

BACTERIAS MARINAS NATIVAS

Degradadoras de Compuestos Orgánicos
Persistentes en Colombia



Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras
José Benito Vives De Andréis
Vinculado al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

BACTERIAS MARINAS NATIVAS

*Degradadoras de Compuestos Orgánicos
Persistentes en Colombia*

Martha Liliana Gómez G.

Lizbeth Janet Vivas A.

Rubén Alberto Ruiz R.

Viviana Rocío Reyes D.

Claudia Alexandra Hurtado



Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras
José Benito Vives De Andrés
Vinculado al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras "José Benito Vives de Andréis" - INVEMAR
Cerro Punta de Betín, Santa Marta, Colombia - Apartado Aéreo 1016 - www.invemar.org.co
Teléfonos: (+57)(+5) 421 4413/421 4774 Ext. 114, 251 y 138
Telefax: (+57)(+5) 431 2975

Esta publicación fue posible gracias al apoyo financiero del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" - COLCIENCIAS y del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR

© Todos los derechos reservados conforme a la Ley, ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, almacenada en sistema recuperable o transmitida en ninguna forma o por ningún medio electrónico, mecánico, fotocopia, grabación u otros, sin el previo consentimiento escrito de INVEMAR

Los conceptos expresados en éste documento son responsabilidad exclusiva de los autores y no necesariamente corresponden con los de INVEMAR

Contribución del INVEMAR No. 903

Coordinación Editorial:

Martha Lucia Ruiz Arango

Autores:

Marta Liliana Gómez García, Lizbeth Janet Vivas Aguas, Rubén Alberto Ruiz R., Viviana Rocío Reyes D. y Claudia Alexandra Hurtado

Diseño de carátula:

Lizbeth Janet Vivas Aguas y Edgar José Barros Pinedo

Fotografías de carátula:

Viviana Rocío Reyes D. y Lizbeth Janet Vivas Aguas

Ilustraciones:

Lizbeth Janet Vivas Aguas, Rubén Alberto Ruiz R., Viviana Rocío Reyes D.

Mapas:

Lizbeth Janet Vivas Aguas

ISBN: 958-97349-6-0

Esta obra deberá ser citada de la siguiente manera:

Gómez, M., Vivas, L., Ruiz, R., Reyes, V. y Hurtado, C. 2006. Bacterias marinas nativas degradadoras de compuestos orgánicos persistentes en Colombia. Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR - Santa Marta. 32 p. (Serie de publicaciones generales No. 19)

Palabras clave:

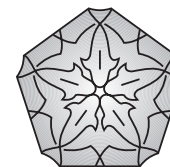
Biodegradación, biorremediación, bacterias marinas, compuestos orgánicos persistentes

Diagramación y montaje:

John Aref Khatib P.

Impresión:

Grey Ltda.



invemar

Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras
"José Benito Vives De Andréis" INVEMAR
Vinculado al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

Director General

Capitán de Navío Francisco A. Arias Isaza

Subdirector Coordinación de Investigaciones (SCI)

Jesús Antonio Garay Tinoco

Subdirector de Recursos y Apoyo a la Investigación (SRAI)

Carlos Augusto Pinilla González

**Coordinador Programa Biodiversidad
y Ecosistemas Marinos (BEM)**

Jaime Garzón Ferreira

**Coordinador Programa Valoración y
Aprovechamiento de Recursos Marinos (VAR)**

Roberto Federico Newmark U.

Coordinador Programa Calidad Ambiental Marina (CAM)

Bienvenido Marín Zambrana

**Coordinadora Programa de Investigación
para la Gestión en Zonas Costeras (GEZ)**

Paula Cristina Sierra Correa

Coordinadora Programa de Geociencias Marinas (GEO)

Georgina Guzmán Ospitia

Coordinador Programa de Servicios Científicos

Oscar David Solano

Coordinadora Oficina de Divulgación y Documentación (DID)

Martha Lucia Ruiz Arango

Santa Marta - 2006

www.invemar.org.co

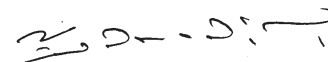
Las bacterias son organismos que pueden vivir en diferentes ambientes y consumir una gran variedad de compuestos, siendo una de sus características llamativas que toleran y usan ciertos contaminantes como fuente de energía, lo cual posibilita la remediación de ecosistemas afectados por actividades humanas o naturales. En este sentido es importante la posibilidad de llevar a cabo el saneamiento, por acción bacteriana a gran escala, de áreas contaminadas con compuestos orgánicos persistentes (COP) tales como hidrocarburos de petróleo y plaguicidas en suelos y en aguas, desarrollando una acción conocida como Biorremediación, la cual consiste en propiciar procesos biológicos bacterianos que permitan transformar los COP en sustancias no contaminantes y remover así tales compuestos con un alto porcentaje de efectividad.

Debido al desarrollo que Colombia ha experimentado en los últimos años, se ha visto un incremento de la concentración de COP especialmente en las zonas costeras y marinas. El Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras “José Benito Vives de Andrés” INVEMAR, conciente de tal situación y de la importancia que juegan las bacterias en los ecosistemas marinos, se ha encargado de aislar e identificar especies bacterianas marinas y estuarinas nativas con capacidad degradadora de COP para conformar la primera colección de microorganismos de este tipo, a través del proyecto “*Selección y aplicación de bacterias marinas con capacidad degradadora de compuestos orgánicos persistentes (COP) en el Pacífico y Caribe colombiano*”, desarrollado gracias al

apoyo financiero de COLCIENCIAS y la cooperación con la Universidad de los Andes y los Institutos de Oceanología (IDO) y Bioproductos marinos (CEBIMAR) de Cuba, además de la colaboración de las Corporaciones Autónomas Regionales Costeras CARSUCRE, CVS, CRC y CORPONARIÑO.

Este documento menciona de manera concisa algunas de las técnicas de biorremediación con las que se puede lograr la biodegradación de un contaminante, describiendo brevemente las características de las bacterias, su morfología y técnicas de aislamiento e identificación, explicando el impacto de los hidrocarburos y plaguicidas sobre el mar y presentando un panorama de la biorremediación en Colombia.

El INVEMAR tiene por misión llevar a cabo la investigación básica y aplicada de los recursos naturales renovables y del medio ambiente en los litorales y ecosistemas marinos de Colombia, esta cartilla divulgativa de *Bacterias marinas* desea dar a conocer la importancia de nuestro trabajo en este campo del conocimiento científico, con el fin de fomentar y crear conciencia de la importancia de la investigación en la solución de los problemas ambientales que nos aquejan.



FRANCISCO A. ARIAS ISAZA
Director General

CONTENIDO

Introducción	5
Antecedentes	6
1. Aspectos generales.....	8
1.1. ¿Qué es una bacteria?	8
1.1.1. Características de las bacterias.....	9
1.2. ¿Qué es la biorremediación?.....	11
1.2.1. Bioestimulación.....	12
1.2.2. Bioaumentación	13
1.2.3. Atenuación natural (Biorremediación intrínseca).....	13
1.2.4. Landfarming.....	14
1.2.5. Biosparging.....	14
1.2.6. Bioventing	14
1.2.7. Compostage.....	15
2. Compuestos organicos persistentes.....	17
2.1. Petróleo y sus derivados	17
2.1.1. Composición.....	17
2.1.2. Impacto de los hidrocarburos de petróleo en el mar.....	17
2.2. Plaguicidas	18
2.2.1. Composición.....	18
2.2.2. Impacto de los plaguicidas en el mar.....	19
2.3. Compuestos orgánicos persistentes en Colombia	19
2.3.1. Petróleo y sus derivados	19
2.3.2. Plaguicidas.....	20
3. Panorama de la biorremediación en Colombia	21
3.1. Bacterias marinas nativas con potencial para la biorremediación en Colombia.....	22
3.1.1. Metodología de aislamiento, recuento y conservación	22
3.1.2. Bacterias obtenidas en el proyecto	26
Referencias bibliográficas.....	31

AGRADECIMIENTOS

La realización del proyecto “Selección y aplicación de bacterias marinas con capacidad degradadora de compuestos orgánicos persistentes (COP) en el Pacífico y Caribe colombiano”, así como la presente publicación fueron financiados por COLCIENCIAS y el INVEMAR. Queremos agradecer por su apoyo a las siguientes personas e instituciones que hicieron valiosos aportes en la elaboración de este documento:

INVEMAR

Bienvenido Marín
Luisa Fernanda Espinosa
Julián Betancourt
Juan Pablo Parra
Jorge Acosta
Jesús Garay
José Sanchez
Andrés Caiaffa
Leonardo Arias
Julio Bohorquez
Robinson Casanova

CORPONARIÑO

Marcela Caviedes

CEBIMAR

Roberto Rafael Núñez
Eudalis Ortiz

CVS

Jaime García Exbrayac

CRC

Luz Marina Prieto

Estudiantes

Gridis Cortéz
Silvia Narváez
Ana María Perdomo

Universidad de los Andes

Jenny Dussán
Martha Vives
Lucía Lozano

CARSUCRE

Tulio R. Ruiz
Orlando de la Ossa Nadjar

Colombia, siendo el único país de Sudamérica que cuenta con costas en los dos océanos, se ve enfrentado a la problemática de contaminación por plaguicidas e hidrocarburos en sus mares y costas; las principales fuentes que dan lugar a este fenómeno son los productos asociados con las actividades agrícolas, industriales, marítimas y con los procesos de explotación, transporte y manejo del petróleo.

El problema de la contaminación ambiental continúa incrementándose por la descarga permanente de contaminantes que, debido a su toxicidad y persistencia afectan directamente los ambientes vulnerables, como son estuarios, zonas costeras, humedales, entre otros. En la costa Caribe las zonas más afectadas por compuestos orgánicos persistentes (COP) tales como hidrocarburos y plaguicidas organoclorados son los principales centros urbanos como Santa Marta, Barranquilla, Cartagena, los Golfos de Morrosquillo y Urabá; mientras que en el océano Pacífico, las áreas más impactadas se encuentran en los puertos de Tumaco y Buenaventura, así mismo, los ríos que bañan el departamento de Nariño.

Actualmente, para reducir la concentración de este tipo de contaminantes en los diferentes ecosistemas se emplean técnicas de biorremediación, en las que a partir de procesos biológicos ciertas sustancias o compuestos son transformados en otros, siendo las bacterias las principales causantes de tal conversión. La biorremediación compite con tecnologías alternas para garantizar la limpieza ambiental, es una de las opciones menos costosas, además

representa una solución permanente a la problemática de la contaminación porque el contaminante es completamente destruido o “secuestrado”. En el campo de la microbiología ambiental, el uso de bacterias previamente aisladas en lugares contaminados para la biodegradación de un compuesto orgánico persistente donde las poblaciones bacterianas nativas son muy bajas se denomina bioaumentación. Esta técnica de biorremediación se puede usar “fácilmente” siempre y cuando exista una información de soporte, que revele el tipo de especies bacterianas que se pueden emplear.

Bajo este marco de referencia y con el propósito de conocer el potencial biorremediador de los microorganismos nativos que a futuro en Colombia puedan ser usados para descontaminar y recuperar ecosistemas afectados por COP, el Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras -INVEMAR a través de su Programa Calidad Ambiental Marina y con el apoyo de COLCIENCIAS llevó a cabo durante los años 2004 y 2005 el proyecto denominado “Selección y aplicación de bacterias marinas nativas con capacidad degradadora de compuestos orgánicos persistentes (COP) en el Pacífico y Caribe colombiano”. La información recopilada en este proyecto permitirá en parte desarrollar la técnica de bioaumentación, en el momento que una situación lo amerite.

