amarillas y transparentes de crecimiento extensivo. C) y D). Cultivo de una muestra de suelo diluida 10% v/v como inóculo. Se observaron morfologías circulares, irregulares filamentosas y puntiformes de varios colores como: blanco, amarillo y naranjas.

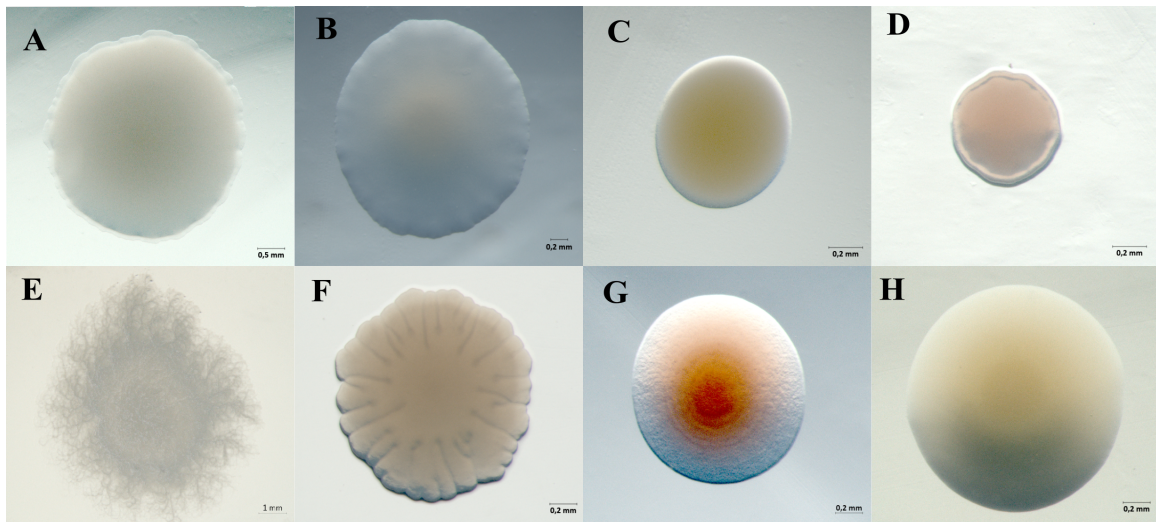


Figura 9: Ejemplos de las morfologías de colonias observadas. Las imágenes representan la morfología de colonias aisladas de cultivos bacterianos en medio R2A (0.1x), observadas a través del estereoscopio óptico a una magnificación de 10x. A-D) Morfotipos originarios de la zona de Casanare; E-H) morfotipos originarios de la zona del Magdalena Medio. A) Colonia circular convexa, de color crema y superficie mate, con bordes enteros; aislado SMED-CAS1. B) Colonia circular umbonada de color blanco y superficie mate, con bordes enteros; aislado SMED-CAS54. C) Colonia circular convexa, de color amarillo y superficie brillante, con bordes enteros; aislado SMED-CAS74. D) Colonia circular convexa, de color rosa y superficie mate, con bordes en relieve y enteros; aislado SMED-CAS41. E) Colonia rizoide plana, de color blanca en el centro y filamentos más claros y superficie mate; aislado SMED-MAG75. F) Colonia irregular convexa, de color blanca crema, texturizada brillante con bordes transparentes ondulados; aislado SMED-MAG77. G) Colonia puntiforme umbonada, de color rosa y textura brillante, con bordes enteros, aislado SMED-MAG1. H) Colonia circular convexa, de color verde pálido y textura brillante, con bordes completos, aislado SMED-MAG3

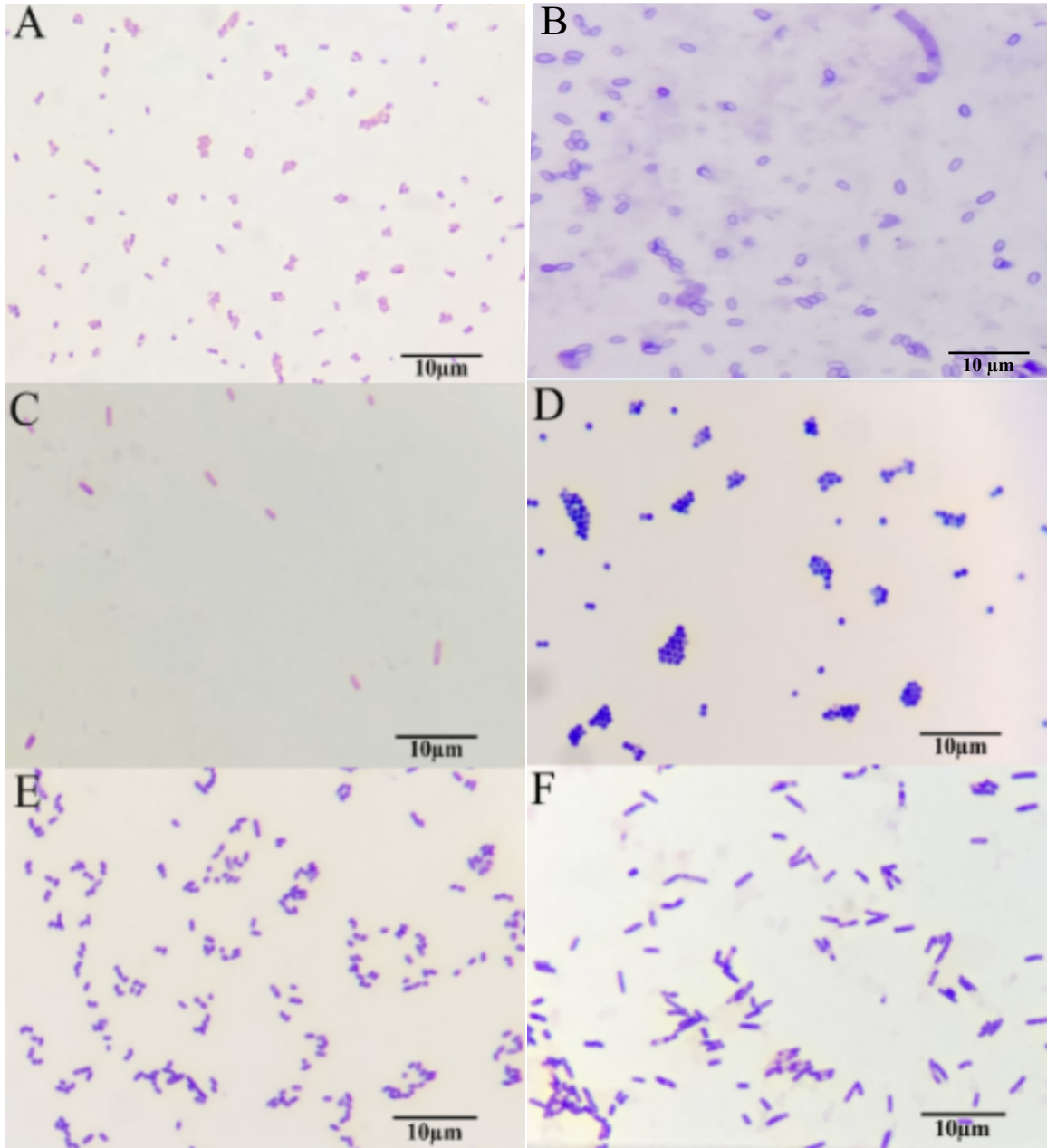


Figura 10: Observaciones microscópicas a 100x de de las morfologías y coloraciones de los diferentes aislamientos obtenidos a partir del cultivo de muestras de suelo, agua y sedimento en medio R2A 0.1x. A) Cocos, Gram-negativos. B) Bacilos esporulados, Gram-positivos. C) Bacilos, Gram-negativos. D) Cocos, Gram-positivos. E) Cocobacilos Gram-positivos. F) Bacilos, Gram-positivos.

de la enzima gelatinasa, también fueron factores determinantes en la agrupación de rutas metabólicas similares o a fin entre los aislamientos.

La galería API 20 Strep, se usó para poner a prueba los aislamientos previamente categorizados como Gram positivos. Los resultados de los 20 sustratos expresados bajo el dendrograma de disimilitud se encuentran en la Figura 12. En el caso de los aislamientos testeados bajo la galería API 20strep, todos los aislamientos demostraron la capacidad de producir acetona (VP) a partir de la reducción del piruvato sódico. Por lo contrario, las reacciones positivas que tuvieron un alto nivel discriminante fueron; la hidrólisis de la enzima B-glusidasa (ESC), la cual no se evidenció en solo 20 aislamientos del los 86 testeados; la capacidad dehidrogenasa a partir de la enzima Arginina-Dihidrolasa (ADH); la reacción del 2-naftil fosfato y L-leucina-β-naftilamida a través de la activación de la enzima Pírolidonil Arilamidasa (PAL) y Leucina AminoPeptidasa (LAP) respectivamente.

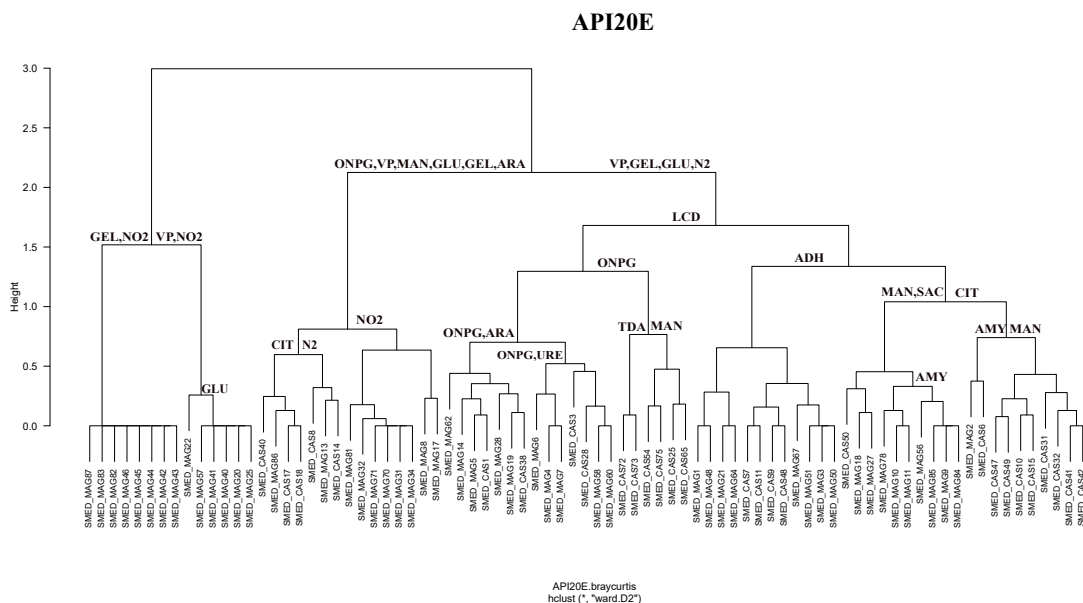


Figura 11: Dendrograma de resultados de la galería API 20E. La gráfica es una herramienta para inferir las rutas metabólicas de los aislamientos ambientales generales previamente caracterizadas como Gram-negativos (SMED-MAG/CAS). El dendrograma representa la disimilitud de los resultados en los diferentes nodos y agrupa las cepas con altura de similitudes estadísticamente cercanas, categorizando las cepas que cuentan con la capacidad de metabolizar los mismos sustratos o a fines.

API 20STREP

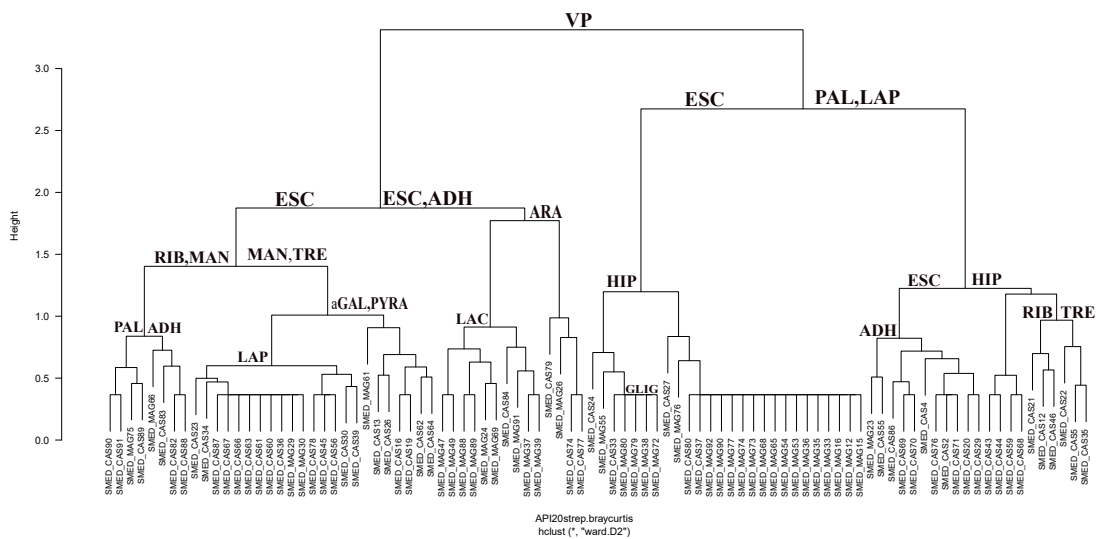


Figura 12: Dendrograma de resultados de la galería API 20Strep. La gráfica es una herramienta para inferir las rutas metabólicas de los aislamientos ambientales generales previamente caracterizadas como Gram-positivos (SMED-MAG/CAS). El dendrograma discrimina la disimilitud de los resultados en los diferentes nodos y agrupa las cepas con altura de similitudes más próximas, categorizando las cepas que cuentan con la capacidad de metabolizar los mismos sustratos o a fines.

4.4. Caracterización genética de aislamientos ambientales

Desde los resultados de ensamblaje y generación de secuencias (.FASTA), se logró la identificación taxonómica en la base de datos Silva únicamente de 122 aislamientos bacterianos del total (200). Se identificaron 103 aislamientos ambientales generales; 75 del área de Magdalena, 28 del Casanare y 19 hidrocarbonoclastas. A partir de los 103 aislamientos de medios convencionales se comprobó la definición taxonómica de 19 familias bacterianas. 56 aislamientos del total de identificados, pertenecen a la familia Bacillaceae (30) y Burkholderiaceae (26), siendo las familias con mayor número de individuos; aunque baja diversidad con relación a géneros. La familia Bacillaceae está representada por 2 géneros: (*Bacillus* sp. y *Fictibacillus* sp.); y Burkholderiaceae por un género: *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (BCP). Se reconoció de igual forma familias con baja representatividad en número de aislamientos como; Microbacteriaceae, con 5 individuos identificados en 3 géneros diferentes (*Microbacterium*, *Leifsonia* y *Curtobacterium*); y Oxalobacteraceae con 4 individuos distribuidos en dos géneros (*Massilia* y *Noviherbaspirillum*).

Las secuencias que no cumplieron con las condiciones de calidad mínimas para su identificación, se encuentran pendientes de su repetición. Los resultados de la identificación de todos los aislamientos se amplían en el anexo 1. Con base en los resultados exitosos de las secuencias y sus alineamientos; se realizó la construcción filogenética a través de un árbol de genes. El árbol filogenético resultante para los aislamientos ambientales aislados de medio convencional R2A se representa en la Figura 13.

4.5. Cultivo, aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarbonoclastas

4.5.1. Cultivo y aislamiento a partir de MBL suplementado con crudo al 1% v/v

Se inocularon un total de 63 MBL suplementado con crudo 1% v/v,3 por cada punto correspondientes a las suspensiones de cada uno de los sustratos (agua, suelo y sedimento). En la Figura 14 se observan ejemplares de las muestras en tubos Hungate suplementadas con crudo en MLB.