Se entiende por “contaminación del medio marino” la introducción por el hombre, directa o indirectamente, de sustancias o de energía en el medio marino, incluyendo los estuarios. En algunos casos tal contaminación produce efectos nocivos sobre la vida marina, peligro para la salud humana, obstaculización de las actividades marítimas, incluidas la pesca y otros usos del mar, deterioro de la calidad del agua del mar para su utilización y menoscabo de los lugares de esparcimiento (GESAMP, 1980).

Los contaminantes orgánicos persistentes (hidrocarburos, plaguicidas organoclorados) presentes en el suelo y en el medio marino son químicos que por lo general pueden llegar directamente a un ecosistema, como en la aplicación de un plaguicida, o accidentalmente, por los derrames en lagos y ambientes marinos, generando pérdidas económicas y un gigantesco desequilibrio ambiental. Hoy por hoy, es necesario conocer las tendencias y el comportamiento de los niveles de concentración de los contaminantes de mayor incidencia en el medio marino y costero (hidrocarburos, plaguicidas, metales pesados y material orgánico), para poder brindar una solución efectiva que conduzca a la recuperación de los ecosistemas vulnerados.

El desarrollo de la industria petrolera es una fuente de progreso económico, pero a la vez una fuente de deterioro ambiental, debido a que los ecosistemas marinos han sido afectados por las actividades de exploración, explotación, refinación y transporte del crudo y sus derivados; se estima que en promedio cerca de 9 millones de

toneladas de hidrocarburos son descargados anualmente a las aguas marinas y estuarinas del mundo (Head y Swanell, 1999), siendo los derrames de petróleo uno de los factores principales que causan tal contaminación. Estos llaman la atención de la población, en especial de la comunidad científica quienes desarrollan investigaciones referentes al comportamiento, efectos y formas de degradación de este contaminante en ecosistemas acuáticos (Islam y Tanaka, 2004).

En nuestro país, la problemática de los residuos de hidrocarburos del petróleo en las zonas costeras tiene su origen en actividades portuarias y marítimas; y en la exploración, explotación, transporte, refinación, usos del petróleo y sus derivados. Tanto en el Caribe como en el Pacífico colombiano, existen problemas locales por derrames crónicos en los puertos, las refinерías de petróleo y por los buques de cabotaje, o accidentales por los buques de tráfico internacional (Garay, 1992). Históricamente en la zona costera del Atlántico, Bolívar y Magdalena se han encontrado valores de 10ug/l de HDD superando la concentración máxima permisible de 4ug/l (GESAMP, 1980).

En el Pacífico, las zonas costeras mas impactadas por estos compuestos corresponden a la de los municipios de Buenaventura y Tumaco; coinciden en que son los dos lugares de desarrollo de la región y los centros poblados más grandes sobre la llanura pacífica. Pequeñas poblaciones como Guapi, Bahía Solano y Ladrilleros, y el sur de Cauca presentan un impacto medio en este aspecto, mientras que las comunidades ubicadas en el norte de Cauca y Chocó; y el sur de Valle permanecen relativamente limpias (Garay, 1994).

Por otra parte, a escala mundial se emplean más de medio centenar de plaguicidas orgánicos en quince mil formulaciones distintas, que se clasifican según su estructura química principalmente como organoclorados, organofosforados y carbamatos. De los tres grupos anteriores, los organoclorados son altamente persistentes en los ecosistemas acuáticos por su baja biodegradabilidad y su permanencia en las cadenas alimenticias de los ecosistemas acuáticos.

En el Caribe colombiano las principales fuentes que aportan plaguicidas al medio marino son los cultivos (banano, arroz, pastos, algodón, maíz y los frutales); así como, la manufactura de estos productos en Cartagena y Barranquilla, y los residuos que son transportados por los ríos y escorrentías; tal es el caso del río Magdalena que recorre las principales regiones agrícolas del país y los ríos que cruzan la zona bananera de Urabá y Magdalena.

Diferentes investigaciones en el ámbito internacional y nacional han enfocado sus esfuerzos en la búsqueda de la remoción de los contaminantes orgánicos persistentes, ya sea por factores bióticos o abióticos. Varias estrategias han sido planteadas para contrarrestar el impacto generado por la polución de contaminantes orgánicos persistentes, promoviendo el desarrollo de métodos físicos químicos y biológicos; dentro del grupo de métodos biológicos se encuentra la Biorremediación, que hace referencia a todos los procesos biológicos que se pueden usar para minimizar un impacto negativo en el ambiente. La biorremediación es actualmente considerada como la alternativa menos costosa para remover los contaminantes a través de la biodegradación, que involucra la acción microbiana capaz de transformar física y químicamente los contaminantes presentes tanto en el agua como en el suelo (Prince, 1996).

En el caso de los hidrocarburos, la degradación de estos compuestos ocurre de forma natural y se ven involucrados procesos de dilución, volatilización, dispersión, oxidación y actividad microbiana (Daane *et al.*, 2001). La habilidad de las poblaciones nativas para degradar los hidrocarburos, constituye uno de los mecanismos principales con el que cuentan determinados ambientes para mitigar el impacto causado por la presencia del petróleo crudo y sus derivados (Márquez *et al.*, 2001), y es el mecanismo primario por el cual son removidos de ciertos ambientes (Leahy y Colwell, 1990; Delille *et al.*, 2002). De igual forma con los plaguicidas organoclorados, se aprovecha la maquinaria enzimática de los microorganismos para convertir de forma aeróbica el aldrín a dieldrín mediante la monooxigenación hasta un epóxido por parte de hongos y bacterias heterótrofas, fosfato solubilizadoras, nitrificantes y denitrificantes (Khan, 1980 y López *et al.*, 2002).

1.1 ¿QUÉ ES UNA BACTERIA?

El término bacteria se emplea para denominar a todos los organismos unicelulares microscópicos, relativamente sencillos que carecen de núcleo y de los orgánulos de las células más complejas como las del ser humano. Sus dimensiones son muy reducidas pues son un millón de veces más pequeñas que un centímetro y por tal razón, para poderlas observar es necesario utilizar un microscopio (Figura 1). Desde el punto de vista ecológico, las bacterias son las principales responsables de mantener el equilibrio entre el material vivo y muerto en suelo y agua, pero también representan un alimento disponible para otros organismos. Un grupo significativo de ellas son responsables de los procesos de fermentación, además de producir determinadas sustancias químicas de gran utilidad en la industria y la medicina, por ejemplo etanol, insulina, antibióticos, etc. (Madigan, 2004).

En suelo o en agua, las bacterias en su crecimiento y metabolismo (el total de todas las reacciones químicas en la célula) interactúan con cada uno de los ciclos de los nutrientes como el carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, hierro y manganeso. El ciclo de los nutrientes es llamado ciclo biogeoquímico, ya que en el ambiente están involucrados procesos químicos y biológicos. Estos nutrientes son transformados por reacciones de oxidación y reducción que pueden cambiar las características físicas y químicas de estos elementos (Tabla 1). Todos los ciclos biogeoquímicos están vinculados, y el metabolismo relacionado con las transformación de esos nutrientes tiene impactos a escala global (Prescott *et al.*, 2002).

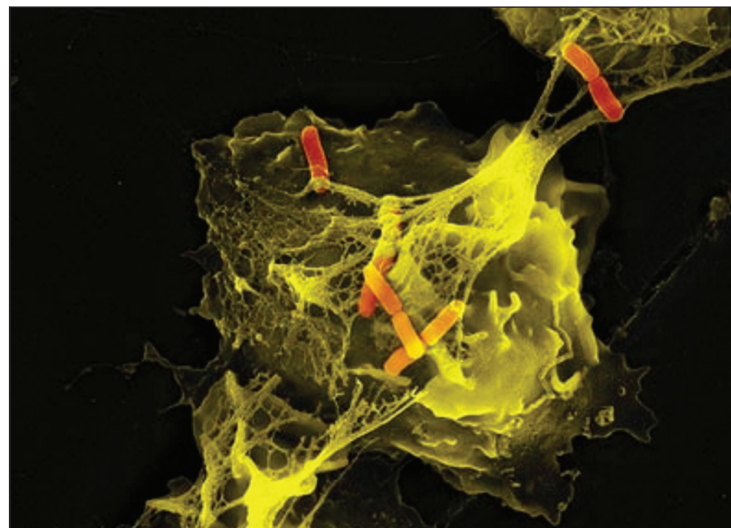


Figura 1. Bacterias de género *Shigella* (color naranja) ampliadas un millón de veces. Imagen obtenida en un microscopio electrónico de barrido. Fuente: Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie. 2005

En los océanos, la materia orgánica e inorgánica es transportada por el flujo o el movimiento del agua y eventualmente se deposita en una capa de partículas sólidas conformando el sedimento marino. Su composición es muy variada y rica, principalmente en carbono orgánico, nitrógeno, azufre y otros elementos como silicio, aluminio, hierro, manganeso, calcio, magnesio, fósforo y bario (Lyle *et al.*, 2002). Esta composición puede diferir dependiendo del tipo de compuestos presentes en el mar, donde pueden llegar los hidrocarburos del petróleo o compuestos xenobióticos (sustancias creadas por el hombre de interés agrícola e industrial y que nunca se forman por vía natural).

Tabla 1. Las mayores formas de carbono, nitrógeno y azufre en los ciclos biogeoquímicos. Fuente: Prescott *et al.*, 2002.

Ciclo	Forma reducida	Estados de oxidación intermedios de los elementos			Forma oxidada
Carbono (C)	CH ₄	CO			CO ₂
Nitrógeno (N)	NH ₄	N ₂	N ₂ O	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻
Azufre (S)	H ₂ S, grupos SH en la materia orgánica	S ⁰	S ₂ O ₃	SO ₃ ²⁻	SO ₄ ²⁻

En estos sedimentos, la mayoría de las bacterias que comúnmente se desarrollan en un ambiente libre de contaminantes mueren, pero se ven favorecidas aquellas poblaciones que pueden

tolerarlos y usarlos como fuente de carbono para su crecimiento, de esta manera se logra su biodegradación por acción microbiana (Tabla 2).

Tabla 2. Algunos géneros bacterianos que tienen especies conocidas como degradadoras de hidrocarburos. Fuente: Prince, 2002.

GÉNEROS						
<i>Achromobacter</i>	<i>Anabaena</i>	<i>Brevibacterium</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Phormidium</i>	<i>Stenotrophomonas</i>
<i>Acidovorax</i>	<i>Aphanocapsa</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Microcoleus</i>	<i>Proteus</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Clavibacter</i>	<i>Escherichia</i>	<i>Moraxella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Thermoleophilum</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Aureobacterium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Vibrio</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Comamonas</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Xanthobacter</i>
<i>Agmenellum</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Crynebacterium</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Nostoc</i>	<i>Serratia</i>	<i>Xanthomonas</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Curtobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Oscillatoria</i>	<i>Spherotilus</i>	
<i>Alcaligenes</i>	<i>Beijerinckia</i>	<i>Cycloclasticus</i>	<i>Leucothrix</i>	<i>Pasteurella</i>	<i>Sphingomonas</i>	
<i>Alteromonas</i>	<i>Beneckea</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Marinobacter</i>	<i>Peptococcus</i>	<i>Spirillum</i>	

1.1.1 Características de las Bacterias

Hay que tener en cuenta que las bacterias exhiben ciertas características que hacen posible su identificación. Para los microbiólogos, éstas son necesarias para describir las especies bacterianas ya que pueden presentar diversas formas, colores, tamaños u otros caracteres que las pueden distinguir unas de otras; esas diferencias entre las bacterias equivalen a criterios taxonómicos, fundamentales para su clasificación, el desarrollo de la genética y otras

disciplinas relacionadas. Una bacteria, a escala microscópica generalmente se puede diferenciar por tener forma de coco, bacilo o espiral (Figura 2b), que se determina básicamente por la tinción de Gram, técnica empleada para diferenciarlas por la composición de su pared celular.

A escala macroscópica, cuando las bacterias crecen sobre un medio sólido, su crecimiento se evidencia por la formación de “colonias” que se caracterizan por tener formas que las hacen distinguibles unas de

otras, estas pueden ser redondeadas filamentosas, arrugadas o rizoides (Figura 2a); los bordes y la elevación de las colonias pueden diferir

también, desarrollándose bordes ondulados, o irregulares, entre otros (Figura 3a), y su elevación puede ser plana, abultada, etc. (Figura 3b).

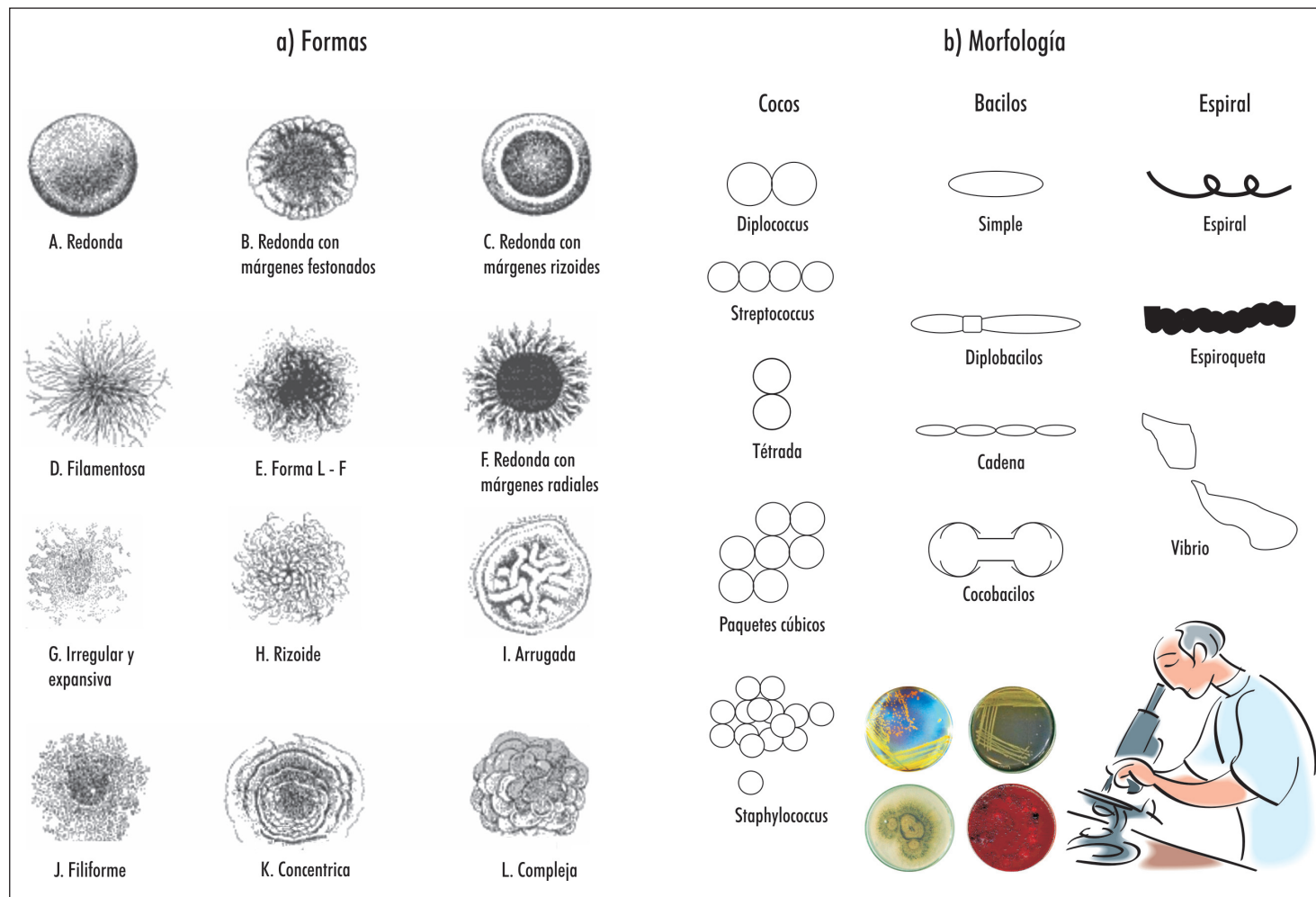


Figura 2. a) Formas típicas de las colonias. b) Morfología de las bacterias.

Los microbiólogos tienen en cuenta estas características que sirven de base para desarrollar trabajos de investigación mucho más complejos sobre los posibles usos de las bacterias en diferentes campos, por ejemplo, en el tratamiento de aguas residuales para remover una gran variedad de compuestos, en ingeniería genética

para mejorar las habilidades metabólicas de una bacteria en busca del beneficio humano o del medio ambiente, o para el desarrollo de proyectos de biorremediación que permitan eliminar la presencia de los contaminantes en el ambiente, etc.

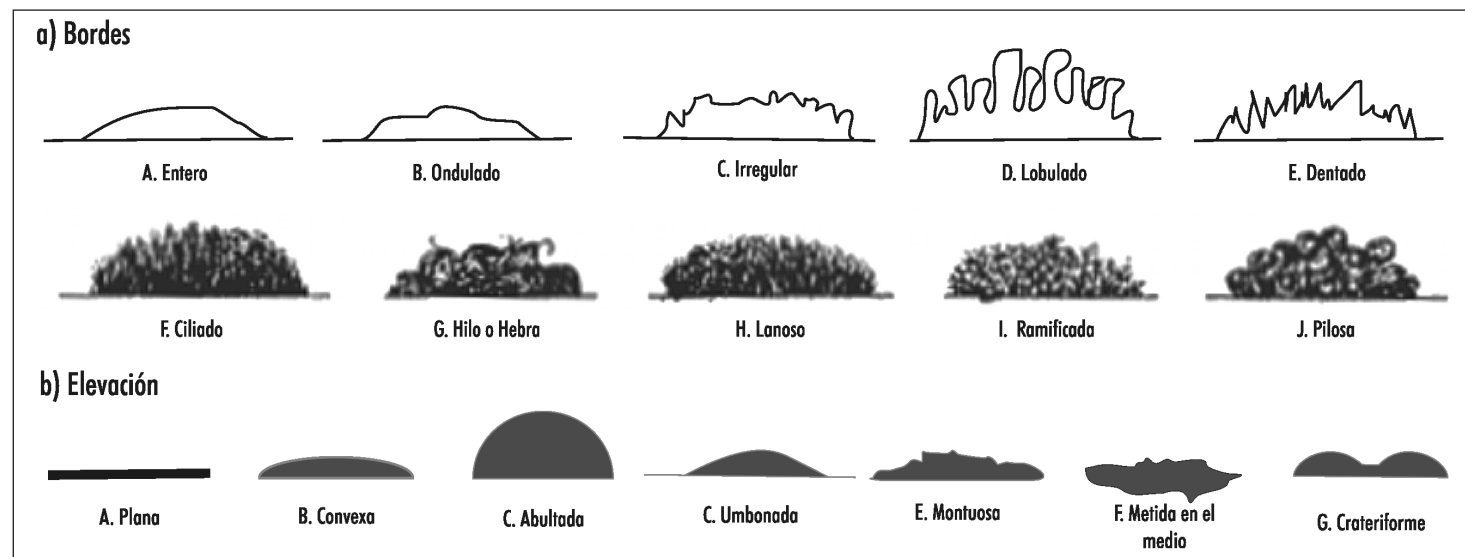


Figura 3. a) Bordes típicos de las colonias. b) Tipos de elevación característica de las colonias.

1.2 ¿QUÉ ES LA BIORREMEDIACIÓN?

La biorremediación hace referencia a todos los procesos biológicos que se pueden usar para minimizar un impacto negativo en el ambiente; usualmente, es la remoción de un contaminante presente en el suelo, el agua o el aire. Algunos microorganismos, especialmente ciertas bacterias tienen la habilidad de convertir las moléculas de un contaminante orgánico en dióxido de carbono, agua

e iones inorgánicos necesarios para los ciclos biogeoquímicos, como también oxidar o reducir los agentes inorgánicos que contaminan un ambiente, esto permite que se regeneren los ecosistemas que han sido afectados por el vertimiento de sustancias orgánicas como el petróleo y sus derivados (hidrocarburos), plaguicidas (compuestos alifáticos y aromáticos halogenados); sustancias inorgánicas (compuestos nitrogenados), y también algunos contaminantes metálicos (Figura 4) (Prince, 2002; En: Bitton, 2002).



Figura 4. Derrame de petróleo en Alaska en 1981 por el buque Exxon Valdez. Fuente: Kvenvolden, 2004.

Para que las bacterias puedan remover los contaminantes a gran escala existen diferentes técnicas de biorremediación, a continuación se mencionan algunas de ellas:

1.2.1 Bioestimulación

Esta técnica se caracteriza por optimizar las condiciones para el crecimiento de los microorganismos nativos de la región afectada por el contaminante con el fin de lograr su degradación. Puede darse por medio de fertilizantes orgánicos o inorgánicos y ha demostrado ser una estrategia efectiva especialmente en lugares donde la cantidad de nutrientes es escasa para el crecimiento de los microorganismos (Figura 5), con esta técnica se aumenta de tres a cinco veces la tasa de degradación (Narváez, 2005).



Figura 5. Inyector de aire y nutrientes para el tratamiento de suelo contaminado con MTBE (metil-ter-butil-eter). Fuente: Azadpour-Keeley, A. 2002.

1.2.2 Bioaumentación

Se relaciona con la adición de microorganismos en lugares donde las poblaciones degradadoras no están presentes o son muy bajos los niveles encontrados; o también se refiere al inóculo de los microorganismos propios de la región contaminada que se han obtenido abundantemente a través de una fermentación. El cultivo de las bacterias degradadoras es adicionado sobre la zona afectada por el contaminante, ya sea suelo o agua superficial, o puede inyectarse bajo la superficie cerca de los acuíferos cuando se ha presentado una infiltración del contaminante. Para hacer más efectiva la biorremediación puede combinarse la bioaumentación con la bioestimulación inyectando nutrientes para el desarrollo de las bacterias (Figura 6) (Prince, 2002; En: Bitton, 2002).

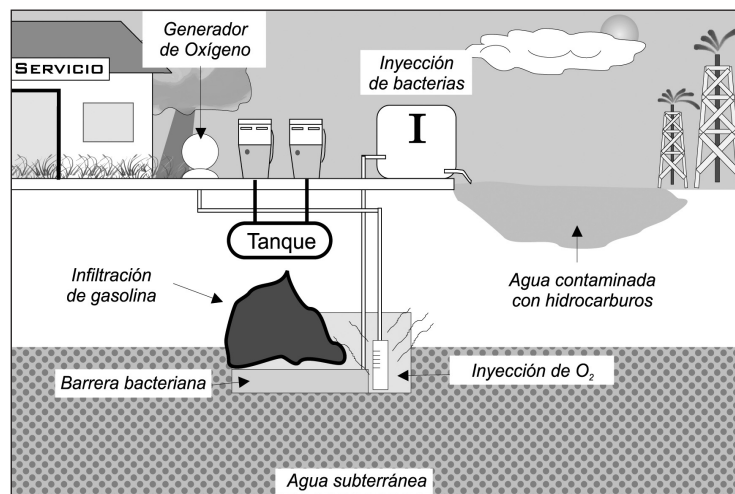


Figura 6. Biorremediación por bioaumentación y bioestimulación de derivados del petróleo. Modificado de: Spinnler y Johnson, 2001

1.2.3 Atenuación natural (Biorremediación intrínseca)

Es un método simple que consiste en monitorear la concentración del contaminante para asegurar que el proceso de degradación está activo y es realizado en forma segura (Kaplan y Kitts, 2004). Su principal característica es el empleo de los procesos físico-químicos de interacción contaminante-ambiente y los procesos de biodegradación que tienen lugar de forma natural en el medio, conocidos de forma conjunta como procesos de biotransformación (Figura 7). Entre estos procesos se encuentran los efectos de dilución, dispersión, volatilización, adsorción y biodegradación (Narváez, 2005).