4.5.2. Cultivo y aislamiento a partir de MBS suplementado con crudo al 1% v/v

En la Figura 15 se representa uno de los cultivos en MBS, usando como inóculo una alícuota de cada uno de los enriquecimientos, en cada repetición. Para confirmar el crecimiento y

Aislamientos ambientales convencionales

Tree scale: 0.1

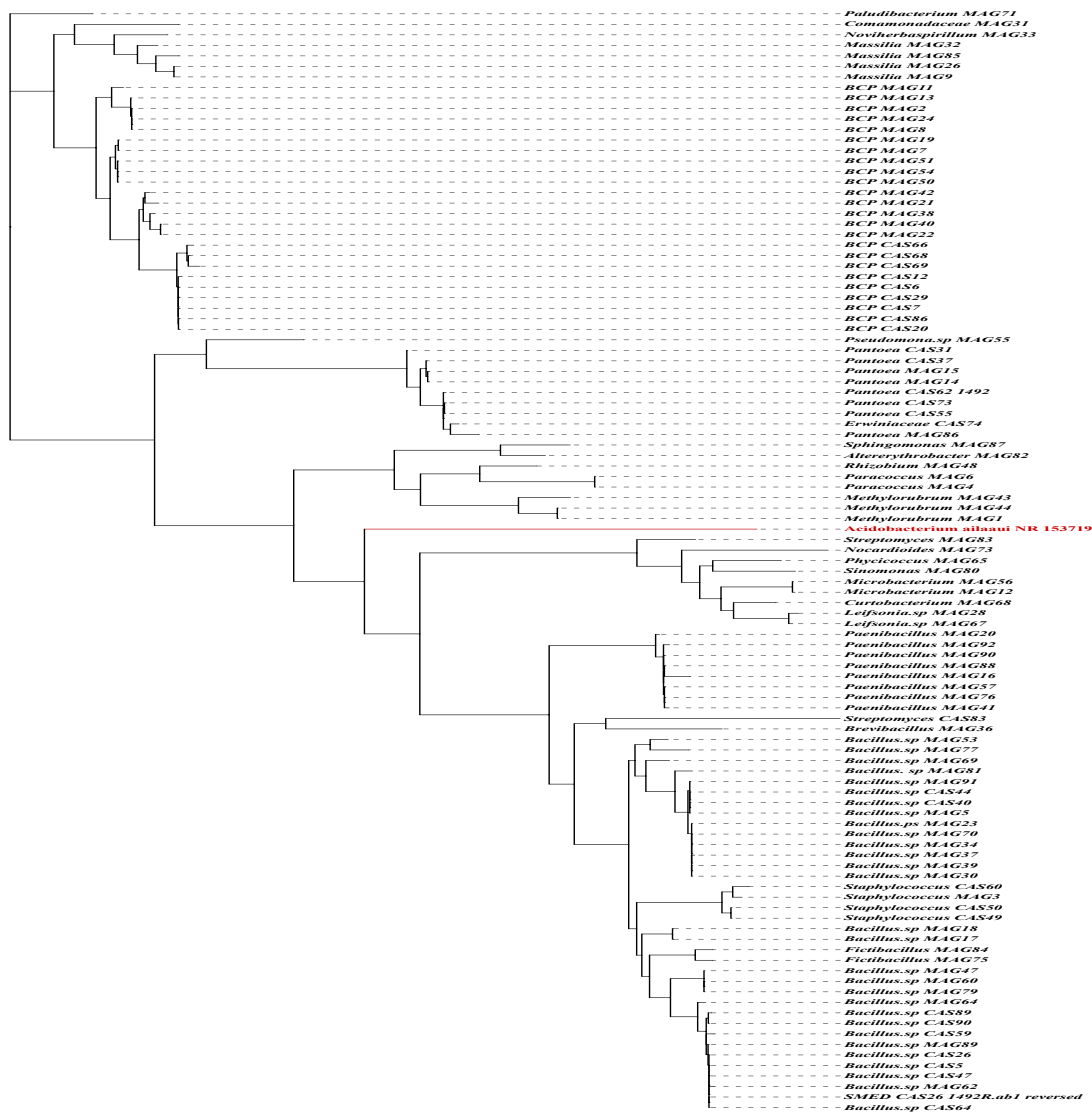


Figura 13: Árbol filogenético de los aislamientos ambientales generales de las dos zonas de estudio (Casanare, Magdalena). En el árbol se relacionan los alineamientos genéticos para los 103 aislamientos ambientales identificados molecularmente hasta la fecha. Se usó la secuencia de *Acidobacterium ailauui*-NR 153719 obtenida de Genbank, como grupo externo de referencia genético diferencial. La figura fue desarrollada en el software de IQ-TREE, posteriormente visualizada y editada en iTOL.



Figura 14: Ejemplos de algunos enriquecimientos inoculados en campo en tubos Hungate usando 9 mL de medio líquido, MBL suplementado con crudo al 1%v/v, el crudo usado fue obtenido del sector del Magdalena. Los enriquecimientos en la imagen corresponden a muestras en su día 15 de incubación.

capacidad hidrocarbonoclasta en medio con crudo al 1 % v/v, se realizaron repiques sucesivos en MBS suplementado con crudo al 1 % v/v; en la Figura 16 se observa un ejemplo del proceso. Dadas las condiciones físicas que el crudo otorga al medio, se realizaron repiques a partir del MBS suplementado con crudo al 1 % v/v, en medio R2A 0.1X. Bajo este medio se realizo la primera caracterización morfológica para 15 aislamientos (10 de suelo y 5 de sedimento) con potencial hidrocarbonoclasta de la zona de Casanare y 12 aislamientos (8 de suelo 4 de sedimento) de Magdalena.

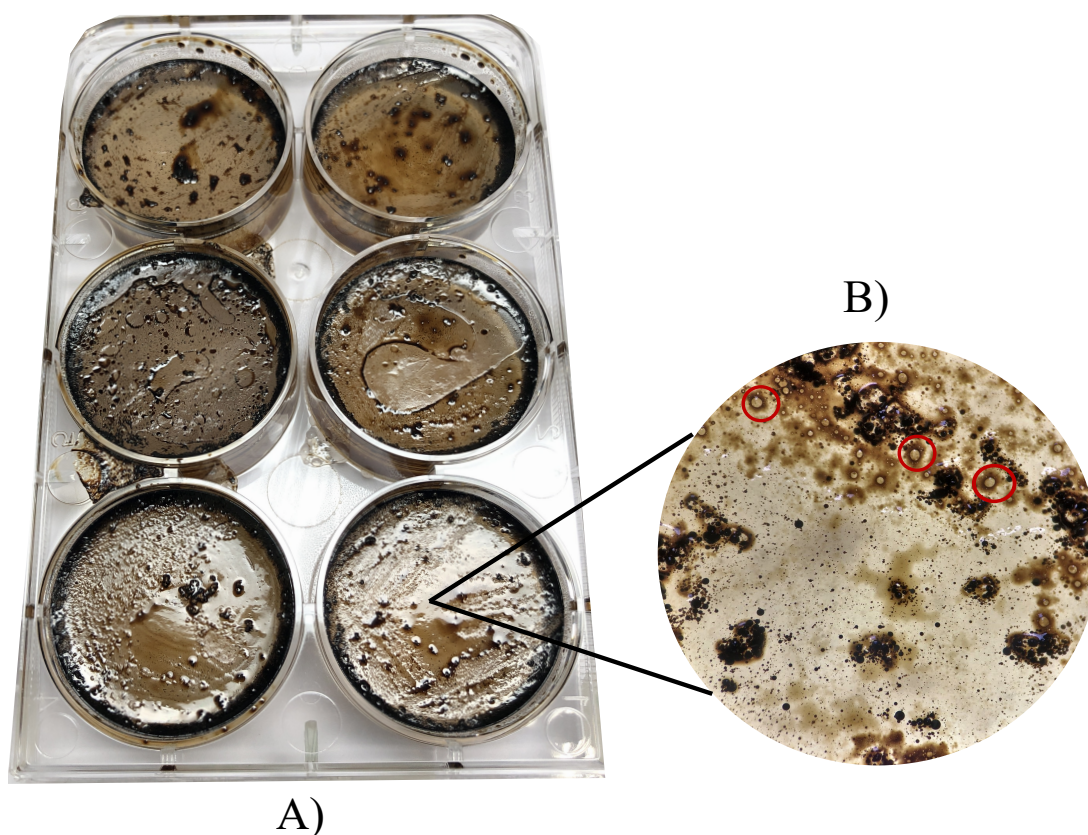


Figura 15: Ejemplos de algunos cultivos en MBS suplementado con crudo al 1%v/v, el crudo usado fue obtenido del sector del Magdalena medio. A) Plato conformado por 6 pozos de MBS suplementado con crudo al 1%v/v, sembrado con el aislado MAG-CRU1 en cada repetición. B) Acercamiento a una de las repeticiones de cultivo, donde se logra verificar algunas colonias en medio del crudo presente. El medio en la imagen corresponden al tercer día de incubación.

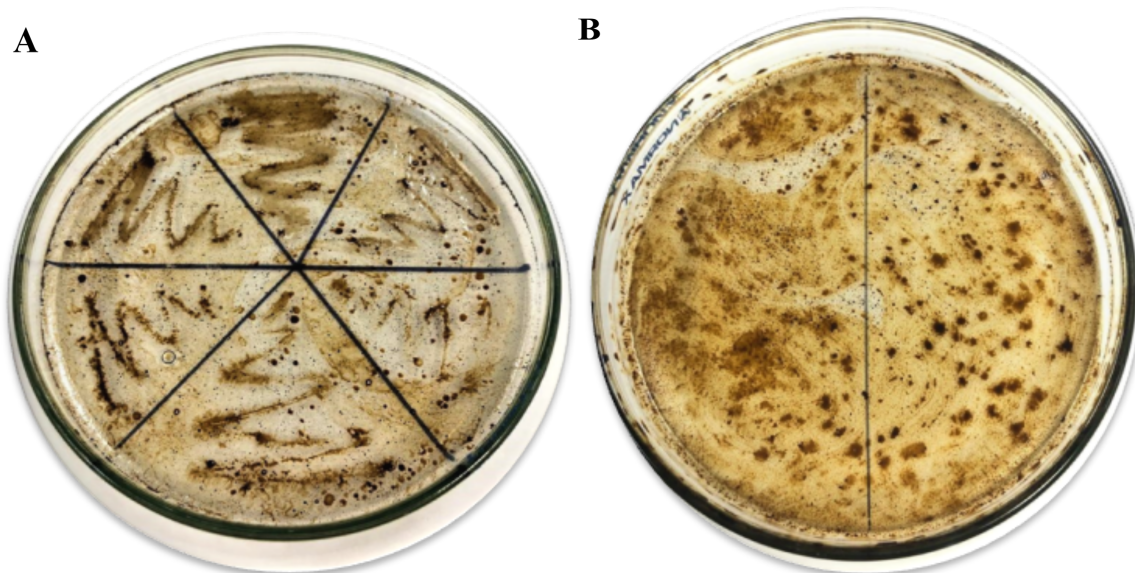


Figura 16: Confirmación de crecimiento de cepas aisladas en MBS con crudo al 1 % v/v. A) Medio con tres estrías por cada aislado y dos morfotipos por repetición. B) MBS con crudo al 1 % v/v, previo a ser sembrado, en el cual no se observó ninguna estría. Así se demostró el crecimiento de las cepas previamente caracterizadas morfológicamente.

4.5.3. Identificación genética de bacterias con potencial hidrocarbonoclasta

Desde los resultados de ensamblaje y generación de secuencias (.FASTA), se logró la identificación taxonómica en la base de datos Silva de 19 aislamientos bacterianos con potencial hidrocarbonoclasta del total (27). Se identificaron 11 aislamientos hidrocarbonoclastas del área de Casanare y 8 del Magdalena. Las secuencias que no cumplieron con las condiciones de calidad mínimas para su identificación, se encuentran pendientes de su repetición. Los resultados de la identificación de todos los aislamientos identificados a la fecha se amplían en la **tabla 4**. Las 19 bacterias con potencial hidrocarbonoclasta se consiguieron categorizar dentro de 6 familias (Burkholderiaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Bacillaceae, Alcaligenaceae y Rhodanobacteraceae). La familia con más individuos corresponde a Burkholderiaceae con 12 representantes, agrupadas en un solo género: *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (BCP). Así mismo se identificó la presencia de 2 aislamientos dentro de la familia Pseudomonadaceae identificados dentro del género *Pseudomonas*. Además, se registró una familia única para los aislamientos hidrocarbonoclastas que es Enterobacteriaceae con dos individuos discriminados dentro del género *Enterobacter*. Con base en los resultados exitosos de las secuencias y sus alineamientos; se realizó la construcción filogenética a través de un árbol de genes. El árbol filogenético resultante para los aislamientos con potencial hidrocarbonoclasta se representan en la Figura 18.

4.5.4. Caracterización bioquímica de aislamientos con potencial hidrocarbonoclastas

Las 27 bacterias con potencial hidrocarbonoclasta fueron sometidas a un total de 40 sustratos deshidratados, para su caracterización bioquímica. Los resultados de las reacciones de ambas galerías API (20E y 20Strep), se documentaron en una sola matriz expresando las reacciones positivas (1) y las negativas (0). Finalmente, la matriz fue usada para generar un dendrograma de similitud de potencial metabólico (Figura 19). Las bacterias hidrocarbonoclastas cuentan con una mayor riqueza de sustratos con reacciones positivas, gracias a que se testearon en ambas galerías API; en consecuencia los grupos de disimilitud se conformaron de grupos más grandes de reacciones en comparación a las obtenidas en cada galería por separado. 3/4 de los aislamientos con potencial hidrocarbonoclasta, cuenta con la capacidad de fermentar glucosa (GLU); al mismo tiempo metabolizar la gelatina (GEL) de origen bovino gracias a la reacción de la enzima gelatinasa y activar la capacidad de hidrogenasa a partir de la enzima Arginina-Dihidrolasa (ADH). Los demás aislamientos se discriminan de forma general del resto por tener la capacidad en común de acidificar el D-manitol y la D-trehalosa a partir de la acción de las enzimas manitol (MAN) y la (TRE) trehalosa respectivamente. Otra variable de discriminación importante es la de los aislados que son capaces de reducir NO_2 ó producir N^2 , reacción que subcategoriza los nodos más específicos.

Tabla 4: Identificación genética para las bacterias con potencial hidrocarbónico-clasta. La figura contiene el código del medio y el sustrato de aislamiento de las cepas con potencial hidrocarbónico-clasta. Contiene además la identificación genética, a partir de la secuenciación del gen 16S rARN y señala los que al momento se encuentran en proceso de identificación.

Aislamientos con potencial hidrocarbónico-clasta			
Código de aislamiento.	Sustrato	Medio de aislamiento	Identificación genómica
SMED_CAS_CRU1	Sedimento	MBL_Crudo1%	<i>Bacillus sp.</i>
SMED_CAS_CRU2	Sedimento	MBL_Crudo1%	*
SMED_CAS_CRU3	Sedimento	MBL_Crudo1%	Alcaligenaceae
SMED_CAS_CRU4	Suelo	MBL_Crudo1%	*
SMED_CAS_CRU5	Suelo	MBL_Crudo1%	<i>Dyella</i>
SMED_CAS_CRU6	Sedimento	MBL_Crudo1%	*
SMED_CAS_CRU7	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_CAS_CRU8	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_CAS_CRU9	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_CAS_CRU10	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_CAS_CRU11	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_CAS_CRU12	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_CAS_CRU13	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_CAS_CRU14	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_CAS_CRU15	Suelo	MBL_Crudo1%	<i>Devosia sp.</i>
SMED_MAG_CRU1	Sedimento	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_MAG_CRU2	Sedimento	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_MAG_CRU3	Sedimento	MBL_Crudo1%	*
SMED_MAG_CRU4	Sedimento	MBL_Crudo1%	*
SMED_MAG_CRU5	Suelo	MBL_Crudo1%	*
SMED_MAG_CRU6	Suelo	MBL_Crudo1%	<i>Pseudomonas sp.</i>
SMED_MAG_CRU7	Suelo	MBL_Crudo1%	<i>Pseudomonas sp.</i>
SMED_MAG_CRU8	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_MAG_CRU9	Suelo	MBL_Crudo1%	*BCP
SMED_MAG_CRU10	Suelo	MBL_Crudo1%	*
SMED_MAG_CRU11	Suelo	MBL_Crudo1%	<i>Enterobacter</i>
SMED_MAG_CRU12	Suelo	MBL_Crudo1%	<i>Enterobacter</i>

*BCP=Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia

*=Sin identificación hasta la fecha de este documento.