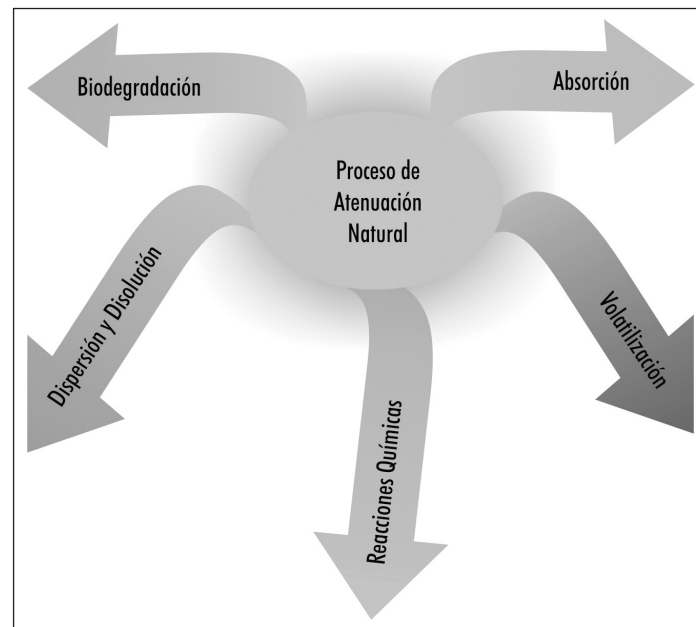


Figura 7. Procesos de biotransformación. Fuente: Environmental Protección Agency, 1999

1.2.4 Landfarming

Es una tecnología de biorremediación para los suelos que reduce la concentración de un contaminante (especialmente el petróleo) a través de la biodegradación. Esta tecnología usualmente involucra el esparcimiento de una delgada capa de suelo contaminado sobre un terreno en óptimas condiciones (Figura 8). Con ello se estimula la actividad microbiana en el suelo afectado a través de la aireación y/o la adición de minerales, nutrientes y humedad. La actividad microbiana aumenta y conlleva a la degradación del contaminante, debido a la respiración de los microorganismos (EPA, 1994).

1.2.5 Biosparging

Es el uso de los microorganismos nativos de una región para biodegradar los constituyentes orgánicos en la zona vadosa, que es definida como la zona de suelo comprendida entre la superficie del terreno y la tabla de agua (Figura 9). En el biosparging, el aire y los nutrientes se inyectan en la zona vadosa para incrementar la actividad biológica de dichos microorganismos con el fin de reducir las concentraciones de los constituyentes del petróleo que podrían posteriormente disolverse en el agua subterránea (EPA, 1994).

1.2.6 Bioventing

Al igual que el Biosparging, se usan microorganismos nativos de la región para biodegradar los compuestos orgánicos presentes en la zona vadosa. En este caso, la actividad de la población microbiana es estimulada por el flujo del aire generado por un equipo de extracción al vacío (Figura 10), el cual permite también obtener la fracción volátil del contaminante (EPA 1994).



Figura 8. Adecuación de terreno para el esparcimiento de suelo contaminado. Fuente: Environmental field services Inc. 2004

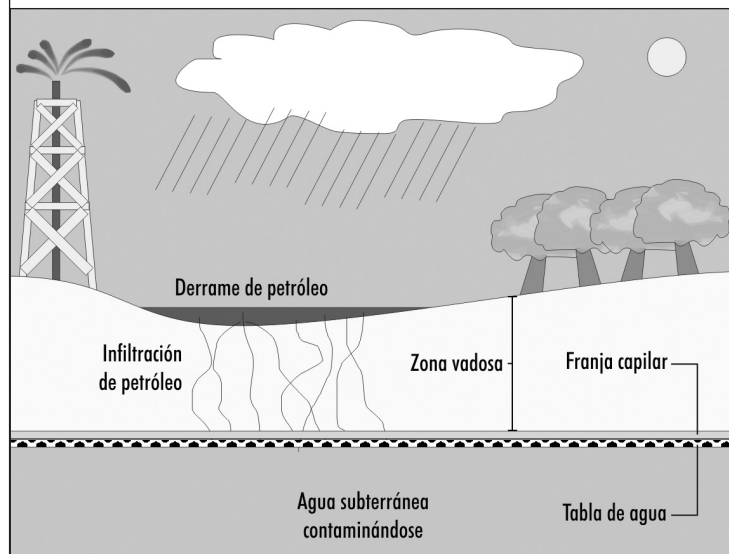


Figura 9. Contaminación de agua subterránea por infiltración de petróleo. Modificado de: Idaho museum natural history, 2002.



Figura 10. Equipo de extracción al vacío para realizar Bioventing (Fuente: Applied Hydrology Associates Inc, 2004)

1.2.7 Compostaje

Es definido como la descomposición de la materia orgánica por una mezcla de poblaciones microbianas bajo condiciones controladas (aire y temperatura). El compostaje es una forma de estabilización de los desechos que requiere condiciones especiales, particularmente de humedad y aireación, para producir temperaturas mayores a 50°C favorables para el crecimiento de microorganismos termofílicos (Figura 11A y 11B). El producto sano y estable obtenido del compostaje se denomina compost que tiene muchas aplicaciones (Figura 11C), entre ellas la remediación y restauración de suelos contaminados (Dosoretz *et al.*, 2002).



Figura 11. a y b) Desechos sólidos usados para realizar compostaje. Fuente: Buckinghamshire County Council, 2005. c) Compost. Fuente: The Victory Garden, 2005.

Dentro de la gran variedad de contaminantes que afectan los suelos y las aguas en los diferentes ambientes tienen gran importancia el petróleo y los plaguicidas, clasificados como compuestos orgánicos persistentes (COP) por su prolongado tiempo de permanencia en la naturaleza, influyendo principalmente de manera negativa sobre gran parte de los organismos de los ecosistemas.

2.1 PETRÓLEO Y SUS DERIVADOS

2.1.1 Composición

El petróleo se compone de hidrocarburos, compuestos orgánicos que en términos de cantidad, representan uno de los contaminantes más significativos de los ecosistemas marinos, calculándose que en promedio millones de toneladas impactan anualmente las aguas marinas y estuarinas del mundo (Head y Swanell, 1999). En el petróleo, los hidrocarburos pueden ser parafinas (alcanos lineales), isoparafinas (parafinas ramificadas) y naftenos (alcanos cíclicos); también hay cantidades significativas de hidrocarburos aromáticos y presencia de átomos de oxígeno, nitrógeno y sulfuro conformando moléculas polares (Prince, 2002; En: Bitton, 2002). En la Figura 12 se observan estructuras típicas de algunas moléculas que componen el petróleo.

En la Figura 13 se observa la secuencia de reacciones que tienen lugar en el proceso de degradación de los hidrocarburos del petróleo por acción de una bacteria (*Pseudomonas oleovorans*) como agente degradador del hexadecano.

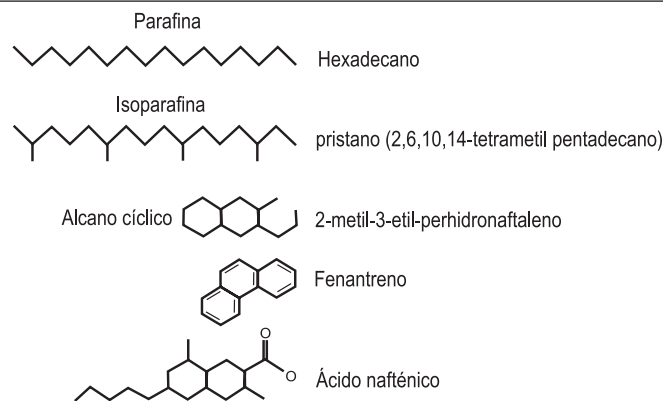


Figura 12. Estructuras químicas de algunos de los hidrocarburos que conforman el petróleo. Tomado de: Prince, 2002. En: Bitton, 2002.

2.1.2 Impacto de los hidrocarburos de petróleo en el mar

Los diferentes componentes del petróleo y sus derivados presentan diversos grados de toxicidad en el medio marino; así las parafinas a niveles muy bajos producen anestesia y narcosis en los organismos, mientras que a altas concentraciones causan daño celular y muerte; por su parte, los naftenos pueden alterar la conducta relacionada con la búsqueda de alimento, escape de depredadores y atracción sexual. En las zonas costeras cercanas a lugares donde se realizan actividades relacionadas con la movilización del petróleo se pueden ver afectadas las tasas de fotosíntesis y respiración (Jacobson & Boylan 1973; Pullich *et al.*, 1974). A muy bajas concentraciones la división celular y el crecimiento planctónico también se ven afectados,

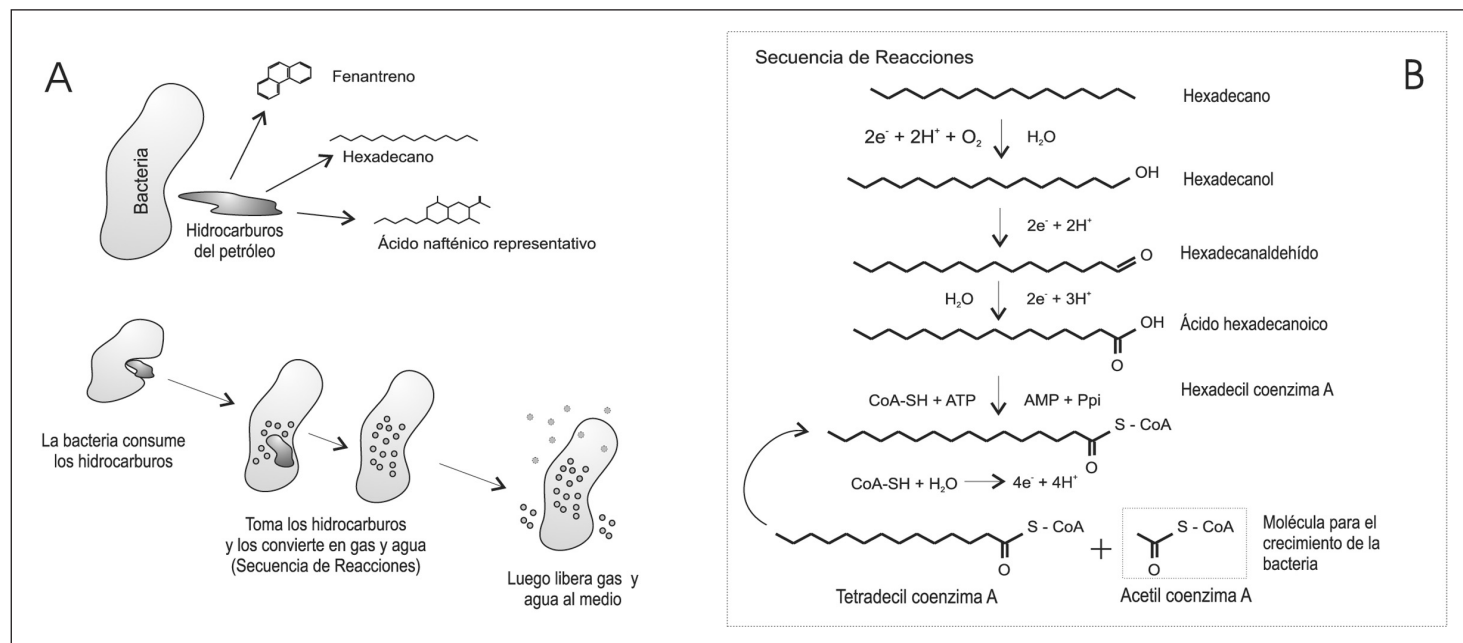


Figura 13. A. Diagrama de la biodegradación de hidrocarburos de petróleo. Modificado de: Environmental Protection Agency, 2001. B. Secuencia abreviada de la biodegradación del hexadecano realizada por *Pseudomonas oleovorans*. Fuente: Prince, 2002

incluso pueden provocar la muerte de gran cantidad de larvas de peces (Mironov, 1970).

2.2 PLAGUICIDAS

2.2.1 Composición

Un plaguicida se refiere a una sustancia o mezcla de sustancias destinadas a destruir cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, especies no deseadas de organismos que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra

forma con la producción y comercialización de alimentos y productos agrícolas. Generalmente un plaguicida se considera como un compuesto xenobiótico, sustancia creada por el hombre de interés agrícola e industrial y que nunca se forma por vía natural (Smidt, 2000).

Los plaguicidas se clasifican principalmente en compuestos organoclorados, organofosforados y carbamatos. De los tres grupos, los organoclorados son los más altamente persistentes en los ecosistemas acuáticos por su baja biodegradabilidad y notable amplificación en las cadenas alimenticias de los ecosistemas acuáticos, siendo reconocidos entre los contaminantes más agresivos

para el medio ambiente, debido a su gran capacidad de acumulación en los sedimentos y en los organismos (Narváez, 2005).

Los organoclorados de mayor uso a nivel mundial son el DDT (1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil)etano) (Figura 14), los bifenilos policlorados, los ciclodienos como aldrín, dieldrin y endrin, los isómeros del hexaclorociclohexano como el lindano y los terpenos clorados como el toxafeno y estrobeno (Addison, 1976).

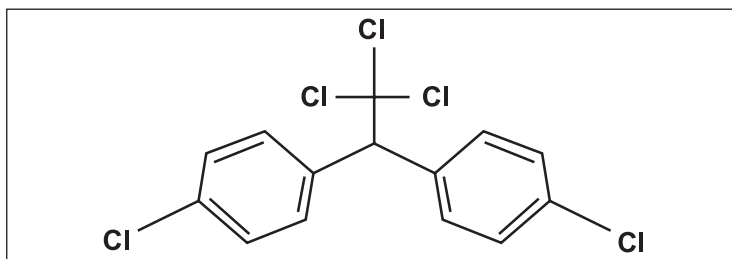


Figura 14. DDT (1,1,1-tricloro-2,2-di(p-clorofenil)etano). Tomado de: Prince, 2002.

2.2.2 Impacto de los Plaguicidas en el Mar

Estos compuestos llaman la atención de la comunidad científica por su persistencia en el ambiente, en la cadena alimenticia del ecosistema acuático y por su continua presencia en alimentos y agua potable (Snedeker, 2001). También, se ha reportado en los últimos años que la exposición a pesticidas organoclorados puede ser el factor responsable de la disminución en conteo de espermatozoides y la capacidad reproductiva masculina (Safe, 2000). Cuando los organismos están expuestos a muy altos niveles de este tipo de compuestos se producen enfermedades endocrinas (Vos *et al.*, 2000). Se sabe que los plaguicidas organoclorados como el dieldrin y el lindano pueden alterar el desarrollo de los mamíferos y los invertebrados marinos,

cuando se exponen a dosis muy elevadas. Aunque es muy difícil encontrar tales concentraciones en áreas contaminadas, diferentes reportes indican que los organismos acuáticos pueden acumular esos compuestos. El envenenamiento con estos pesticidas podría ocurrir también, particularmente en los países en desarrollo de Asia, Sudamérica o África, donde el control es poco y son usados abundantemente (Picard *et al.*, 2003).

2.3 COMPUESTOS ORGÁNICOS PERSISTENTES EN COLOMBIA

El Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras -INVEMAR a través de su Programa Calidad Ambiental Marina y con el apoyo de COLCIENCIAS llevó a cabo durante los años 2004 y 2005 el proyecto denominado “*Selección y aplicación de bacterias marinas nativas con capacidad degradadora de compuestos orgánicos persistentes (COP) en el Pacífico y Caribe colombiano*”. Con la realización de este proyecto fue posible determinar la concentración de este tipo de contaminantes en los sedimentos marinos de las zonas costeras de nuestro país (INVEMAR, 2005).

2.3.1 Petróleo y sus derivados

El impacto de los hidrocarburos en los sedimentos marinos monitoreados tanto del Caribe como del Pacífico colombiano, muestra sectores afectados adversamente por los residuos líquidos industriales vertidos por los muelles petroleros, refinerías o tráfico de cabotaje, por ejemplo, la estación ubicada en el terminal de ECOPETROL en el departamento de Bolívar reportó una concentración de 2161.53 µg/g (Figura 15). El segundo valor en magnitud, fue para la estación ubicada en el Muelle de Cabotaje en el departamento del Magdalena con 82.7 µg/g y en tercer lugar se situó la estación frente a Cispatá con 4.9 µg/g.



Figura 15. Valores de hidrocarburos disueltos y dispersos encontrados en los sedimentos marinos de la zona costera del Caribe y Pacífico colombiano.

La Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA, 1990) califica un valor de $3.9 \mu\text{g/g}$ de hidrocarburos como una concentración alta en sedimentos, donde involucra la suma de 18 compuestos aromáticos policíclicos con alto poder de toxicidad. Tomando como referencia este criterio se puede calificar como sectores con alta contaminación por hidrocarburos las estaciones monitoreadas en el Terminal de ECOPETROL (Bolívar) y Muelle Cabotaje (Magdalena).

2.3.2 Plaguicidas

En Colombia, los resultados revelan que los niveles más altos de



Figura 16. Valores de plaguicidas organoclorados en los sedimentos marinos monitoreados en la zona costera del Caribe y Pacífico colombiano.

plaguicidas organoclorados se obtuvieron de los sedimentos marinos provenientes del Pacífico colombiano, en las estaciones ubicadas en el Muelle Petrolero en el departamento del Valle del Cauca con valores de 12.33 ng/g y en la Boca del Río Tapaje en el departamento de Nariño con concentraciones de 10.89 ng/g . Mientras, en la región del Caribe se reportaron menores concentraciones de plaguicidas organoclorados en relación con el Pacífico, destacándose las estaciones ubicadas en el Terminal de Ecopetrol en el departamento de Bolívar y Muelle de Cabotaje en el departamento del Magdalena, por los mayores niveles de plaguicidas organoclorados totales con rangos entre $3.74 - 3.46 \text{ ng/g}$ respectivamente (Figura 16).

3. PANORAMA DE LA BIORREMEDIACIÓN EN COLOMBIA

Durante los últimos años, en nuestro país se ha visto la biorremediación como solución parcial a los problemas de contaminación generados no sólo por el vertimiento de hidrocarburos del petróleo y plaguicidas, sino también por otros contaminantes tanto en suelo como en agua. Debemos mencionar por ejemplo que en el laboratorio de biotecnología de la empresa colombiana de petróleos ECOPETROL, se adelantan trabajos de investigación de biorremediación para diagnosticar y descontaminar suelos y aguas subterráneas con hidrocarburos, a la vez están desarrollando un producto llamado ECOBIOL-TPH constituido por una combinación de bacterias nativas, no modificadas genéticamente, con capacidad degradadora de compuestos hidrocarbonados para la biorremediación de suelos y residuos contaminados con hidrocarburos (ECOPETROL, 2003).

Algunas universidades como la Pontificia Universidad Javeriana, la Universidad Nacional y la Universidad de los Andes principalmente, han estado vinculadas con proyectos de este tipo, impulsando en algunos casos la técnica de Landfarming para la biorremediación de lodos aceitosos provenientes del fondo de tanques de almacenamiento de petróleo en el campo petrolero Campo-Dina, Huila (Quijano, 2000). También, en la Bahía de Cartagena se ha hecho aislamiento e identificación de bacterias de género *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Pseudomonas* que remueven cantidades importantes de mercurio presente en el agua (Calderón, 1999); además, se ha logrado identificar y evaluar bacterias del género *Serratia* y *Pseudomonas* que degradan el Malathion, un plaguicida altamente perjudicial para el

medio ambiente (Acero y Antolinez, 1999). Incluso, ha sido posible aislar e identificar especies bacterianas con la habilidad de degradar gasolina (Salamanca, 1999), tolueno y xileno (Suárez, 2004).

Un gran avance para el desarrollo de la biorremediación en Colombia lo constituye el proyecto “*Selección y aplicación de bacterias marinas nativas con capacidad degradadora de compuestos orgánicos persistentes (COP) en el Pacífico y Caribe colombiano*”, desarrollado en el INVEMAR, con el cual fue posible conformar la primera colección de bacterias marinas con una gran capacidad degradadora de este tipo de compuestos.



Figura 17. Suelo afectado por un atentado al oleoducto de Caño-Limón Coveñas. Fuente: Vargas et al., 2004.

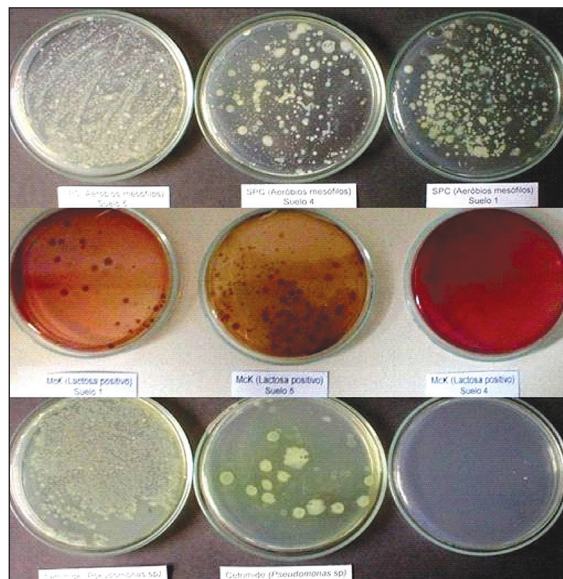


Figura 18. Cultivos puros de bacterias aisladas de una muestra contaminada con petróleo, obtenidas en el Centro de Investigaciones Microbiológicas CIMIC (Universidad de los Andes). Fuente: Vargas *et al.*, 2004.



Figura 19. Trabajo de Landfarming. Fuente: Vargas *et al.*, 2004.

3.1 BACTERIAS MARINAS NATIVAS CON POTENCIAL PARA LA BIORREMEDIACION EN COLOMBIA

Teniendo en cuenta la necesidad de contrarrestar la acción de estos tóxicos químicos que afectan algunos sectores costeros del país, con la realización de este proyecto se aisló y caracterizó un grupo de microorganismos asociados a sedimentos marinos en zonas con concentraciones significativas de hidrocarburos y plaguicidas organoclorados. El estudio se desarrolló durante los años 2004 y 2005 con un total de 15 estaciones en los departamentos de Bolívar, Magdalena, Sucre y Córdoba en el Mar Caribe, así mismo, Nariño y Valle del Cauca en el Océano Pacífico (Figura 20).

Con los sedimentos recolectados en estas estaciones se aislaron 145 cepas bacterianas entre Gram negativos y Gram positivos con morfologías bacilares y cocoides. La presencia de estas bacterias en ambientes marinos impactados por contaminantes orgánicos persistentes pone de manifiesto que éstas se han adaptado para tolerar estas sustancias y pueden tener la capacidad de degradarlos.

3.1.1 Metodología de aislamiento, recuento y conservación

Las muestras de sedimentos recolectadas en las diferentes estaciones de muestreo se trasladaron al laboratorio de microbiología del INVEMAR con el fin de aislar bacterias nativas

tolerantes a hidrocarburos con pases sucesivos en medios frescos con ACPM y Crudo (Figura 21). De igual forma se realizaron pases sucesivos en medios frescos con plaguicidas organoclorados (DDT y aldrin) para aislar morfotipos tolerantes a estos compuestos (Figura 22). También, se efectuaron recuentos de morfotipos tolerantes a hidrocarburos (Figura 23) y a plaguicidas organoclorados (Figura 24). Llevar a cabo la técnica de recuentos de

microorganismos es de gran importancia ya que los que se encuentren en mayor número poseen la capacidad de sobrevivir a las presiones selectivas y pueden usar esos contaminantes como fuente de energía y carbono.