Tree scale: 0.1

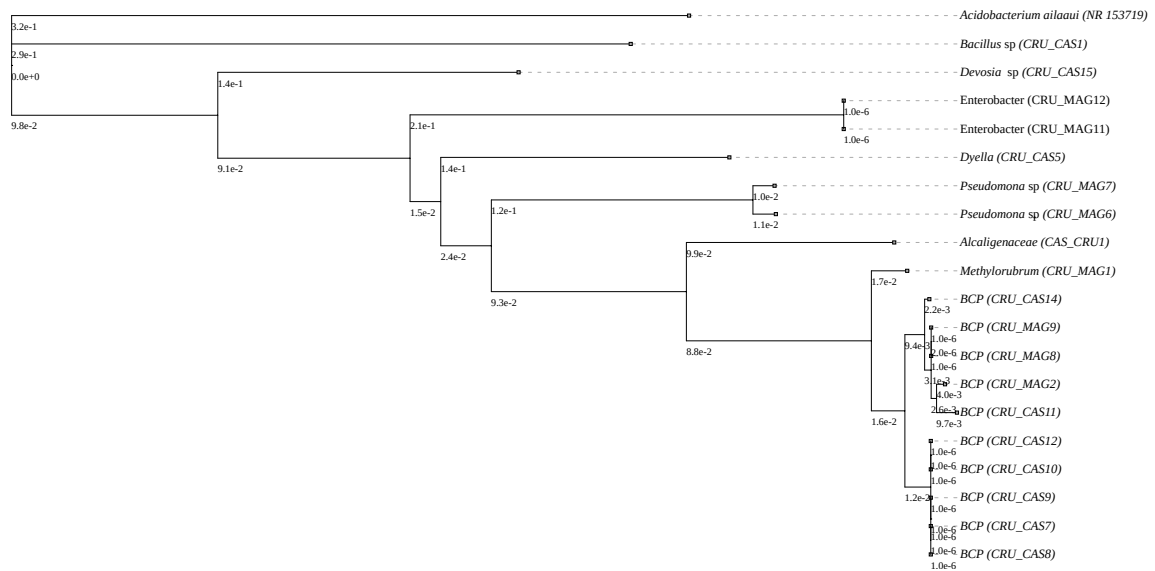


Figura 18: Árbol filogenético de los aislamientos con potencial hidrocarbonoclasta. En el árbol se relacionan los alineamientos genéticos para las 19 cepas con potencial hidrocarbonoclasta que se lograron identificar hasta el momento. Se usó la secuencia de *Acidobacterium ailaui* NR153719 obtenida de Genbank, como grupo externo de referencia genético diferencial. La figura fue desarrollada en el software de IQ-TREE, posteriormente visualizada y editada en iTOL.

4.6. Biodegradación de crudo

4.6.1. Cuantificación de porcentajes de biodegradación en consorcios bacterianos

A partir de los resultados de la cromatografía de gases (GC-FID) que se obtuvieron para el día 15 y 30, tomando como base de referencia el día 0; se realizaron los cálculos de transformación y/o degradación de hidrocarburos para la totalidad de muestras. Los datos de respaldo que arroja el cromatógrafo de retención en $\mu\text{V.s}$, se expresaron en % de área de HTP para cada punto de muestra en análisis. La relación del % de compuestos de HTP y su variación a través de los días, fue corroborada usando los reportes de datos cromatográficos, y replicando la información gráficamente. Las gráficas de biodegradación para cada una de las muestras de los 12 suelos se expresan dentro de la Figura 20). La cuantificación de la biodegradación total inducida por la comunidad microbiana en cada uno de los tubos Hungate se realizó, con base a la diferencia del porcentaje de HPT (livianos, medianos y pesados) desde el día 0 en comparación cuantitativa con el día 15 y 30. La recopilación de los datos de las cromatografías y resultados totales se expresan en la tabla 5 . El resultado más representativo en relación a la evaluación de % de biodegradación a cargo de las comunidades bacterianas, fue el obtenido a través de los valores calculados para la muestra de suelo en el punto 1 de muestreo en Magdalena (SU1); siendo el más alto con un porcentaje de degradación total de HTP del 91,28 %.

4.6.2. Selección de cepas para la cuantificación de tasas de biodegradación de crudo

Todos los aislados que fueron previamente categorizados con potencial hidrocarbonoclasta (27), fueron repicados en tres oportunidades continuas en MBS usando únicamente la muestra de crudo extraída del Magdalena al 1% v/v como fuente de carbono. Del número total de aislados del Casanare (15), se logró confirmar el crecimiento y aislar, a partir de los repiques, 4 cepas procedentes del sustrato de suelo (SMED-CAS-CRU4,5,7 y 9). Del área de Magdalena se aislaron 12: 4 cepas del sustrato de sedimento y 8 del sustrato de suelo (SMED-MAG-CRU5,6,7,8,9,10,11,12). Para efectos de cuantificación de las tasas de biodegradación, se usaron únicamente las aisladas a partir del sustrato de suelo en las dos áreas de estudio, para un total de 12 cepas para análisis de biodegradación.

4.6.3. Cálculo de curvas de crecimiento (UFC/mL)

Los valores de UFC/mL se registraron en medio del ensayo de biodegradación de HTP, tomando muestra cada 5 días desde el día 0 hasta el día 30 de incubación para las 12 cepas

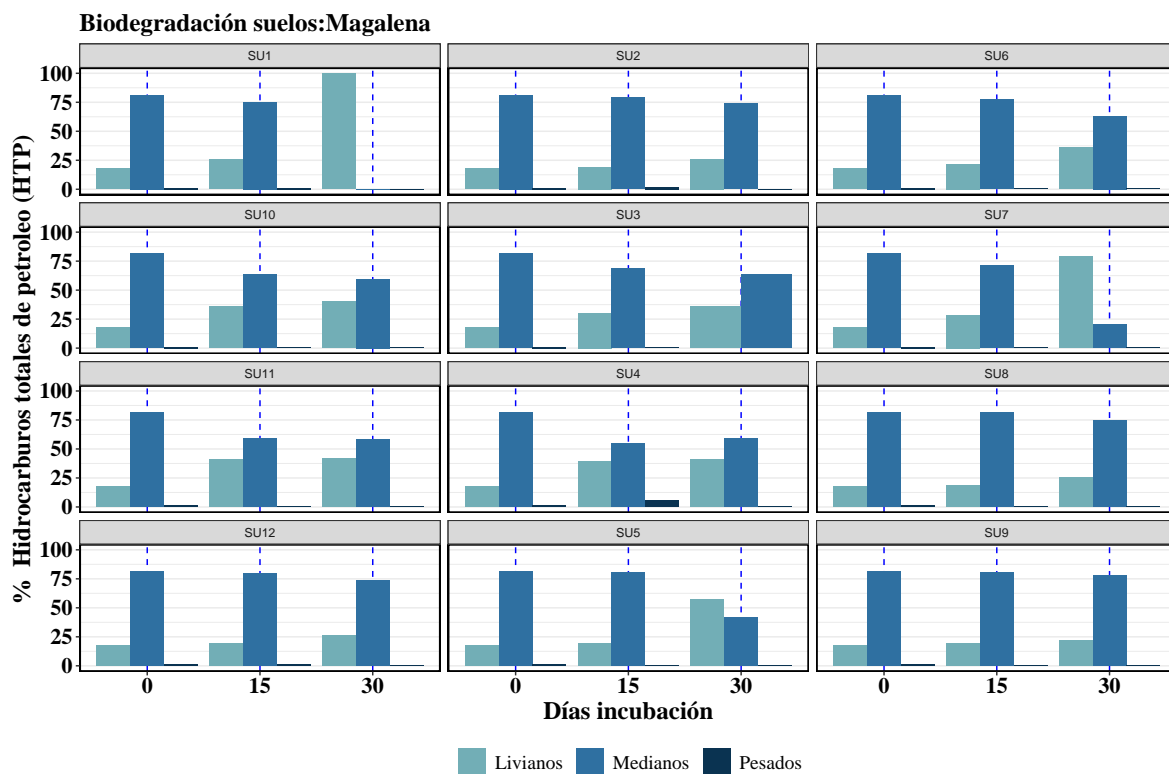


Figura 20: Resultados de cromatografía (GC-FID) de biodegradación de crudo por consorcios bacterianos en muestras de suelo del área de Magdalena. La figura se compone de las 12 representaciones gráficas para cada uno de los ensayos del sustrato suelo en Magdalena. Cada uno de los puntos de muestreo está representado por su muestra (SU1-SU12). Cada una de las gráficas representa la variación a través de los días 0, 15 y 30 de incubación de los porcentajes de HTP en función de sus compuestos (livianos, medianos y pesados).

Tabla 5 : Cuantificación de la biodegradación de crudo por consorcios en muestras de suelo del área de Magdalena. La tabla resume la información de los resultados de biodegradación para las 12 muestras de suelo de los puntos colectados en Magdalena. Los valores de composición en porcentaje se extrajeron de los documentos soporte de la cromatografía (GC-FID), para cada una de las muestras realizando un promedio por cada día en cada muestra. Cada una de las muestras (SU1-SU12) se evaluó en función de la variación total de los diferentes compuestos de HTP en comparación a los valores del día 0 de referencia (siendo el mismo para todas las muestras). Los valores positivos representan los porcentajes de transformación y los negativos los de degradación. A partir de los cálculos de diferencias porcentuales, se obtuvo un valor total de degradación en los 30 días del ensayo, para cada cepa.

Muestras: suelo	(%) HTP	Livianos	Medianos	Pesados	% Subtotal	% Total
	(%) HTP inicial	17.71%	81.41%	0.88%		
	Día	% Transformación/Degradación				
	0	0	0	0		
SU1	15	38.69	-31.00	-0.01	7.69	91.28
	30	-82.76	-74.98	-0.83	-83.59	
SU2	15	7.00	-1.28	1.12	-0.16	5.74
	30	5.90	0.00	1.80	5.90	
SU3	15	15.20	-7.28	-0.08	-7.36	5.94
	30	13.30	-12.80	-0.20	13.30	
SU4	15	18.90	-16.18	0.00	-16.18	11.58
	30	1.00	4.60	0.00	4.60	
SU5	15	2.10	5.92	0.00	5.92	22.78
	30	28.50	-28.70	0.00	-28.70	
SU6	15	14.90	-7.68	-0.17	-7.85	9.35
	30	-1.50	1.70	-0.10	-1.50	
SU7	15	11.40	-3.68	-0.48	-4.16	4.16
	30	-50.80	-50.34	0.00	0.00	
SU8	15	11.80	-3.82	-0.84	4.54	5.22
	30	9.80	-9.76	0.00	-9.76	
SU9	15	2.70	4.82	-0.28	4.54	17.36
	30	22.20	-21.40	-0.50	-21.90	
SU10	15	21.90	-14.58	-0.38	-14.96	8.71
	30	1.90	-1.30	-0.30	6.25	
SU11	15	24.70	-17.18	-0.68	-17.86	9.72
	30	16.20	-15.90	-0.10	27.58	
SU12	15	2.40	4.72	0.12	4.84	5.3
	30	0.50	0.20	-0.80	0.50	
Control negativo	15	3.00	4.92	-0.09	3.00	3.4
	30	-6.45	0.00	0.61	-6.45	

en análisis. En cada punto de muestreo se cuantificó el número de colonias presentes en las diluciones: 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} y se calcularon las UFC/mL para cada placa por muestra y su repetición respectiva en (R2A 0.05x). A pesar de que el monitoreo del número de colonias se efectuó a las 12, 24 y 48 horas pos-siembra en placa, únicamente se tomaron en cuenta los valores para la hora 48, tiempo en que los valores de UFC/mL llegaron a estabilizarse para todas las diluciones. La representación gráfica de la dinámica general de crecimiento para las 12 cepas de ambas áreas se resume en la Figura 21.

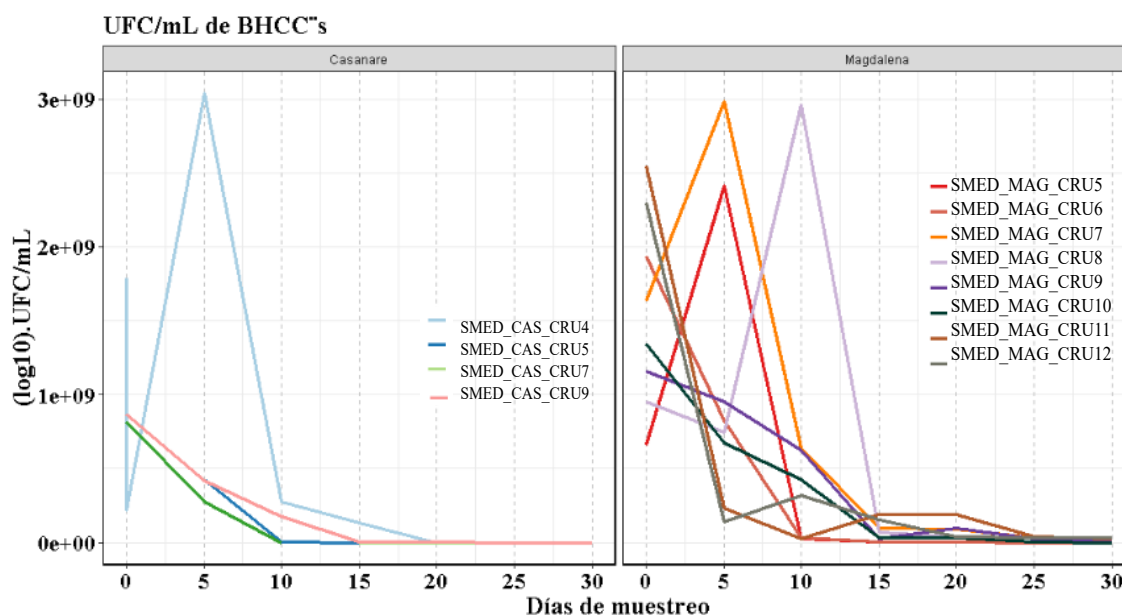


Figura 21: UFC/mL para las 12 BHCC, sobre la hora 48 pos-siembra en caja (R2A 0.05x). Las gráficas discriminan los valores de UFC/mL en todos los punto de muestreo (cada 5 días), para las cepas aisladas de ambas áreas de estudio (Casanare, Magdalena).

4.6.4. Cuantificación de porcentajes de biodegradación en aislamientos hidro-carbonoclastas

Los resultados de la degradación de las 12 BHCC's en las dos áreas, se registran en orden descendiente de % de degradación dentro de la tabla 6 . La degradación total de cada cepa se generó al calcular la variación de porcentajes de compuestos de HTP (livianos, medianos y pesados) entre el día 0, 15 y 30. Además, para cada día de muestreo se promedió un valor aproximado de densidad bacteriana (UFC/mL) en la dilución que mostró mayor homogeneidad en el número de colonias por cada repetición en placa a través de los días 15

y 30 de incubación. La dinámica de degradación de los % de HTP se mostró directamente proporcional a la del desarrollo de UFC/mL a través de los días de ensayo. En este sentido, la cinética de crecimiento mostró una tendencia decreciente para todas las cepas a través de los días, en mayor cuantía desde el día 15 al 30 de ensayo; al tiempo que los % de la fracción mediana de hidrocarburos decrecía (ver Figuras 22,23).