Estos morfotipos son de gran interés ambiental por su capacidad de crecer en lugares impactados con contaminantes orgánicos

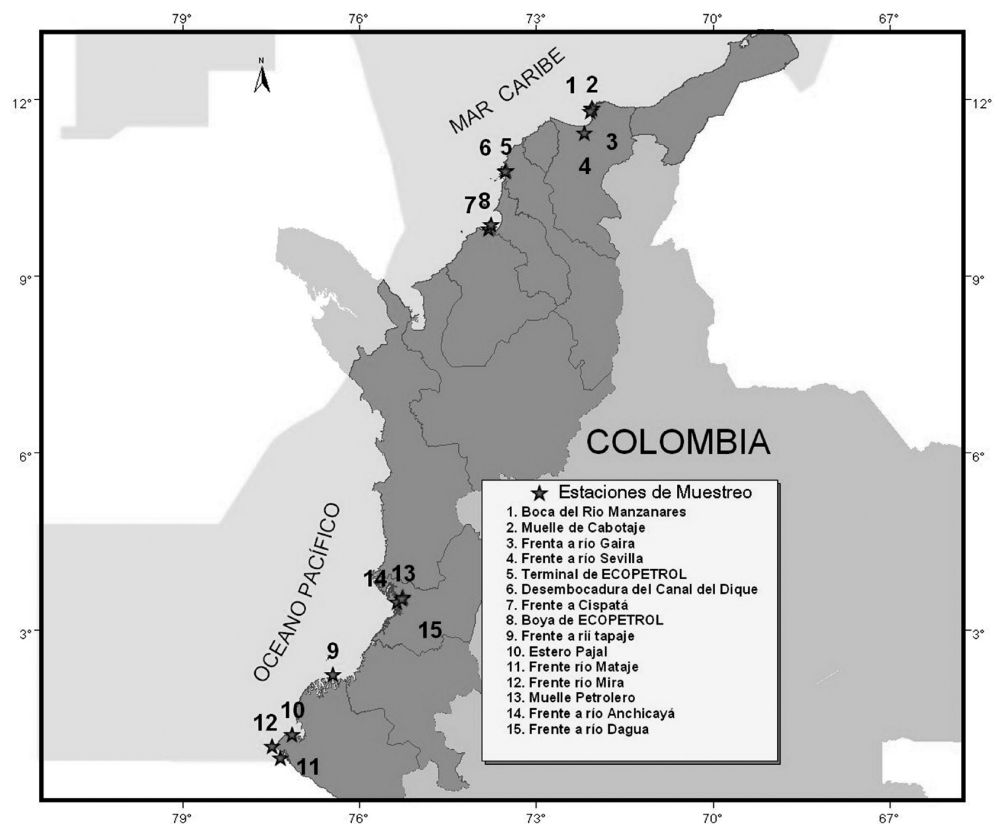


Figura 20. Estaciones donde se recolectaron las muestras de sedimento para el aislamiento de las bacterias nativas de Colombia.

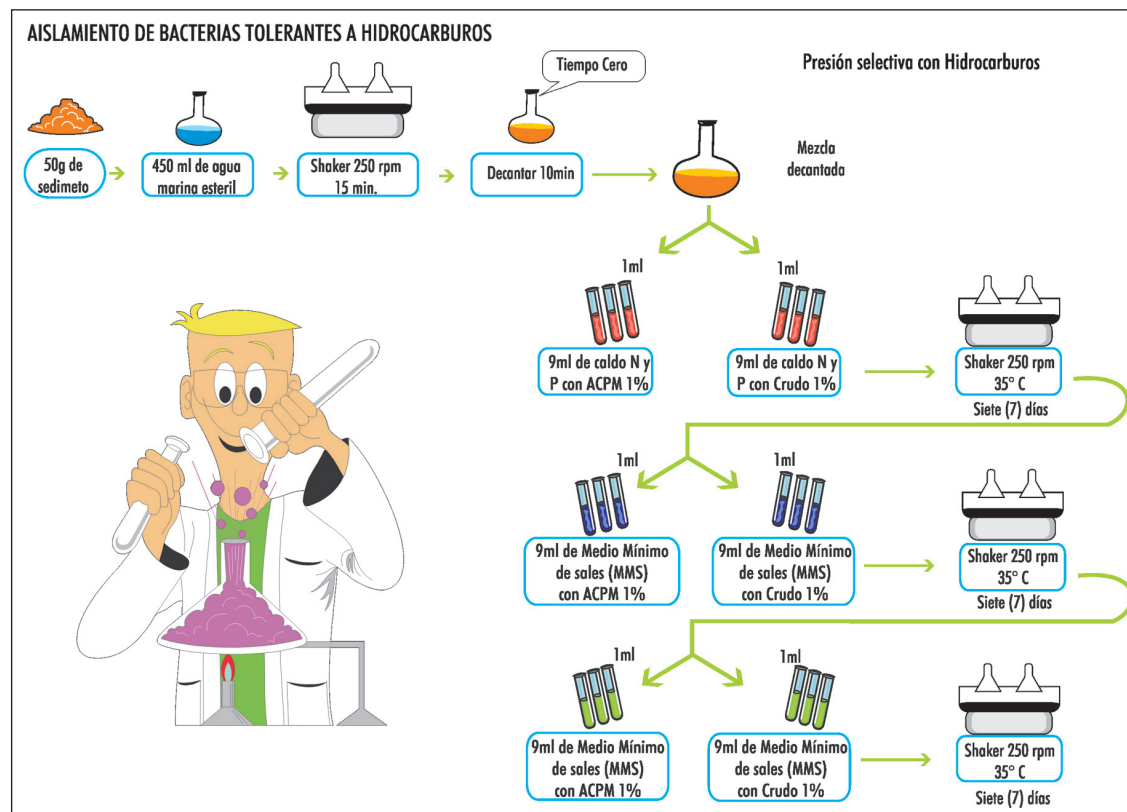


Figura 21. Aislamiento de bacterias tolerantes de hidrocarburos del petróleo

persistentes. Ellos se sometieron a ensayos de degradación, con el fin de conformar consorcios o pool de microorganismos degradadores de hidrocarburos y plaguicidas para ser usados a futuro en el campo de la Biorremediación. Estos microorganismos se deben conservar con técnicas que aseguren el sostenimiento de las cepas, de tal forma que mantengan sus características típicas a largo plazo y se puedan replicar posteriormente.

Por consiguiente, los microorganismos con capacidad de tolerar y degradar COP fueron seleccionados para conformar la *Colección de Bacterias Marinas*, estos fueron previamente caracterizados a nivel macroscópico, microscópico, bioquímico y molecular. Para la conservación de las cepas se escogieron dos técnicas, la primera de ellas fue el *Subcultivo*, usando aceite mineral para prolongar la utilidad de los cultivos de microorganismos (Figura 25a). El aceite

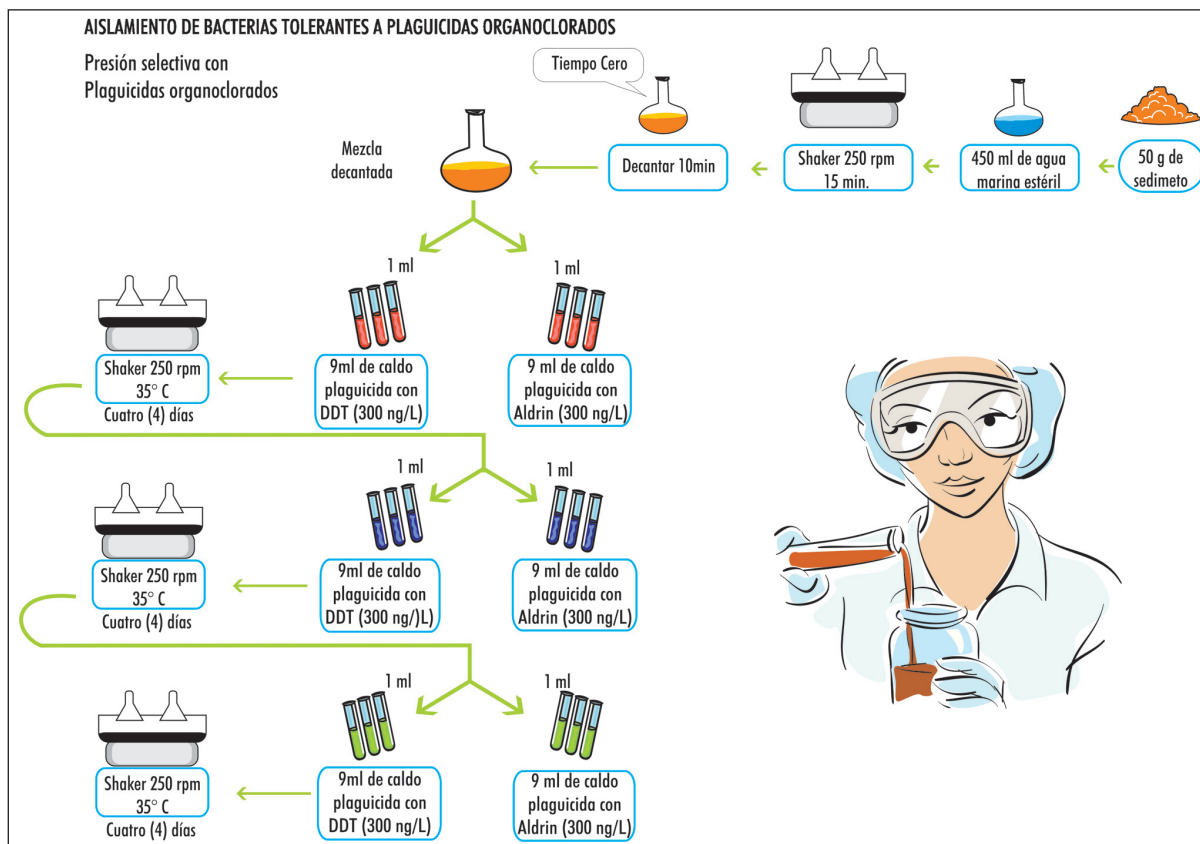


Figura 22. Aislamiento de bacterias tolerantes de plaguicidas organoclorados

mineral sirve para prevenir la evaporación del cultivo y para disminuir la tasa metabólica de las bacterias al limitar el suministro de oxígeno (Buell and Weston, 1947).

El segundo método empleado fue la *Crioconservación*, en el cual los microorganismos se mantienen a -70°C de 1 a 2 años por

congelamiento de los cultivos o suspensiones celulares en pequeños tubitos de plástico denominados crioviales (Figura 25b). Para realizar una adecuada crioconservación se usó un agente protector de las células llamado “crioprotectante”, en este caso fue el glicerol, que evita la formación de cristales al interior de la célula cuando se llega a tan bajas temperaturas (Hwang, 1968).