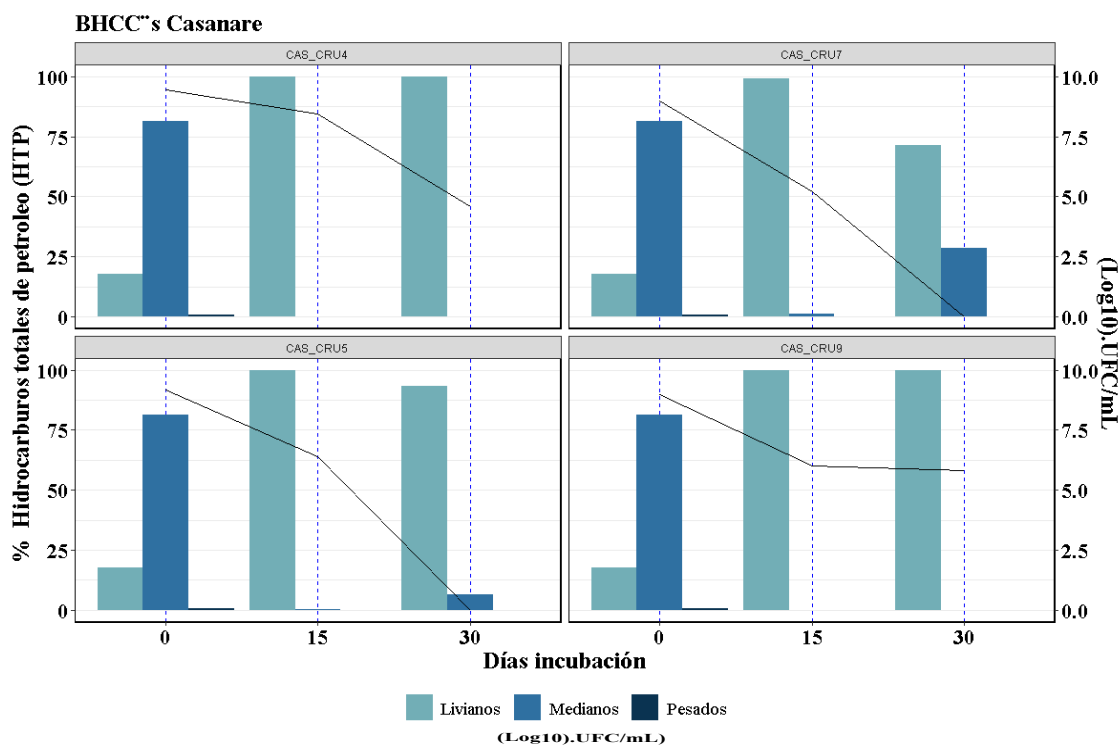


Figura 22: Variación de % de HTP y UFC/mL para las 4 cepas extraídas del Casanare. El panel está conformado por las gráficas para los aislamientos CAS-CRU4, CAS-CRU5, CAS-CRU7 y CAS-CRU9. Las gráficas expresan la variación de los compuestos (%) de hidrocarburos totales de petróleo y el promedio de UFC/mL a través de los días 0, 15 y 30 de incubación, para cada aislamiento.

4.7. Caracterización fenotípica complementaria de bacterias hidrocarbonoclastas (BHCC's)

Con la finalidad de comprobar la acción de la enzima deshidrogenasa a los 30 días de incubación, se realizó nuevamente una caracterización morfológica colonial en medio R2A con TTC a partir de la siembra $100 \mu/L$ de los MBL con crudo al 1%. Las morfologías que se lograron aislar y caracterizar microscópicamente usando el microscopio óptico se compilaron en

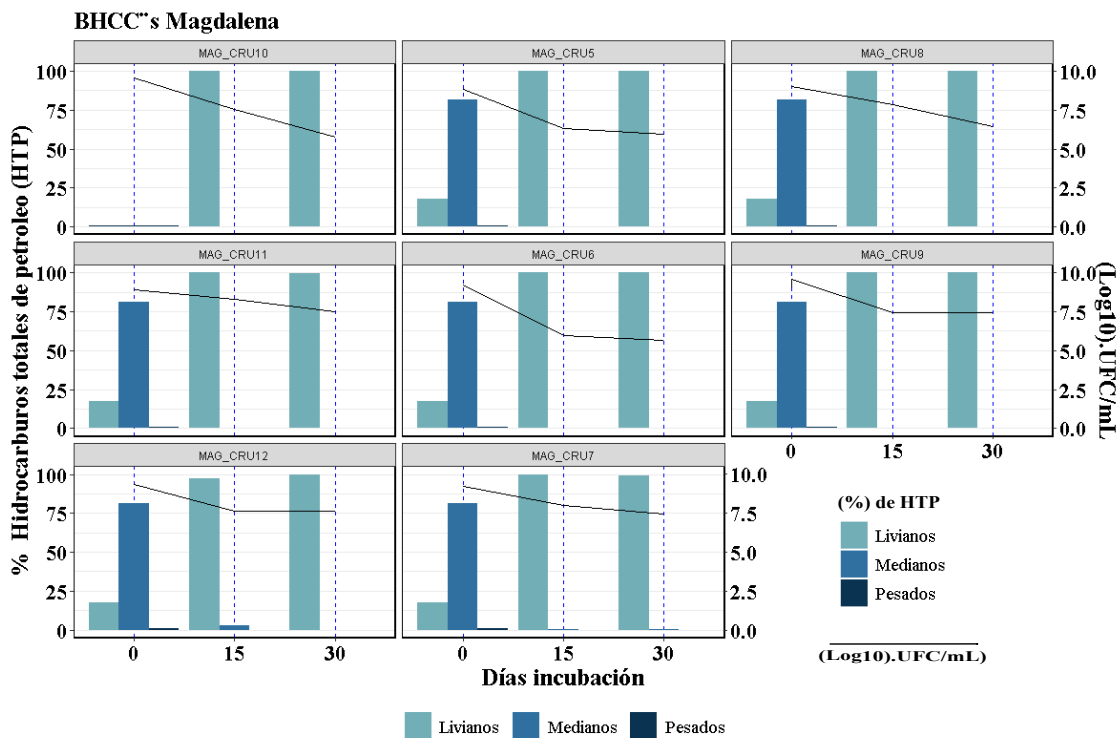


Figura 23: Variación de % de HTP y UFC/mL para las 8 cepas extraídas del Casanare. El panel está conformado por las gráficas para los aislamientos MAG-CRU5, MAG-CRU6, MAG-CRU7, MAG-CRU8, MAG-CRU9, MAG-CRU10, MAG-CRU11 y MAG-CRU12. Las gráficas expresan la variación de los compuestos (%) de hidrocarburos totales de petróleo y el promedio de UFC/mL a través de los días 0, 15 y 30 de incubación, para cada aislamiento.

Tabla 6 : Biodegradación/Transformación de compuestos de HTP (%). La tabla muestra la compilación de información para las 12 cepas en análisis. Cada uno de los aislamientos se evaluó en función de la variación total de los diferentes compuestos de HTP en comparación a los valores del día 0 de referencia (siendo el mismo para todas las cepas). Los valores positivos representan los porcentajes de transformación y los negativos los de degradación. A partir de los cálculos de diferencias porcentuales, se obtuvo un valor total de degradación en los 30 días del ensayo, para cada cepa. Además, se relaciona los valores de UFC/mL de cada cepa en los días 15 y 30 con su dilución más estable para la hora 48 post siembra.

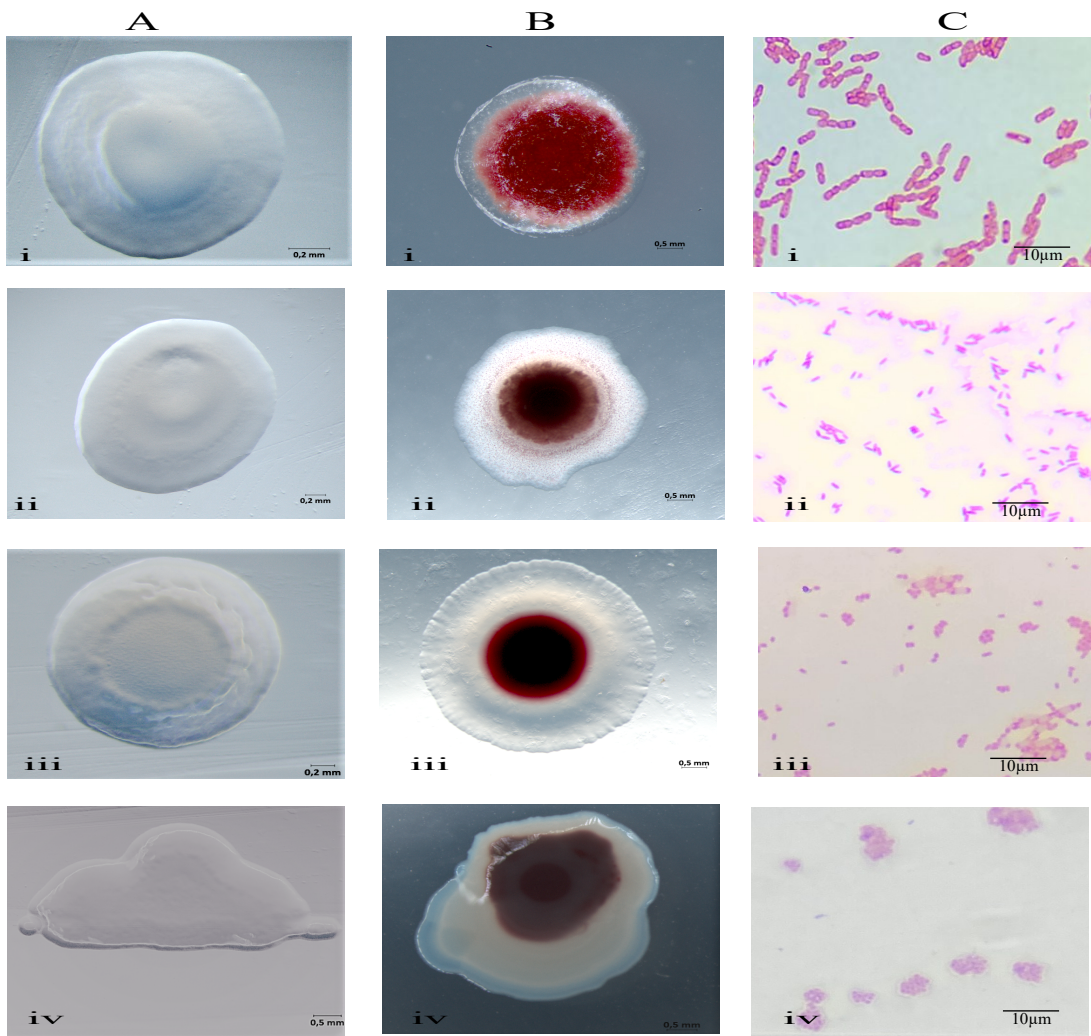
Cepa	Promedio UFC/mL	(%) HTP	Livianos	Medianos	Pesados	%Subtotal	%Total
		(%) HTP inicial	17.71%	81.41%	0.88%		
		Día	% Transformación/Degradación				
		0	0	0	0	0	0
*SMED_MAG_CRU5	2000000	15	82.69	-81.26	-0.86	-82.12	82.3
	900000	30	-0.05	-0.11	0.14	-0.16	
<i>Pseudomonas sp.</i> (SMED_MAG_CRU6)	1000000	15	82.88	-81.41	-0.88	-82.29	82.3
	433333	30	0.02	0.00	0.00	0.02	
<i>Pseudomonas sp.</i> (SMED_MAG_CRU7)	98111111	15	82.33	-80.86	-0.88	-81.74	81.8
	30077778	30	-0.04	0.01	0.02	-0.04	
*BCP. (SMED_MAG_CRU8)	69666667	15	82.80	-81.31	0.00	-81.31	81.4
	2983333	30	0.07	-0.08	0.00	-0.08	
*BCP. (SMED_MAG_CRU9)	26833333	15	82.78	-81.29	0.00	-81.29	81.4
	29411111	30	0.02	-0.07	-0.05	-0.12	
*SMED_MAG_CRU10	34111111	15	82.87	-81.41	-0.02	-81.43	81.5
	600000	30	-0.10	0.04	0.05	-0.10	
<i>Enterobacter.</i> (SMED_MAG_CRU11)	18722222	15	82.89	-81.41	-0.88	-82.29	82.3
	34200000	30	0.51	0.10	0.00	0.00	
<i>Enterobacter.</i> (SMED_MAG_CRU12)	43333333	15	80.09	-78.60	-0.88	-82.25	85.0
	43666667	30	2.72	-2.79	0.02	-2.79	
*SMED_CAS_CRU4	272000000	15	82.82	-81.37	-0.88	-82.25	82.3
	39333	30	0.04	-0.04	0.00	-0.04	
<i>Dyella.</i> (SMED_CAS_CRU5)	2477778	15	82.55	-81.05	-0.88	-81.93	75.7
	0	30	-6.29	6.25	0.03	6.25	
*BCP. (SMED_MAG_CRU7)	166667	15	81.87	-80.36	-0.88	-81.24	53.7
	0	30	-27.65	27.58	0.02	27.58	
*BCP. (SMED_CAS_CRU9)	1000000	15	82.85	-81.39	-0.88	-82.27	82.4
	685556	30	-0.18	0.06	0.05	-0.18	
Control negativo	NA	15	-0.54	1.04	0.11	-0.54	1.5
		30	-0.91	0.00	0.91	-0.91	

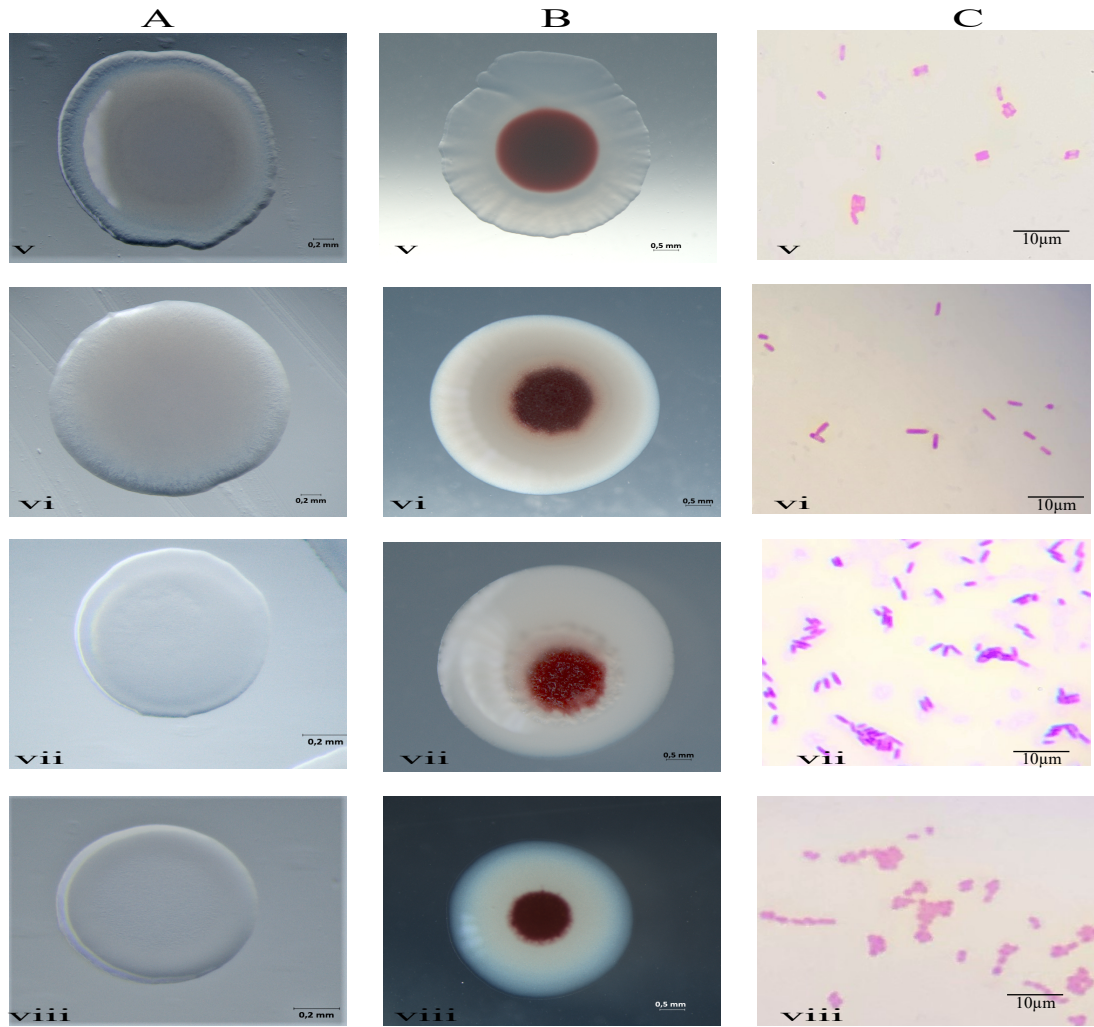
la tabla 7. Así mismo, la caracterización celular se completó con microscopía electrónica de barrido y sus morfologías más representativas se presentan en la Figura 28. Las observaciones completas de la caracterización macroscópica y microscópica de las BHCC's se amplía en la Figura ???. Finalmente, los resultados de la prueba de fluorescencia mostraron pigmentos verde/amarillos únicamente para el aislado SMED-MAG-CRU5 (ver la Figura 29).

Tabla 7: Descripción de morfología en colonia y celular para las cepas hidrocar-bonoclastas. En la imagen se describen las características físicas perceptibles en las cepas aisladas de medio R2A 0.1x con y sin TTC. El orden de las cepas en la tabla, corresponde de mayor a menor al valor total de degradación para cada cepa

Código/identificación	Caracterización de colonias en R2A 0.1x		Caracterización de colonias en R2A 0.1x con TTC		Morfología celular y tinción Gram	(%) Degradación
	Tamaño (mm)	Morfología_Colonia	Tamaño (mm)	Morfología_Colonia		
<i>Enterobacter.</i> (SMED_MAG_CRU12) <i>*BCP</i>	1,22	Circular,blanca,umbonada,entera,mate	3,75	Circular,transparente,umbonada,entera,brillante	Bacilos, Gram negativos	85.039
(SMED_CAS_CRU9) <i>Enterobacter.</i> (SMED_MAG_CRU11)	2,1	Circular,blancatransparente,convexa,entera,brillante	3,89	Circular,blancasólida,convexa,entera,mate	Bacilos, Gram negativos	82.449
(SMED_MAG_CRU4) <i>*SMED_MAG_CRU5</i>	2,19	Circular,blanca,convexa,entera,brillante	4,26	Circular,blanca,convexa,entera,brillante	Cocos, Gram negativos	82.29
(SMED_MAG_CRU5) <i>Pseudomonas sp.</i> (SMED_MAG_CRU6)	2,37	Irregular,blanca,planoconvexa,ondulada,brillante	4,56	Irregular,blanca,convexa,ondulada,brillante	Cocos, Gram negativos	82.289
(SMED_MAG_CRU6) <i>Pseudomonas sp.</i> (SMED_MAG_CRU7)	1,96	Circular,blancaconbordetransparente,planoconvexa,entera,brillante	4,54	Circular,blancaconbordetransparente,plano,ondulada,mate	Bacilos, Gram negativos	82.28
(SMED_MAG_CRU7) <i>*SMED_MAG_CRU10</i>	4,24	Circular,blancaconbordetransparente,planoconvexa,entera,brillante	3,81	Circular,blanca,convexa,entera,brillante	Bacilos, Gram negativos	82.269
(SMED_MAG_CRU10) <i>*BCP</i> (SMED_MAG_CRU9)	0,89	Circular,blancasólida,planoconvexa,entera,brillante	4,73	Circular,blancasólida,convexa,entera,brillante	Bacilos, Gram negativos	81.78
(SMED_MAG_CRU9) <i>*BCP</i> (SMED_MAG_CRU8)	0,9	Circular,blanca,plana,entera,brillante	3,6	Circular,blanca,convexa,entera,brillante	Cocos, Gram negativos	81.529
(SMED_MAG_CRU8) <i>Dyella.</i> (SMED_CAS_CRU5) <i>*BCP</i> (SMED_CAS_CRU7)	0,95	Puntiforme,blanca,planoconvexa,entera,brillante	4,87	Puntiforme,blanca,plana,entera,mate	Cocos, Gram positivos	81.41
(SMED_CAS_CRU5) <i>*BCP</i> (SMED_CAS_CRU7)	2,08	Irregular,blancaconbordetransparente,convexa,ondulada,mate	3,52	Irregular,blanca,plano,ondulada,mate, texturizada	Bacilos, Gram positivos	81.29
(SMED_CAS_CRU5) <i>*BCP</i> (SMED_CAS_CRU7)	1,071	Circular,crema,convexa,entera,brillante	4,69	Circular,blancatransparente,plano,ondulada,mate	Cocobacilos, Gram positivos	75.68
(SMED_CAS_CRU7)	1,81	Circular,blancatransparente,plano,entera,brillante	4,51	Circular,blanca,plano,entera,brillante	Bacilos, Gram positivos	53.66

**BCP=Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*





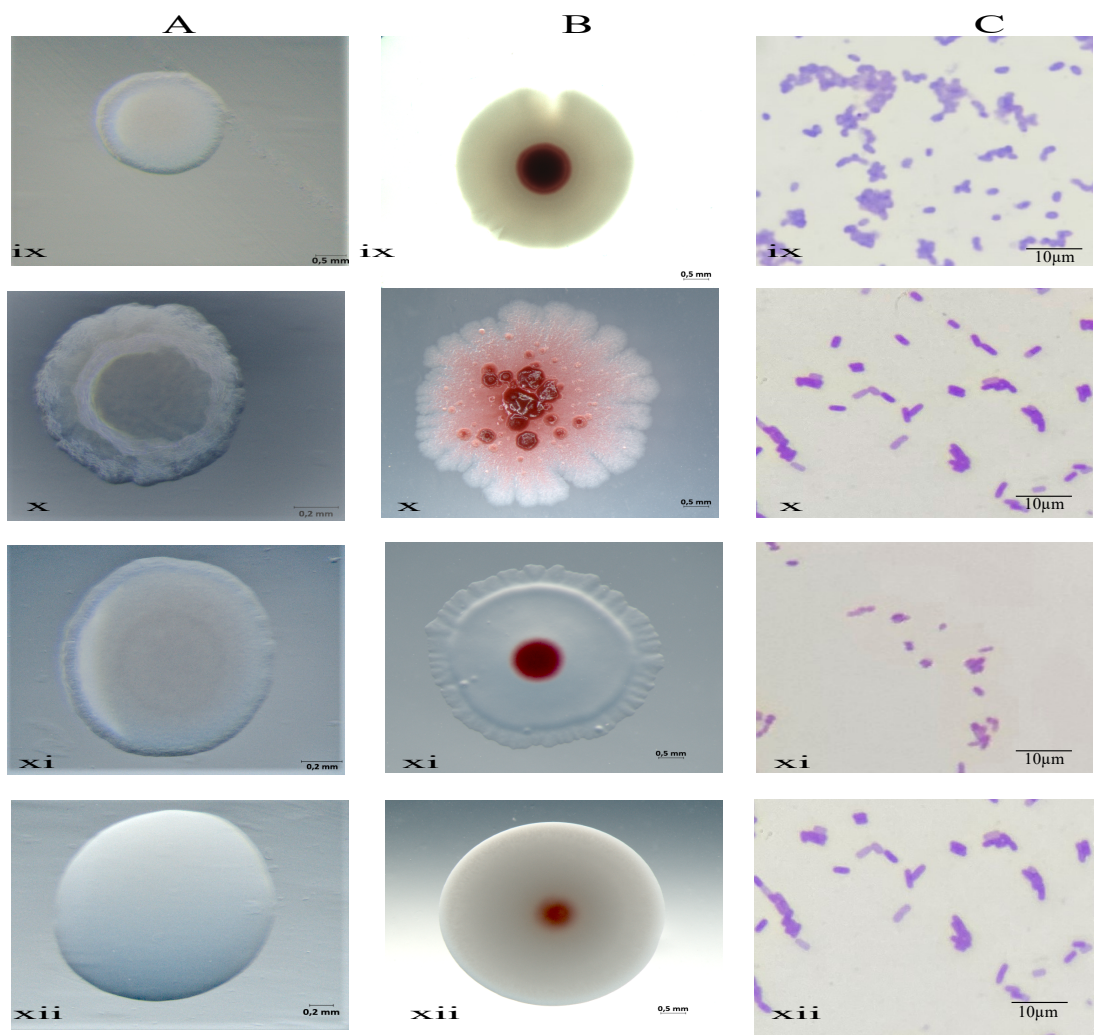


Figura 25 ,26 ,27: Caracterización fenotípica de los 12 aislamientos con capacidad hidrocarbonoclasta de las dos áreas de estudio (CAS: Casanare y MAG: Magdalena). Las imágenes se encuentran en orden de mayor a menor % de degradación de izquierda a derecha (i-xii). A) Observaciones en estereoscopio electrónico a 10x de morfologías replicadas a partir de MBS con crudo al 1 %, identificadas en medio R2A 0.1x. B) Observaciones en estereoscopio electrónico a 10x de morfologías aisladas a partir de 30 días en incubación en MBL con crudo al 1 %, identificadas en medio R2A 0.1x y TTC. La coloración roja en las colonias es reacción a la interacción con el TTC, por lo cual no se especifica como una característica propia de cada colonia. C) Observaciones bajo microscopio óptico (100x), de las morfologías y coloraciones de los diferentes aislamientos obtenidos a partir del cultivo de muestras de suelo en MBS suplementado con crudo al 1 % v/v. Las descripciones completas de la morfología

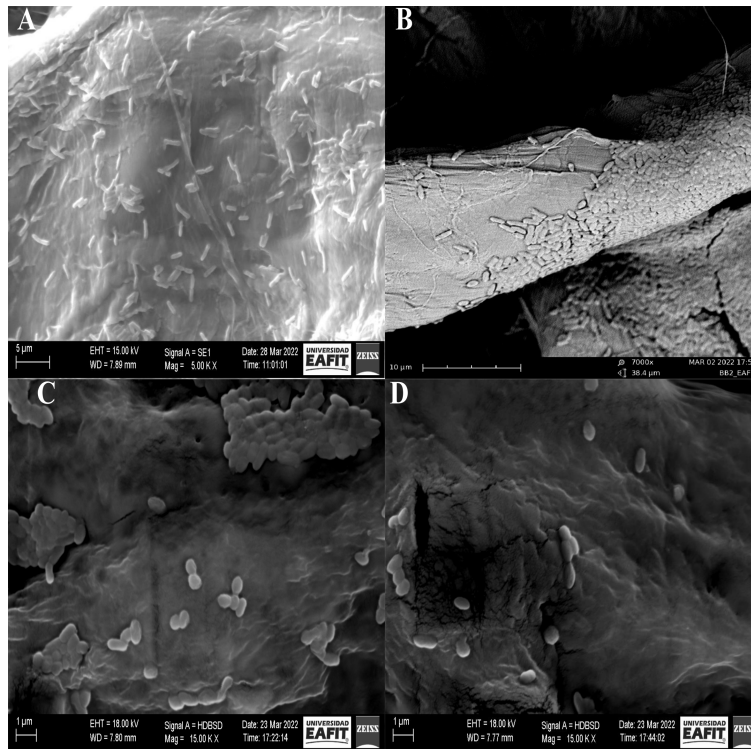


Figura 28: Observaciones bajo microscopio electrónico de barrido (SEM), de las morfologías de los diferentes aislamientos obtenidos a partir del cultivo de muestras de suelo en MBS suplementado con crudo al 1% v/v .A) Bacilos de aproximadamente 3 μm de largo; aislado SMED-MAG-CRU1. B) Bacilos de aproximadamente 1.5 μm de largo; aislado SMED-MAG-CRU8. C) Cocos de aproximadamente 0.7 μm ; aislado SMED-MAG-CRU2. D) Cocos alargados de aproximadamente 0.9 μm ; aislado SMED-CAS-CRU2.

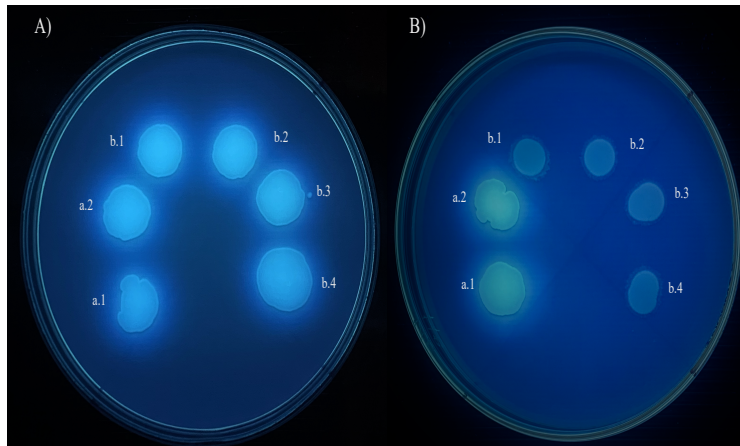


Figura 29: Observaciones de la prueba de fluorescencia para colonias degradadoras de crudo sembradas por puntos en medio King B. Las imágenes fueron tomadas a 1x, en una cámara de luz ultravioleta bajo un voltaje de 360 v. A) La placa corresponde a el ensayo de fluorescencia para el aislamiento SMED-MAG-CRU1, y estuvo conformado por, a: control positivo de fluorescencia en dos repeticiones (1,2) *Pseudomonas fluorescens*, b: aislado SMED-MAG-CRU5 en 4 repeticiones (1,4). B) La placa corresponde a el ensayo de fluorescencia para el aislamiento SMED-CAS-CRU3, y estuvo conformado por, a: control positivo de fluorescencia en dos repeticiones (1,2) *Pseudomonas fluorescens*, b: aislado SMED-CAS-CRU3 en 4 repeticiones.

5. Discusión

Tras la caracterización de un grupo de cepas aisladas de medios convencionales (R2A), extraídas de sustratos ambientales (agua, suelo y sedimento) de dos zonas con alta influencia petrolífera del país (Casanare y Magdalena), se obtuvo una muestra de la comunidad bacteriana denominada como “línea base” del repertorio funcional general bacteriano. Este estudio brinda una introducción y ruta metodológica para obtener información del proceso de cultivo, aislamiento e identificación integral (morfológica, bioquímica y genética) de bacterias ambientales en distintos sustratos cultivados directamente en campo. Es asimismo una herramienta para la visualización del reto y la necesidad de ampliar la información disponible en bases de datos públicas relacionadas con la diversidad morfológica, genética y funcional de familias bacterianas en el país.