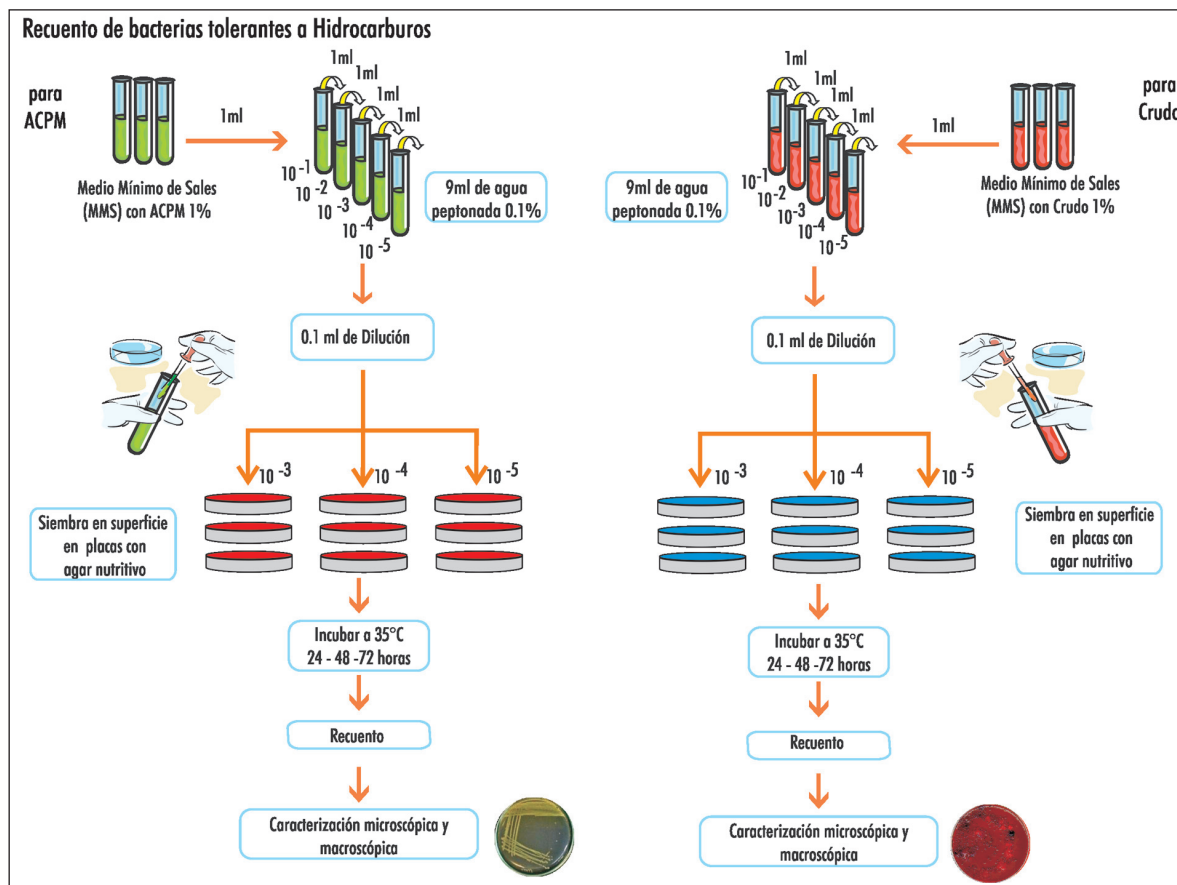


Figura 23. Recuento de bacterias tolerantes de hidrocarburos

3.1.2 Bacterias Obtenidas en el Proyecto

Las bacterias nativas aisladas de los sedimentos marinos del Caribe y Pacífico colombiano se enfrentaron a presiones selectivas en diferentes concentraciones de los contaminantes persistentes

seleccionados en el estudio (ACPM, Crudo, DDT y aldrin), con el fin de escoger bacterias competitivas para conformar cultivos mixtos definir y evaluar su capacidad de degradación en ensayos con hidrocarburos o plaguicidas organoclorados. Con estos procesos de selección se obtuvo un cultivo mixto degradador de Hidrocarburos

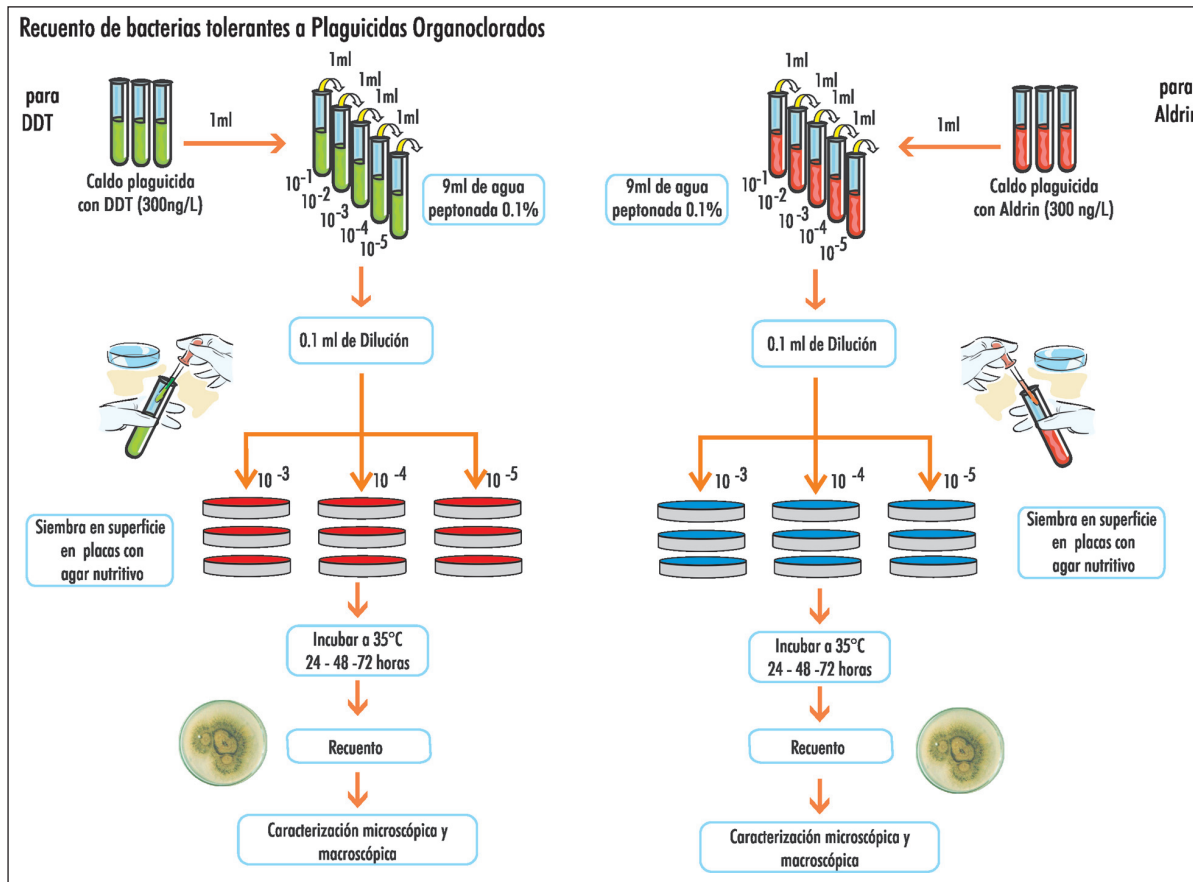


Figura 24. Recuento de Bacterias tolerantes de plaguicidas organoclorados

con las cepas provenientes del Caribe colombiano y otro cultivo con las bacterias provenientes del Pacífico, los cuales estuvieron conformados principalmente por los géneros *Klebsiella* sp., *Pseudomonas* sp., *Flavimonas* sp., *Khuyvera* sp., *Ralstonia* sp., *Achromobacter* sp., *Brevibacillus* sp. y *Bacillus* sp. (Figura 26).

De igual forma, se lograron cultivos mixtos degradadores de plaguicidas organoclorados para ambas regiones constituidos por los géneros bacterianos *Acinetobacter* sp., *Rahnella* sp., *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Brevibacillus* sp. (Figura 27).

Conservación de Cepas Degradadoras de COP

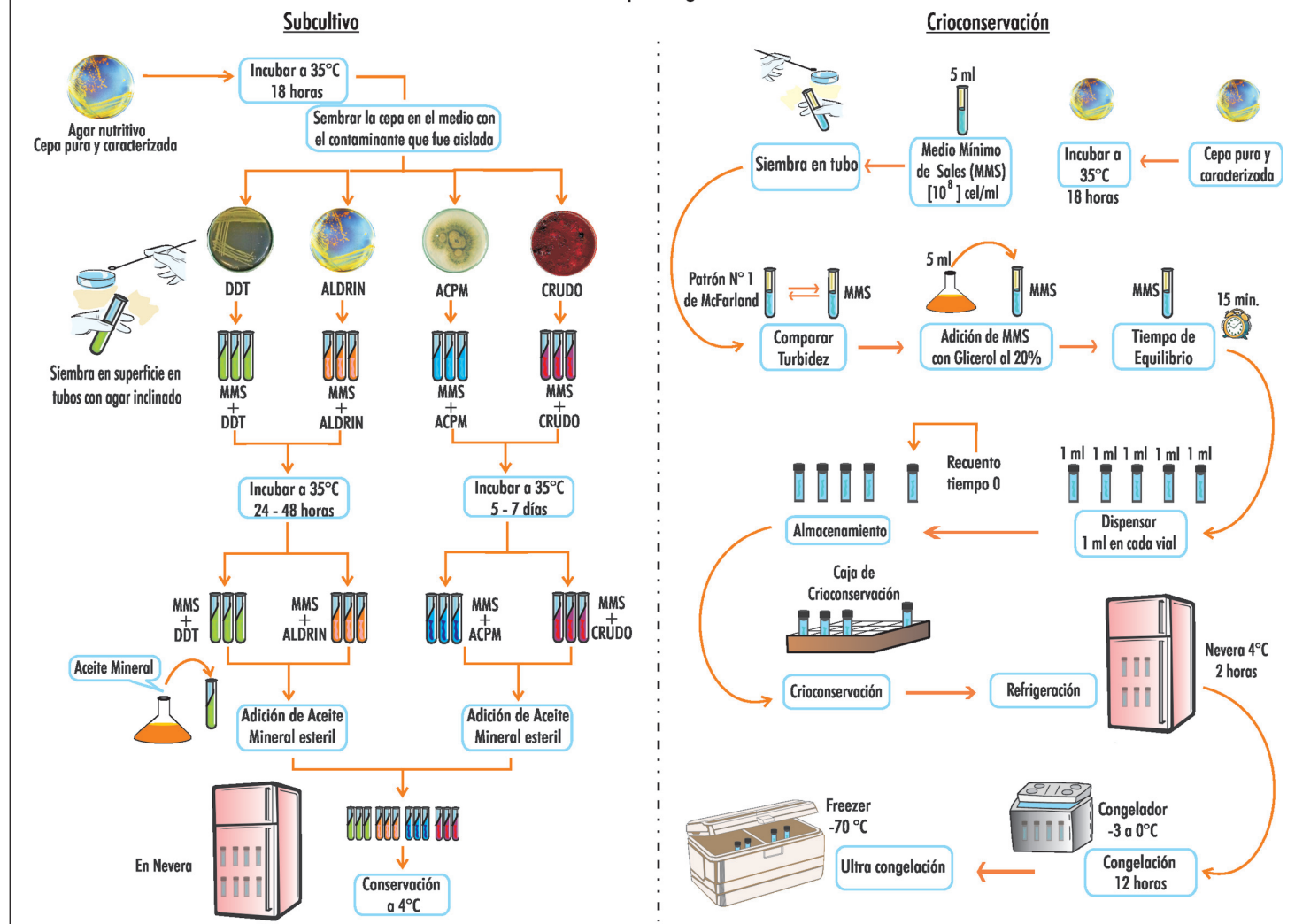
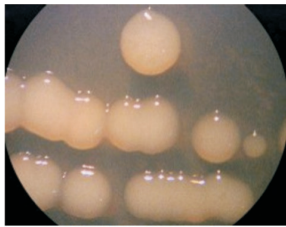
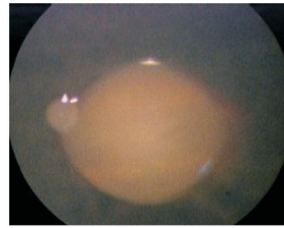
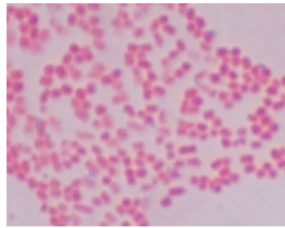


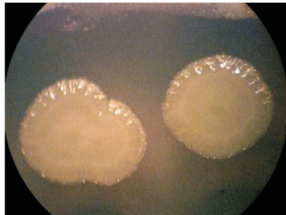
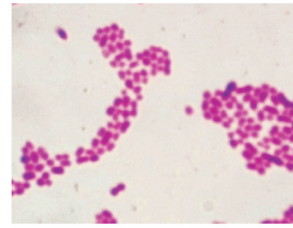
Figura 25. Conservación de cepas de bacterias marinas nativas degradadoras de COP



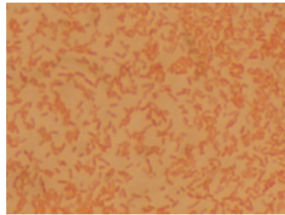
Klebsiella sp



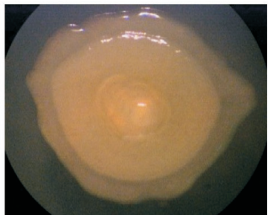
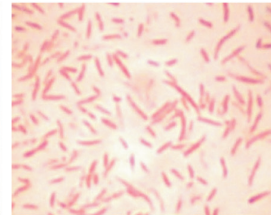
Flavimonas sp.