La conformación de la línea base de la comunidad bacteriana sembrada desde campo, permitió la documentación de información primaria en relación a las condiciones ambientales en las que se encuentran ambas zonas de estudio alrededor de las consecuencias que la explotación de hidrocarburos genera. Se obtuvo un acercamiento a la realidad de las condiciones físicas, químicas y biológicas en ecosistemas perturbados por actividades antrópicas, relacionadas con la explotación de petróleo; que posteriormente fueron corroboradas bajo pruebas fisicoquímicas en el laboratorio. Además, se sugiere la profundización en el aislamiento de consorcios y cepas bacterianas con capacidad de biodegradación de HTP a partir de sustratos ambientales en condiciones de contaminación previa con hidrocarburos (Magdalena) y sin trazas de HTP verificables (Casanare). La caracterización y análisis de la identificación taxonómica de los aislamientos y consorcios con potencial hidrocarbonoclasta y su medio; generan un amplio bagaje de relaciones enzimáticas y metabólicas de interés dirigidas a la degradación de hidrocarburos a partir del uso del crudo como única fuente de carbono. Los resultados permiten abordar la discusión de la fluctuación del % compuestos de HTP (livianos, medianos y pesados), entre la comunidad bacteriana nativa completa (consorcios) y las cepas aisladas a partir de medios suplementados con crudo. Todos los procesos químicos asociados a la degradación de hidrocarburos, se traducen como la guía de ruta metabólica de interés para dar cabida al análisis y aprovechamiento de la microbiota nativa como potenciales agentes de biorremediación en áreas contaminadas con crudo.

Una vez elegidas las zonas de muestreo del estudio y definido el interés ecológico de ingresar a cada una (Casanare y Magdalena); se procedió con la verificación previa de los puntos a muestrear, las condiciones biogeoclimáticas y ambientales en cada área con el objetivo de la planeación logística para cada expedición. La idea original se centraba en discriminar puntos de muestreo de acuerdo a información cartográfica secundaria y reportes de siniestros relacionados con derrames alrededor de las zonas de alta explotación petrolífera, en puntos con afectación directa (derrames) y otros sin registro de afectaciones por derrames de crudo recientes.

El diseño experimental pretendía cubrir por cada una de las zonas tres sustratos por punto (9 puntos en Casanare y 12 en Magdalena). Sin embargo, el diseño no se cumplió por completo a consecuencia de: i. El transporte de la vidriería y material de cultivo desde el laboratorio (Medellín), hasta el laboratorio móvil en cada zona de muestreo (Aguazul-Casanare y Barrancabermeja-Santander). La logística de traslado de medios de cultivo post siembra en placas de vidrio; implicó la pérdida de muestras y replicas por la destrucción del material en el trayecto. Al final de ambas expediciones se produjo la pérdida total de 40 cajas Petri de vidrio, de las cuales 30 pertenecían a cultivos ya sembrados; generando el vacío de muestras en varios puntos. ii. La planeación del muestreo, no tuvo en cuenta la época del año en la que se realizaría cada expedición; por lo que las condiciones geoclimáticas de cada zona interfirió en la accesibilidad completa a los puntos en todos los sustratos. Es así como finalmente de Casanare no se consiguió obtener muestras del sustrato agua en el punto 1, 2, y 9. Para el sustrato de sedimento no se extrajo material en el punto 2 de muestreo. En Magdalena se logró obtener muestra y cultivo en campo del punto 1 y 3, sin embargo los cultivos en placa no llegaron en buen estado hasta el laboratorio en Medellín, de estos puntos únicamente los enriquecimientos en MBL estuvieron en condiciones aptas para continuar en incubación. Por otro lado, la realidad de las condiciones ambientales de las zonas en campo fue distinta a la esperada. A pesar de que se había obtenido información previa (proporcionada por Ecopetrol) de que en el área de Casanare en tres de los puntos se habían registrado derrames recientes (menos de un año); los análisis de concentración de hidrocarburos y grasas totales no mostraron trazas significativas para ninguno de los puntos y sustratos ($> 0.01\%$), lo que lleva a concluir que aunque en la zona se percibió la perturbación por actividades antrópicas; no están directamente relacionadas a la extracción de hidrocarburos. En el Magdalena medio la situación fue inversa, ya que en todos los puntos muestreados se confirmó trazas de HTP y grasas totales para todos los sustratos. Los análisis de laboratorio de propiedades fisicoquímicas confirmaron las condiciones ambientales perceptibles a la vista en toda la zona, siendo el alto impacto y la presencia de crudo en el ambiente el denominador común. Los valores más altos de concentración p/v para HTP fueron registrados en el punto 1 de muestreo con un % p/v de 0.42 y en el punto 7 de 0.295, siendo valores que indican una alta contaminación por trazas de hidrocarburos (Petro & Mercado, 2014; Silva et al., 2008; Stefani et al., 2015).

La comunidad bacteriana que se consiguió aislar como línea base en laboratorio, terminó conformada por 199 aislamientos de los cuales 103 se encuentran en repetición de identificación molecular. Los resultados en la cantidad de aislamientos para las dos zonas, se atribuyen a que el diseño experimental de aislamiento, se centró en discriminar las colonias por morfotipoúnico para cada sustrato en cada uno de los puntos de inspección. El número de aislamientos que se logró extraer de cada zona de estudio a partir de medios convencionales de cultivo (R2A), no refleja una diferencia relevante (83 en Casanare y 90 en Magdalena) entre las zonas de estudio. Sin embargo, los valores de abundancias UFC/mL en las dos zonas si varían (ver 6). De acuerdo al análisis de dispersión de datos (ANOVA), se encontró que existe una

diferencia significativa ($p > 0,05$), entre los valores de abundancias de las dos zonas de estudio (Casanare y Magdalena). Los sustratos de suelo y sedimento entre sí no mostraron diferencia significativa ($p < 0,05$), pero sí al momento de compararlos con los resultados de abundancias del sustrato agua. En Casanare se obtuvo valores de abundancia total en el rango de: $4.66E+09 \pm 9.74E+07$ UFC/mL, siendo el sustrato más representativo el suelo con $3.78E+09 \pm 2.88E+08$ UFC/mL. A su vez en el Magdalena se cuantificó una abundancia total de $1.91E+10 \pm 2.66E+08$ UFC/mL, con el suelo nuevamente como el sustrato con mayor densidad poblacional: $8.41E+09 \pm 2.96E+08$ UFC/mL. Para ambas zonas de estudio, el sustrato que indicó los niveles más bajos en relación a aislamientos y abundancias fue el sustrato de agua (Casanare, $3.83E+08 \pm 1.19E+08$ UFC/mL y en Magdalena, $8.23E+08 \pm 5.74E+08$ UFC/mL); esta dinámica se atribuye a que el muestreo en todos los puntos se llevó a cabo en fuentes hídricas corrientes, siendo un ambiente donde las condiciones de escorrentía y caudal modifican las propiedades físicas y químicas de un segundo a otro en el medio, interfiriendo sobre la carga orgánica a corto plazo y en consecuencia disminuye la abundancia por mL de muestra en comparación al suelo o el sedimento donde las condiciones bióticas y abióticas son más estables en el tiempo (Faggiani, 2020; Mendoza, 2017).

La diferencia de abundancias total (UFC/mL) entre una zona y otra, se puede atribuir a:

- Un sesgo en relación con la cantidad de puntos de muestreo en cada zona; siendo mayor el diseño experimental para el área de Magdalena (12 puntos) en comparación a los 9 en el Casanare.
- La variación en las condiciones ambientales asociadas al desarrollo de actividades productivas propias de cada zona. A pesar de que en el Casanare no se confirmó la presencia de valores (%) representativos en concentración de hidrocarburos, para ninguno de los puntos; si se percibió en campo una alta perturbación de los sitios de muestreo por otro tipo de actividades productivas antrópicas de la zona en 5 de los 9 puntos de inspección; como el cambio de uso de suelo. La deforestación a gran escala en la zona está directamente relacionada con: la explotación petrolera; la producción agrícola de palma de aceite, arroz y la ganadería extensiva; que son las principales actividades económicas desarrolladas en la actualidad dentro del Casanare (Martinez & Vergara, 2016). Según (Frene et al., 2018; Larrea, 2013; Vergara, 2010). la deforestación causada por la actividad petrolera se da principalmente por la apertura de nuevas redes viales, que incentivan la colonización y ampliación de fronteras agroganaderas. La pérdida de hectáreas de cobertura vegetal para actividades de producción antrópicas, favorece la erosión del suelo por pérdida de materia orgánica debido a un aumento de los procesos de mineralización; disminuye la infiltración del agua y genera pérdida de la estructura física; alteración de la composición química y modificación de las relaciones con la biota del sustrato empobreciendo la calidad del suelo. (Frene et al., 2018; Vergara, 2010). Esta situación a gran escala y a largo plazo pudo ser una variable determinante en la disponibilidad, riqueza y diversidad de los grupos bacterianos cultivables obtenidos e identificados.

La identificación taxonómica de los aislamientos de medios convencionales (R2A) mostró una alta representatividad de la familia familia Bacillaceae con 30 individuos en total. A partir

de los aislamientos de Magdalena se identificaron 21 cepas agrupadas en la familia Bacillaceae; con 2 aislamientos pertenecientes al género *Fictibacillus* y 19 a *Bacillus*. En el área del Casanare se identificaron 9 aislamientos pertenecientes a Bacillaceae, representados únicamente por *Bacillus*. Según (Tejera-hernández & Heydrich-pérez, 2011; Vargas, 2012; Villarreal-Delgado et al., 2018), el suelo es considerado el principal reservorio de este género, debido a que la mayoría de las especies de *Bacillus* son saprófitas; lo que se traduce en la amplia capacidad de metabolización de sustratos orgánicos en descomposición presentes en el suelo. Las especies de *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial debido a su habilidad para formar endosporas (ver Figura 10), característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats e incluso en ambientes bajo condiciones extremas, como los contaminados con hidrocarburos (Tejera-hernández & Heydrich-pérez, 2011; Villarreal-Delgado et al., 2018). La confirmación de la contaminación de los sustratos en campo por HTP, pueden ser la causa de haber logrado la identificación de una muestra considerablemente mayor de *Bacillus* en Magdalena.

De igual forma se confirmó la presencia de la familia Burkholderiaceae, en 17 aislamientos para Magdalena y 9 en Casanare; todos categorizados en el género *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia* (BCP). El género (BCP) pertenece al subfilo de las β -proteobacterias y abarca especies bacterianas con alta diversidad genética y plasticidad metabólica; confiriéndole una alta adaptabilidad a diversos nichos ecológicos (Coenye et al., 2001; Salles et al., 2002). Más específicamente, son capaces de ocupar ecosistemas tan diversos como suelos, plantas e incluso cuerpos animales y humanos como agentes causantes de enfermedades graves (Coenye et al., 2001; Salles et al., 2002). Aunque también se ha reportado la acción simbiótica de *Burkholderia* en procesos promotores de crecimiento para las plantas. La versatilidad del género se amplía hasta la capacidad de crecer en medios con hidrocarburos como única fuente de carbono (MacNaughton et al., 1999; Omari et al., 2018; Yang et al., 2014; Yergeau et al., 2012). Según un reporte realizado en la base de datos publicada por la Universidad de Michigan, que reúne cepas degradadoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos, el género+ *Burkholderia* cuenta con la capacidad de su eliminación en medios terrestres y acuáticos (Omari et al., 2018; Yuste et al., 2000).

La presencia de las familias Bacillaceae y Burkholderiaceae, relacionadas con procesos hidrocarbonoclastas dentro de las cepas aisladas de medios convencionales, valida el hecho de que también se obtuviera su identificación dentro del grupo de aislamientos previamente definidos con potencial hidrocarbonoclasta. Desde los 19 aislamientos que hasta la fecha se encuentran identificados, 11 se agrupan en la familia Burkholderiaceae representados nuevamente por el género *Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia*(BCP); 1 individuo se caracterizó como parte de la familia Bacillaceae, dentro del género *Bacillus*. Sin embargo, también se logró la identificación de dos aislamientos como *Pseudomonona*, pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae; a partir de cepas aisladas de Magdalena del sustrato suelo. El género *Pseudomononas* contiene bacterias Gram-negativas, obicuas, que pertenecen a la subfilo gam-

ma de las Proteobacterias y es uno de los géneros más representativos y asociados a procesos hidrocarbonoclastas, conocidas como bacterias degradadoras de crudo por excelencia (María et al., 2008; Röling et al., 2002; Zhang et al., 2012). Las *Pseudomonas* se caracterizan por su alta versatilidad metabólica que les permite adquirir la capacidad de transformar sustratos habitualmente no degradables en metabolitos fácilmente asimilables al medio (Omari et al., 2018; Romero et al., 2008; Spago et al., 2014). La familia Enterobacteriaceae, está de igual forma asociada a la capacidad de crecer en medios con hidrocarburos de petróleo como única fuente de carbono y se registró su presencia en dos cepas identificadas como Enterobacterias. (Narváez-flórez & Gómez, 2008) afirma que el género *Enterobacter* es caracterizado por poseer un potencial enzimático importante para degradar hidrocarburos, además de ser bacterias con un nivel de adaptabilidad a consorcios en conjunto con *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Burkholderia* (Omari et al., 2018; Yuste et al., 2000).

La biodegradación de hidrocarburos a través de la metabolización bacteriana depende de la estructura funcional de la microbiota en el medio afectado, pero también de la estructura química y el comportamiento físico del crudo a degradar. La caracterización física y química de un compuesto complejo como el crudo depende del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran el petróleo que los caracterizan, determinando su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o solventes (Jiménez H.G. et al., 2018). Generalmente, en las fases de exploración la industria petrolera tiene la necesidad de conocer la calidad del crudo previo a su extracción. La gravedad API (American Petroleum Institute), es un indicador físico de calidad; a mayor gravedad API ($^{\circ}$ API) los crudos son más livianos, su viscosidad (mm^2/s) y tendencia aditiva disminuyen, aumentando la tendencia a emulsificarse (Jiménez H.G. et al., 2018; Orejuela Parra, 2010). De acuerdo con los resultados de propiedades fisicoquímicas (ver Tabla 2) del crudo usado en toda la fase experimental extraído del área de Magdalena, se registró que posee una gravedad API de 28.8 $^{\circ}$ API que permite categorizarlo como un crudo mediano (ver Tabla 3) (EITI.Iniciativa para la transparencia de las industrias extractivas, 2017). Además de la calidad, el crudo se caracteriza en función de la concentración química de algunos compuestos; teniendo en cuenta que posee una concentración moderada del 27 % de asfaltenos y baja de azufre (0 a 1 %) se define como un crudo base parafínico-naftético (Orejuela Parra, 2010).

La confirmación de la configuración de la estructura porcentual de compuestos de HTP, en el crudo puro de Magdalena se realizó con en análisis gráfico de los reportes arrojados por la cromatografía GC-FID (Ver la figura 4). Cada pico o grupo de picos provenientes de la elusión es identificado por comparación con sus respectivos índices de retención ($\mu.V$). Generalmente, los cromatogramas de crudos presentan picos predominantes representando las cadenas lineales (livianos), mientras que los picos menores, representan las cadenas ramificadas cíclicas y compuestos aromáticos (pesados) (Méndez et al., 2011; Orejuela Parra, 2010). El detector de ionización de llama, responde al número de átomos de carbono que entran en el detector por unidad de tiempo, es sensible a la masa, más que un sistema sensible a la

concentración. En consecuencia, entre mayor sea el tiempo (minutos) de retención ($\mu.V$) y menor el tamaño del pico; la concentración (%) de enlaces de hidrocarburos y número de carbonos aumenta (Méndez et al., 2011; Orejuela Parra, 2010). La concentración de HTP es determinada mediante la integración del cromatograma considerando el área bajo la curva de los picos resueltos.

Para la determinación de las tasas de biodegradación de cada una de las cepas en análisis, se registró los datos de crecimiento expresados en (UFC/mL) durante todo el mes de incubación en los MBL suplementados con crudo al 1% v/v (ver en la Figura 22); con el objetivo de relacionar la cinética de crecimiento bacteriana con los % de biodegradación. El crecimiento de todos los aislados en ambas áreas de estudio (Casanare, Magdalena), aunque en escalas diferentes, muestran una dinámica decreciente a partir del día 10 de incubación que continúa en descenso hasta el día 30. La cinética en desarrollo de las cepas en medios con crudo al 1% v/v, se puede atribuir a las condiciones extremas de crecimiento, en las que las bacterias en estudio tuvieron que adaptarse (de Medeiros Barbosa et al., 2020; Oliver D, 2005) reportan que, algunas cepas bacterianas entran en una fase llamada “VBNC” (del inglés Viable But Non Culturable), donde se observa una baja actividad metabólica, debido a entornos que provocan estrés en la célula. Las tensiones ambientales que el crudo ofrece al medio de crecimiento, puede llegar a ser letales para otras bacterias, pero las BHCC que residen en el estado VBNC, permanecen en el estado de latencia. Existen pruebas que determinan si dichas células están muertas o vivas pero en un estado VBNC y es a partir de un recuento de viabilidad celular. Los recuentos de células viables se basan en la verificación de la actividad metabólica intracelular ó mediante la confirmación del estado y potencial de la membrana celular (Breeuwer & Abee, 2000; Créach et al., 2003). De acuerdo a la revisión de (Oliver D, 2005), se ha verificado que *Enterobacter*, *Pseudomonas*, y *BCP* hacen parte de la lista de bacterias en las que se ha registrado pueden llegar a residir en un estado VBNC. El número de UFC/mL disminuye entre mayor sea el tiempo de contacto en el medio con crudo al 1% v/v, ya que probablemente demande un coeficiente de mantención energética mayor que en un medio convencional. Se ha comprobado que en ambientes extremos de crecimiento o con fuentes de carbono complejas o restringidas que generen condiciones de estrés, el consumo de energía aumenta para mantenerse viables, aunque este proceso implique la disminución de la duplicación celular en el tiempo total de la incubación (Breeuwer & Abee, 2000; Créach et al., 2003; Oliver D, 2005; Van Bodegom, 2007).

Posterior al mes de incubación, se obtuvo los resultados de degradación total para todas las cepas aisladas y consorcios (ver Figura 25 y 21) en relación a su cinética de crecimiento. El % más alto de degradación de HTP obtenido fue de 91.28%, siendo el consorcio bacteriano del punto 1 de muestreo (SU1) el desarrollador. El alto valor de degradación en este punto se puede atribuir a que es el sitio en Magdalena dónde se comprobó mayor concentración de hidrocarburos en campo. Las altas trazas de contaminación por HTP, pudo inducir a la comunidad bacteriana endógena a la activación de procesos hidrocarbonoclastas in-situ.

Dependiendo la cantidad de hidrocarburos en el sustrato, el crudo puede actuar como bioestimulante de procesos hidrocarbonoclastas para algunos microorganismos. No obstante, fue el único valor porcentualmente alto; en general de los 12 consorcios 8 indicaron una degradación menor del 10 % y 3 entre el 10 - 22 % de degradación. Los porcentajes de contaminación de HTP, en 11 de los 12 puntos de muestreo pudo no ser el suficiente para activar los procesos hidrocarbonoclastas en la comunidad bacteriana. Aparentemente, los consorcios bacterianos no estaban adaptados a concentraciones altas de hidrocarburos en su medio de crecimiento nativo y ser incubadas en medios suplementados con crudo al 1 % v/v, ocasionó la inhibición de la degradación, representada en valores menores en comparación a las del punto 1. Sin embargo, los procesos hidrocarbonoclastas en comunidades bacterianas, son lentos y requieren de más tiempo que el usado para este ensayo (30 días), en este sentido sería válido la verificación de la misma prueba con un diseño experimental más largo temporalmente (45-60 días) (Jiménez H.G. et al., 2018; Omari et al., 2018; Ramdass & Rampersad, 2021).

En los aislamientos, los valores de degradación indicaron mayor homogeneidad entre sus resultados de los 12 aislamientos. El valor más alto de biodegradación fue del 85.039 % por el aislado SMED-MAG- CRU12 (Magdalena) identificada como *Enterobacter*; seguida del aislado SMED-CAS-CRU9 (Casanare), identificada como *BCP* con un 82.449 % de degradación total. Las *Pseudomonas* demostraron una degradación de 82.269 y 81.78 % por los aislamientos SMED-MAG-CRU6 y 7 respectivamente. Los valores más bajos (75.68 y 53.66 %) estuvieron a cargo de los aislados SMED-CAS-CRU5 Y SMED-CAS-CRU7; identificados como *Dyella* y *BCP*. El origen de las muestras no es una variable que aparentemente haya significado una diferencia representativa en las tasas de biodegradación, ya que los valores más altos de degradación están representados por cepas aisladas de Magdalena y Casanare. La identificación molecular de los aislados que degradan en mayor y menor porcentaje, tampoco son diferenciales entre las bacterias hasta el momento identificadas. En general los valores corroborados bajo las pruebas de biodegradación son consecuentes a los estudios previos de biodegradación de HTP por aislamientos bacterianos de suelos. Incluso los valores que en este estudio se reportan como lo más bajos (75.68 % y 53.66 %), son valores considerablemente altos para el tiempo de incubación del experimento (30 días).(de Medeiros Barbosa et al., 2020; Enrique & Rodriguez Vazquez, 2003; Jiménez H.G. et al., 2018; Méndez et al., 2011).En este sentido es válido afirmar que, para efectos de este ensayo se corroboró bajo GC-FID las bacterias aisladas de suelos con potencial hidrocarbonoclasta son capaces de degradar entre 50 y 80 % de compuestos de HTP y pertenecen a los géneros (*Enterobacter*, *Pseudomonas* y *BCP*). Estos géneros han demostrado tener la capacidad de crecer en las interfases de los hidrocarburos y producir exopolímeros para adherirse a las estructuras; romper cadenas (C:H) y facilitar el acceso a la fuente de carbono. (María et al., 2008; Omari et al., 2018; Röling et al., 2002; Yuste et al., 2000; Zhang et al., 2012).

Los procesos de biodegradación de hidrocarburos son principalmente sintetizados a partir de la transformación biológica de los compuestos orgánicos, por la acción catalítica de las

enzimas. La oxidación biológica de compuestos orgánicos como los hidrocarburos es normalmente un proceso de deshidrogenación, catalizado por enzimas deshidrogenasas. El cloruro de 2,3,5 trifenil tetrazolio (TTC) que actúa como receptor de electrones para muchas enzimas deshidrogenasas, es un mecanismo común para la verificación de alta actividad enzimática. El TTC es reducido por el efecto catalítico de la deshidrogenasa del suelo, y forma trifenil formazán (TPH) que tiene un color rojizo característico. La verificación a partir de colorimetría de la acción positiva a la enzima deshidrogenasa, se logró corroborar para los 12 aislamientos hidrocarbonoclastas (ver Figura 27). Además, el TTC es un indicador directo de actividad respiratorio del metabolismo oxidativo, proceso intracelular que permite probar la viabilidad celular de las BHCC (Créach et al., 2003). Tras usar TTC como aditivo del medio R2A 0.1x, se logró una identificación morfológica de colonias complementaria de los aislamientos resumida en la Figura 26. A partir de las pruebas fenotípicas complementarias se identificó la capacidad de fluorescencia, a partir de la producción de pigmentos verde-amarillos en uno de los aislamientos hidrocarbonoclastas; SMED-MAG-CRU5, este aislamiento se encuentra a la fecha en proceso de identificación molecular (ver imagen 29). Con el objetivo de profundizar en la caracterización morfológica celular de las bacterias hidrocarbonoclastas, se completó un acercamiento a su estructura celular mediante la microscopía electrónica de barrido (ver 28), donde se confirmó a una mejor resolución la estructura celular de los aislados.

Lo resultados de este estudio sugieren la importancia de la profundización en la caracterización e identificación funcional de las comunidades bacterianas asociadas a dos zonas con un alto impacto por actividades de explotación petrolífera en Colombia. La conformación de una línea base, se valida como una muestra de las dinámicas fenotípicas, de diversidad y abundancia de algunos grupos bacterianos en sustratos ambientales con y sin contaminación de hidrocarburos. Sin embargo, la ampliación de un diseño experimental con vista a la determinación del repertorio funcional general mejoraría la resolución del impacto del estudio en relación de diversidad hacia otro tipo de grupos bacterianos. La guía metodológica de este estudio, aporta como referente hacia el enriquecimiento de prácticas y técnicas de mejoramiento para el cultivo, aislamiento e identificación molecular de bacterias a partir de medios con crudo. El conjunto de pruebas fenotípicas complementarias para las BHCC, se concretaron como el registro de algunas de las propiedades más expresivas de las bacterias hidrocarbonoclastas, generando un compilado de imágenes que son prueba del reto técnico que involucra la cultoronomía de bacterias en medios con crudo; aunque verifica la oportunidad de aislamiento y visualización de un grupo funcional bacteriano con una gran versatilidad fenotípica y bioquímica a la espera de ser profundizada y ampliada. El análisis de verificación de (%) de degradación de HTP, es un buen referente de la metabolización y transformación de compuestos a cargo de la comunidad bacteriana, esta información es la base para la determinación del potencial de biorremediación de aislamientos y consorcios bacterianos nativos a partir de la bio estimulación de actividades hidrocarbonoclastas en suelos con y sin contaminación in situ.

Tabla 8: Caracterización de tipos crudo en función de *API*, *American Petroleum Institute*, tomado de (*EITI.Iniciativa para la transparencia de las industrias extractivas*, 2017)

Tipo de crudo	Gravedad API	Densidad (Kg/m ³)
Liviano	31,1 °API	<870
Mediano	Entre 22,3 y 31,1 °API	920-870
Pesado	Entre 10 y 22,3 °API	100-920
Extra pesado	menor a 10 °API	> 1000

6. Conclusiones

La línea base que se consiguió construir a partir de los aislamientos extraídos de muestras ambientales (agua, suelo, sedimento) del Casanare y Magdalena, se termino conformando por 199 aislamientos identificados en 23 géneros taxonómicos, agrupados en 18 familias diferentes. Las familias más representativas en número de individuos categorizados hasta la fecha fueron: Bacillaceae y Burkholderiaceae, representadas por los género *Bacillus* y *BCP*, respectivamente. Los géneros *Bacillus* y *BCP*, han sido previamente asociados a bacterias caracterizadas a partir de sustratos ambientales con amplia capacidad de metabolización de compuestos orgánicos incluso en condiciones extremas. La identificación de algunos grupos bacterianos en ambas zonas, es la herramienta que permite abordar una noción de las consecuencias ecológicas de actividades antrópicas que se desarrollan en cada área de estudio. Así mismo, brinda la posibilidad de profundizar la inspección de las relaciones fenotípicas de cada género con las características fisicoquímicas de cada sustrato y su proporción de interacción con el ecosistema en general.

Los 27 aislamientos con potencial hidrocarbonoclasta que en este estudio fueron cultivados y caracterizadas a partir de medios suplementados con crudo al 1 % v/v, se establecieron como los primeros publicados dentro de un catálogo de línea base en representación de las bacterias con potencial de biodegradación. La identificación molecular hasta la fecha de las BHCC, mostró la presencia de géneros que han sido comúnmente asociados a procesos hidrocarbonoclastas y de biorremediación por excelencia como: *Bacillus* y *Pseudomona*. Así mismo, se comprobó la identificación de géneros (*Enterobacter*, *BCP*) que aunque anteriormente habían sido relacionados con actividades hidrocarbonoclastas; no se había profundizado en la información sobre su potencial de biodegradación. Aunque, dentro del estudio se genera un aporte robusto, con respecto a la caracterización morfológica a diferentes escalas y medios de las BHCC, la información sobre las dinámicas bioquímicas y de crecimiento de los aislamientos en contacto con enriquecimientos con crudo se podrían indagar a mayor profundidad como soporte del estado de "VBNC", en que los aislados hidrocarbonoclastas demostraron residir.

A través de los resultados de los porcentajes de biodegradación total calculados a partir de

los reportes de la GC-FID, verificados para los 12 consorcios y las 12 cepas bacterianas puestas a prueba en un mes de incubación, se probó las capacidades de transformación de hidrocarburos a partir de actividades hidrocarnoclastas. La clave de la transformación se centró en la modificación de la estructura química de un compuesto de alta complejidad como el crudo, afectando la relación entre la composición principalmente de compuestos medianos y livianos de HTP. La dinámica general de la actividad de biodegradación se atribuyó a la disminución de % de compuestos medianos y el aumento porcentual de los compuestos livianos en medio de los 30 días de incubación. Es así como se termina reportando unas tasas de biodegradación o transformación en los aislamientos con valores entre 53.66 y 82 %, relacionándose directamente con su cinética de crecimiento (UFC/mL). En el caso de la comunidad bacteriana, se reportó una alta actividad de biodegradación (91.28 %) únicamente para uno de los enriquecimientos; resultados que dan para inferir se debe mejorar el diseño experimental en relación al tiempo de incubación en los consorcios. Todos los datos de biodegradación se validan en referencia de los compuestos totales de hidrocarburos (HTP) en la muestra tomados como un 100 %, bajo el diseño y las herramientas de verificación de composición química el estudio no brinda información de biodegradación de compuestos específicos de hidrocarburos.

*El Anexo 1, se reporta como un compilado en Excel que se encuentra adjunto a este documento como información suplementaria.

7. Referencias

Referencias

- Abasolo, F. & Morante, L. (2019). *Bacterias degradadoras de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con hidrocarburos*.
- Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X. & Ma, F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- Alvaro, C. E. S., Arocena, L. A., Martínez, M. Á. & Nudelman, N. E. S. (2017). Biodegradación Aerobia de Fracciones de Hidrocarburos Provenientes de la Actividad Petrolera en un Suelo de la Región Patagonia Norte, Argentina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 247-257. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.02.06>height
- Asociación Colombiana de Petroleo(ACP). (2021). *Informe de desempeño ambiental 2016-2019*.
- Atlas, R. M. (1991). Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation Oil Spills. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, (March 1989), 149-156.

- Avellaneda Cusara, A. (2013). Petróleo, seguridad ambiental y exploración petrolera marina en Colombia. *Iconos - Revista de Ciencias Sociales*, (21), 11-17. <https://doi.org/10.17141/iconos.21.2005.81>
- Balba, M. T., Al-Awadhi, N. & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 155-164.
- Banfield, J. F. & Nealson, K. H. (1998). Geomicrobiology : Interactions between Microbes and Minerals Bacteria in oligotrophic environments : Starvation-survival lifestyle. *International Microbiology*, 1(1998), 241-242.
- Baoune, H., Aparicio, J. D., Pucci, G., Ould El Hadj-Khelil, A. & Polti, M. A. (2019). Bioremediation of petroleum-contaminated soils using *Streptomyces* sp. Hlh1. *Journal of Soils and Sediments*, 19(5), 2222-2230. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02259-w>
- Benavides, J., Quintero, G., Vizcaíno, A. L. G., Cáceres, D. C. J., Riaño, S. M. G. & García, J. M. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82. <https://doi.org/10.22490/24629448.351>
- Benítez, M., Larramendi, V., Gabriela, M., Antonio, M. & Castell, P. (2021). Escasez y contaminación del agua, realidades del siglo XXI. *Revista estudiantil-16 de Abril*, 60(259), 1-7.
- Bento, F. M., de Oliveira Camargo, F. A., Okeke, B. & Frankenberger-Júnior, W. T. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34, 65-68. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822003000500022>
- Bidja, A. M. T., Li, T., Shah, M. N. & Zhong, W. (2019). Biodegradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in highly contaminated soils by natural attenuation and bioaugmentation. *Chemosphere*, 234, 864-874. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.111>
- Bollmann, A., Lewis, K. & Epstein, S. S. (2007). Incubation of environmental samples in a diffusion chamber increases the diversity of recovered isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(20), 6386-6390. <https://doi.org/10.1128/AEM.01309-07>
- Breeuwer, P. & Abee, T. (2000). Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 193-200. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00163-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00163-x)
- Cerquera, C. R. (2016). QUIEN RESPONDE EN COLOMBIA POR EL DANO AMBIENTAL CAUSADO POR EL DERRAME DE CRUDO. *Revista Global lure*, 145-168.
- Chaudhary, D. K., Khulan, A. & Kim, J. (2019). Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. *Scientific Reports*, 9, 6666. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43182-x>
- Coenye, T., LiPuma, J. J., Henry, D., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Gillis, M., Speert, D. P. & Vandamme, P. (2001). Burkholderia cepacia genomovar VI, a new member of the Burkholderia cepacia complex isolated from cystic fibrosis patients. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 271-279. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-271>

- Créach, V., Baudoux, A.-C., Bertru, G. & Rouzic, B. L. (2003). Direct estimate of active bacteria: CTC use and limitations. *Journal of Microbiological Methods*, 52(1), 19-28. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(02\)00128-8](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(02)00128-8)
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2 : more models , new heuristics and parallel computing CircadiOmics : integrating circadian genomics , transcriptomics , proteomics. *Nature Methods*, 9(8), 2106. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- de Gouw, J. A., Veefkind, J. P., Roosenbrand, E., Dix, B., Lin, J. C., Landgraf, J. & Levelt, P. F. (2020). Daily Satellite Observations of Methane from Oil and Gas Production Regions in the United States. *Scientific Reports*, 10, 1379. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57678-4>
- de Medeiros Barbosa, I., da Cruz Almeida, É. T., Gomes, A. C. A. & de Souza, E. L. (2020). Evidence on the induction of viable but non-culturable state in *Listeria monocytogenes* by *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. essential oils in a meat-based broth. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 62, 102351. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2020.102351>
- Díaz-martínez, M. E., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R. & Almaraz, J. J. (2013). *en suelo con diésel , y aplicación de bioestimulación y bioaumentación*.
- Ecopetrol. (2019). *Reporte integrado de gestión sostenible Ecopetrol.Bogota, Colombia*.
- Ecopetrol. (2020). *Reporte integrado de gestión sostenible Ecopetrol.Bogota, Colombia*.
- Ecopetrol. (2021). *Resultados 2021, Los mejores resultados de la historia. Ecopetrol.Bogotá, Colombia*.
- EITI.Iniciativa para la transparencia de las industrias extractivas. (2017). *Perfiles-Crudo*.
- el-Din Sharabi & Bartha, R. (1993). Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1201-1205. <https://doi.org/10.1128/aem.59.4.1201-1205.1993>
- Enrique, J. & Rodríguez Vazquez, R. (2003). Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*, 21(4), 493-502.
- Esaú López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G. & Franco-Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. www.medigraphic.org.mx
- Espinosa, L. F. (2019). Hydrocarbon contamination in mangrove sediments of the Mira river estuary, Colombian Pacific coast, affected by crude oil spills. (July). <https://doi.org/10.25268/bimc.invemar.2019.48.1.763>
- Faggiani, E. N. (2020). “ *Análisis de comunidades bacterianas en muestras de agua puesta a punto de un protocolo in- house de secuenciación masiva de amplicones del gen ribosomal 16S* ”.
- Fernández, O. (2017). Cultivos de Bacterias. *Facultad de Ciencias Naturales y ciencias de la salud, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco*, 385-388. <http://www.>

- fcn.unp.edu.ar/sitio/microgeneral/wp-content/uploads/2017/02/04-CULTIVO-DE-BACTERIAS.pdf
- Ferrari, B. C., Winsley, T., Gillings, M. & Binnerup, S. (2008). Cultivating previously uncultured soil bacteria using a soil substrate membrane system. *Nature Protocols*, 3(8), 1261-1269. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.102>
- Frene, J. P., Gabbarini, L. A. & Wall, L. G. (2018). Efectos de la labranza en la estructura y la actividad biológica a nivel de los microagregados del suelo. *Ciencia del suelo*, 36(2), 50-61.
- Fuentes, S., Barra, B., Caporaso, J. G. & Seeger, M. (2016). From Rare to Dominant: a Fine-Tuned Soil Bacterial Bloom during Petroleum Hydrocarbon Bioremediation (F. E. Löffler, Ed.). *Applied and Environmental Microbiology*, 82(3), 888-896. <https://doi.org/10.1128/aem.02625-15>
- (GCE). (2006). *MANUAL DEL SECTOR DE LA ENERGÍA, Quema de Combustibles*.
- Gogoi, B. K., Dutta, N. N., Goswami, P. & Mohan, T. R. K. (2003). A case study of bioremediation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil at a crude oil spill site. 7, 767-782.
- Harcourt, P., Ayotamuno, M. J., Kogbara, R. B. & Ogaji, S. O. T. (2006). APPLIED Bioremediation of a crude-oil polluted. 83, 1249-1257. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2006.01.003>
- IDEAM. (2012). *El medio ambiente en Colombia. Ecosistemas. Bogotá D.C.*
- IEA. (2021). *Net Zero by 2050: A Roadmap for the Global Energy Sector*.
- Iqbal, A., Mukherjee, M., Rashid, J., Khan, S. A., Ali, M. A. & Arshad, M. (2019). Development of plant-microbe phytoremediation system for petroleum hydrocarbon degradation: An insight from alkB gene expression and phytotoxicity analysis. *Science of The Total Environment*, 671, 696-704. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.331>
- Jiao, J. Y., Liu, L., Hua, Z. S., Fang, B. Z., Zhou, E. M., Salam, N., Hedlund, B. P. & Li, W. J. (2021). Microbial dark matter coming to light: Challenges and opportunities. *National Science Review*, 8(3), 1-5. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwaa280>
- Jiménez H.G., Venegas-Sánchez J.A., Jiménez-Islas D. & Rivera-Rios J.M. (2018). Conformación de un consorcio bacteriano para la degradación de Hidrocarburos. *Mecatrónica-Energías Renovables-Sistemas Computacionales-Innovación Agrícola*, 106-111.
- Larrea, C. (2013). *¿ Está agotado el periodo petrolero en Ecuador ? Alternativas hacia una sociedad Un estudio multicriterio*. Ediciones la Tierra.
- Lors, C., Ryngaert, A., Périé, F., Diels, L. & Damidot, D. (2010). Evolution of bacterial community during bioremediation of PAHs in a coal tar contaminated soil. *Chemosphere*, 81(10), 1263-1271. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.021>
- MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. (Vol. Tomo I). Ed.Médica Panamericana.
- MacNaughton, S. J., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y.-J. & White, D. C. (1999). Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil

- Spill. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3566-3574. <https://doi.org/10.1128/aem.65.8.3566-3574.1999>
- María, R., Silva, P., Pozo, M. I. C., Manuel, J., Montes, G., Rodríguez, Á., Viñas, M. & Cantero, D. (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.
- Martinez, J. N. & Vergara, C. (2016). Conflicto Armado, Posconflicto con las Farc-Ep y Medio Ambiente en Colombia: Una Mirada Coyuntural Del Departamento De Putumayo. *Revista estudiantes fac.cien.econ*, 1(1), 19-30. <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/CREFCE/article/viewFile/3270/2840>
- Méndez, M., Rennola, L., Peña, M. & Rodríguez, P. (2011). Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) usando CG-FID en suelos de un patio de tanques en desuso situado en Catia La Mar – Venezuela. *Revista Ciencia e Ingeniería*, 32(1), 31-38.
- Mendoza, S. P. (2017). “Variabilidad bacteriana en los efluentes y afluentes de los cuerpos de agua , por influencia de la producción larvaria del camarón en la zona de Mar Bravo” (Tesis doctoral). Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Ingeniería Geológica , Minera , Metalúrgica y Geográfica Unidad de Posgrado.
- Middlebrook, A. M., Murphy, D. M., Ahmadov, R., Atlas, E. L., Bahreini, R., Blake, D. R., Brioude, J., de Gouw, J. A., Fehsenfeld, F. C., Frost, G. J., Holloway, J. S., Lack, D. A., Langridge, J. M., Lueb, R. A., McKeen, S. A., Meagher, J. F., Meinardi, S., Neuman, J. A., Nowak, J. B., . . . Ravishankara, A. R. (2011). Air quality implications of the Deepwater Horizon oil spill. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(50), 20280-20285. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110052108>
- Mills, M. A., Bonner, J. S., McDonald, T. J., Page, C. A. & Autenrieth, R. L. (2003). Intrinsic bioremediation of a petroleum-impacted wetland. *Marine Pollution Bulletin*, 46(7), 887-899. [https://doi.org/10.1016/s0025-326x\(02\)00367-3](https://doi.org/10.1016/s0025-326x(02)00367-3)
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A. & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era (E. Teeling, Ed.). *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Miranda, D. & Restrepo, R. (2005). Los derrames de petróleo en ecosistemas tropicales - Impactos, consecuencias y prevención. La experiencia de Colombia. *International Oil Spill Conference Proceedings*, 571-575.
- Mulligan, C. N. & Yong, R. N. (2004). Natural attenuation of contaminated soils. *Environment International*, 30(4), 587-601. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2003.11.001>
- Narváez-flórez, S. & Gómez, M. L. (2008). SELECCIÓN DE BACTERIAS CON CAPACIDAD DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS AISLADAS A PARTIR DE SEDIMENTOS DEL CARIBE COLOMBIANO. 37(1006), 61-75.
- Olade. (2021). *Panorama Energético de América Latina y el Caribe*.
- Oliver D, J. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. 43, 93-100.

- Omari, R., Giulia, S., Edoardo, P. & Dalila, S. (2018). Modulation of microbial consortia enriched from different polluted environments during petroleum biodegradation. *Biodegradation*, 29(2), 187-209. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9823-3>
- Orejuela Parra, P. A. (2010). Caracterización de la Gravedad API en el Campo Lisama (Cuenca Valle Medio Del Magdalena) a partir de la Pirolisis Rcock-Eval Vi, 143.
- Pabón, J. C. (2012). Cambio Climático En Colombia: Tendencias En La Segunda Mitad Del Siglo XX y Escenarios Posibles Para El Siglo XXI. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 36(139), 261-278.
- Paulo Emílio V, M. (2013). Materiais particulados: produtos ameaçadores resultantes da queima de combustíveis. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 18(4), i-iii. <https://doi.org/10.1590/s1517-70762013000400001>
- Petro, H. & Mercado, G. d. C. (2014). Biorremediación De Suelos Contaminados Por Derrames De Hidrocarburos Derivados Del Petróleo En Colombia.
- Ramdass, A. C. & Rampersad, S. N. (2021). Diversity and oil degradation potential of culturable microbes isolated from chronically contaminated soils in trinidad. *Microorganisms*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9061167>
- Rendón, M. J. P. & Castro, J. P. (2012). Expectativas sociales y deterioro ambiental por el petróleo: Caso de cárdenas, tabasco, México. *Cuadernos de antropología: Revista Digital del Laboratorio de Etnología "María Eugenia Bozzoli Vargas"*, 22(1), 3. <https://doi.org/10.15517/cat.v22i0.6089>
- Rodriguez, J. M. S. (2008). *Manual de lucha contra la contaminación por hidrocarburos. Servicio Publicaciones UCA*. Publicaciones UCA.
- Röling, W. F. M., Milner, M. G., Jones, D. M., Lee, K., Daniel, F., Swannell, R. J. P. & Head, I. M. (2002). Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient-Enhanced Oil Spill Bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), 5537-5548. <https://doi.org/10.1128/aem.68.11.5537-5548.2002>
- Romero, S. E. G., Bustos, D. C. G., Marín, A. M. H., Rodríguez, C. Z. H., Casallas, M. L. & Vargas, P. C. M. (2008). Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Nova*, 6(9), 76. <https://doi.org/10.22490/24629448.398>
- Rossi, M. G. (2002). *Evaluación y propuestas de remediación a suelos contaminados con metales pesados e hidrocarburos de procedencia industrial* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo Leon.
- Salles, J. F., Souza, F. A. D. & van Elsas, J. D. (2002). Molecular Method To Assess the Diversity iBurkholderia/iSpecies in Environmental Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 1595-1603. <https://doi.org/10.1128/aem.68.4.1595-1603.2002>
- Silva, R. P., Camacho, P. M. I., José, M., Gómez, M., Ábalos, R., M, V. & Domingo, 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.

- Spago, F., Mauro, C. I., Oliveira, A., Beranger, J., Cely, M., Stanganelli, M., Simionato, A., Martin, J. S., Andrade, C., Mello, J. & Andrade, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. *Crop Protection*, *62*, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.011>
- Stefani, F. O., Bell, T. H., Marchand, C., De La Providencia, I. E., Abdel, St-Arnaud, M. & Hijri, M. (2015). Culture-dependent and -independent methods capture different microbial community fractions in hydrocarbon-contaminated soils. *PLoS ONE*, *10*(6), e0128272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128272>
- Tejera-hernández, B. & Heydrich-pérez, M. M. R.-b. M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos.
- Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., Prill, R. J., Tripathi, A., Gibbons, S. M., Ackermann, G., Navas-Molina, J. A., Janssen, S. & Kopylova. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale microbial diversity. *Nature*, *551*(7681), 457-463. <https://doi.org/10.1038/nature24621>
- Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I. & Okuyama, H. (2007). Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*(12), 1739-1745. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9423-6>
- Van Bodegom, P. (2007). Microbial maintenance: A critical review on its quantification. *Microbial Ecology*, *53*(4), 513-523. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9049-5>
- Vargas, C. (2012). *Potencial de Hidrocarburos en Colombia*. Universidad Nacional, Departamento de Geociencias - Sede Bogota.
- Varjani, S. J. (2017). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. *Bioresource Technology*, *223*, 277-286. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.10.037>
- Vergara, W. (2010). La ganadería extensiva y el problema agrario. El reto de un modelo de desarrollo rural sustentable para Colombia. *1* (3).
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I. & los Santos-Villalobos, S. D. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, *36*(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wu, M., Li, W., Dick, W. A., Ye, X., Chen, K., Kost, D. & Chen, L. (2017). Bioremediation of hydrocarbon degradation in a petroleum-contaminated soil and microbial population and activity determination. *Chemosphere*, *169*, 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.059>
- Yang, Y., Wang, J., Liao, J., Xie, S. & Huang, Y. (2014). Abundance and diversity of soil petroleum hydrocarbon-degrading microbial communities in oil exploring areas. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(4), 1935-1946. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6074-z>

- Yergeau, E., Sanschagrin, S., Beaumier, D. & Greer, C. W. (2012). Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated Canadian high arctic soils. *PLoS ONE*, 7(1), 1-10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030058>
- Yuste, L., Corbella, M. E., Turiñán, M. J., Karlson, U., Puyet, A. & Rojo, F. (2000). Characterization of bacterial strains able to grow on high molecular mass residues from crude oil processing. *FEMS Microbiology Ecology*, 32(1), 69-75. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2000.tb00700.x>
- Zhang, X., Xu, D., Zhu, C., Lundaa, T. & Scherr, K. E. (2012). Isolation and identification of biosurfactant producing and crude oil degrading *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemical Engineering Journal*, 209, 138-146. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.07.110>
- Zhao, H., Zhang, Y., Xiao, X., Li, G., Zhao, Y. & Liang, Y. (2017). Different phenanthrene-degrading bacteria cultured by in situ soil substrate membrane system and traditional cultivation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 117, 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.12.016>