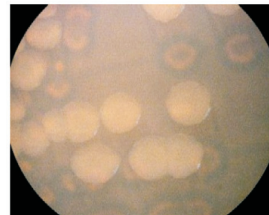
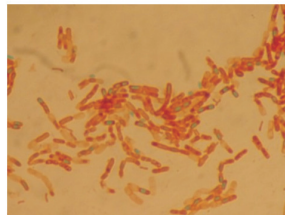
Ralstonia sp



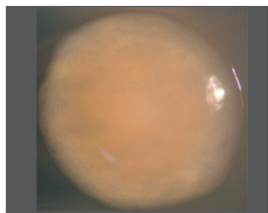
Brevibacillus sp.



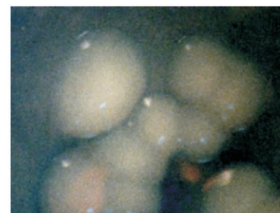
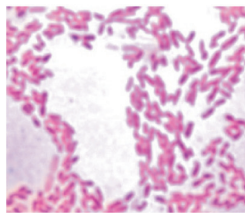
Bacillus sp



Pseudomonas sp.



Kluyvera sp



Achromobacter

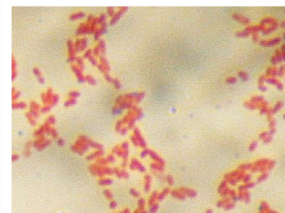


Figura 26. Fotografías macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterianas pertenecientes al cultivo mixto degradador de hidrocarburos del petróleo.

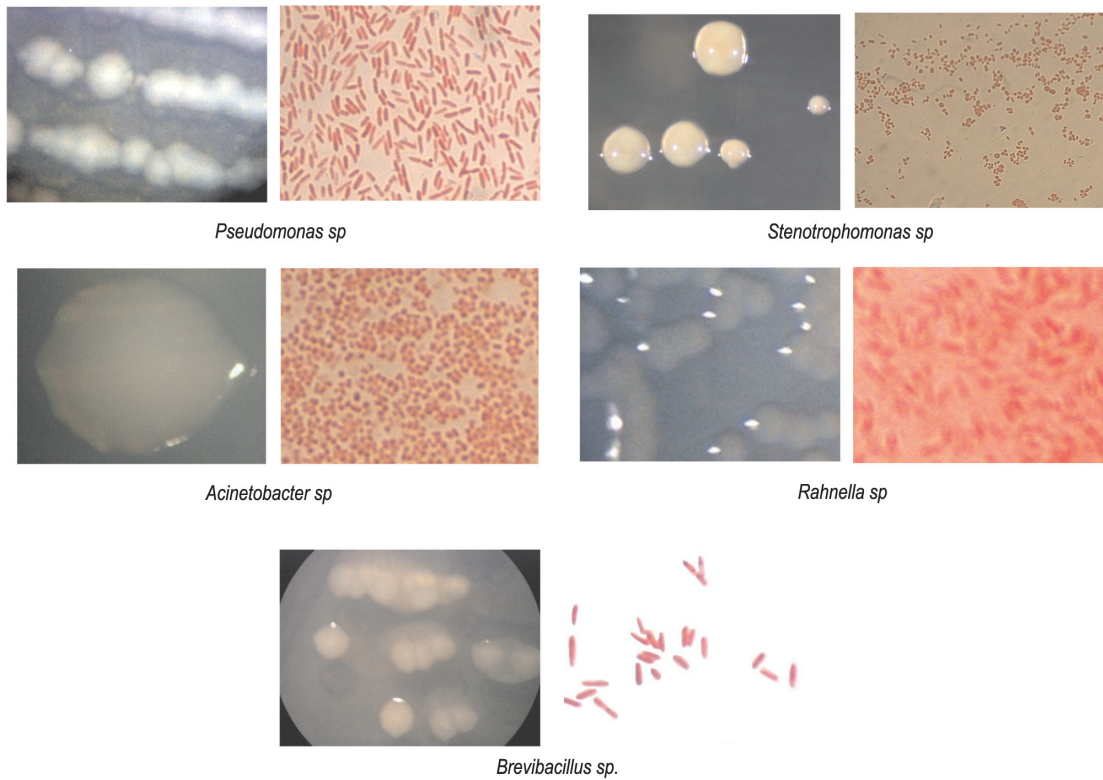


Figura 27. Fotografías macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterianas pertenecientes al cultivo mixto degradador de plaguicidas organoclorados.

- Acero, S., y Antolinez, N. 1999. Evaluación de cepas nativas degradadoras del pesticida organofosforado malathion, aisladas en la Bahía de Cartagena. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. 50 páginas.
- Addison, R.F. 1976. Organochlorine compounds in aquatic organisms: their distribution, transport and physiological significance. In: A.P. LOCKWOOD. Effects of pollutants on aquatic organisms. Cambridge University Press, London, 127-143.
- Applied Hydrology Associates Inc. 2004. Soil Vapor Extraction, Air Sparging, and Bioventing. Applied Hydrology Associates Inc. En: <http://www.appliedhydrology.com/soil.htm>. (Consulta: septiembre 7 de 2005)
- Azadpour-Keeley, A. 2002. Envirogen Propane Biostimulation Technology for In-Situ Treatment of MTBE-Contaminated Ground Water. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati. United States of America. Buckinghamshire County Council. 2005. Waste Management. En: http://www.bucksc.gov.uk/waste_strategy/composting/. (Consulta: septiembre 7 de 2005)
- Buell, C. B., and W. H. Weston. 1947. Application of the mineral oil conservation method to maintaining collections of fungous cultures. *Am.J.Bot.* 34:555-561.
- Calderón, F. 1999. Aislamiento e identificación de microorganismos resistentes y biorremediadores de mercurio en aguas contaminadas de la Bahía de Cartagena y el Humedal de La Conejera (Colombia). Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. 101 páginas.
- Castellani, A. 1939. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J.Trop.Med.Hyg.* 42:225-226
- Creactive. 2004. VADOSE/W 2004: Vadose zone and soil cover analysis. En: http://www.creative.net/Pages/398/vadose_prod_01.gif. (Consulta: septiembre 7 de 2005)
- D. Delille, and B. Delille. 2000. Field observations on the variability of crude oil impact on indigenous hydrocarbon-degrading bacteria from sub-Antarctic intertidal sediments. *Marine Environmental Research* 49 (5) pp. 403-417.
- Daane, L., Harjono, I., Zylstra, G., and Haggblom, M. 2001. Isolation and characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria Associate with Rhizosphere of salt Marsh Plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(6):2683-2691.
- Dosoretz, C., Mandelbaum, R., and Hadar, Y. 2002. Compost: Biodegradation of Toxic Organic Compounds. Pag: 914-925. In: Bitton, G. Encyclopedia of environmental microbiology. John Wiley & Sons. New York. United States of America.
- Dyrnyda, P., and Symberlist, R. 2002. Clean-up operation. University of Wales Swansea. En: <http://www.swan.ac.uk/empres/images/DYRYNDA%20Oil%20suction%20WEB.JPG>. (Consulta: septiembre 6 de 2005)
- ECOPETROL. 2003. Laboratorio de biotecnología. ECOPETROL S.A. En: http://www.ecopetrol.com.co/paginas2.asp?pub_id=35814&cat_id=153&idCategoriaprinicipal=153&cat_tit=LABORATORIO%20DE%20BIOTECNOLOGIA. (Consulta: septiembre 22 de 2005)
- Environmental field services Inc. 2004. Remediation System Experience. En: http://environmentalfIELDSERVICES.com/site_remediation_experience.htm. (Consulta: septiembre 7 de 2005)
- Environmental Protection Agency. 1999. Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons. Office of research and development. Washington, DC. United States of America.
- Environmental Protection Agency. 2001. A Citizen's Guide to Bioremediation. Environmental Protection Agency. En: www.epa.gov/superfund/sites. (Consulta: Septiembre 12 de 2005).
- EPA (Environmental Protection Agency). 1994. Chapter III: Bioventing. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007; and EPA 510-R-04-002). Washington, DC. United States of America.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1994. Chapter V: Landfarming. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007; and EPA 510-R-04-002). Washington, DC. United States of America.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1994. Chapter VIII: Biosparging. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007; and EPA 510-R-04-002). Washington, DC. United States of America.
- Galapagos Conservation Trust. 2001. GALAPAGOS OIL SPILL: Chronological account of the Tanker Jessica on San Cristobal Island, Galapagos. Galapagos Conservation Trust. En: <http://www.gct.org/spillhistory.html>. (Consulta: septiembre 6 de 2005)
- Garay, J.A. y Castro. L.A. 1992. Contaminación por Hidrocarburos Derivados del Petróleo en el Litoral Caribe Colombiano. bahía Cispatá hasta Riohacha. *Bol. Cient. CIOH* No.10. P: 13-26. Cartagena, Colombia.
- Garay, J; 1994. Inventario sobre capacidades portuarias para recepción y manejo de residuos contaminantes provenientes de buques - fase II (Barranquilla y Santa Marta). *Bol. Cient. CIOH*, No. 15. p. 67-92. Cartagena, Colombia.
- GESAMP. 1980 A sea of troubles. IMO/FAO/UNESCO-IOC/WMO/WHO/IAEA/UN/UNEP Joint Group Of Experts On The Scientific Aspects Of Marine Environmental Protection. (GESAMP). Reports and Studies. No.10.23 p
- Goldberg, E. 1979. Marine Chemistry: Radioactivity in the marine environment. Washington, D.C. National Academy of Science. p.137-146.
- Hartung de Capriles, C., S. Mata, and M. Middelveen. 1989. Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*. 106:73-79
- Head, M. and Swannell, R. 1999. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in marine habitats. *Current Opinion in Biotechnology*. 10:234-239.
- How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-94-003; EPA 510-B-95-007; and EPA 510-R-04-002).
- Hwang, S.1968. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. I. An evaluation of liquid nitrogen storage for preservation of selected fungal. *Mycologia*. 60:613-621.
- Idaho museum of natural history. 2002. Groundwater Review. Idaho museum of natural history. En: <http://imnh.isu.edu/digitalatlas/hydr/concepts/gwater/gwtrvw.htm>. (Consulta: septiembre 9 de 2005)

- Infoagro. 2004. Manual de aplicación de plaguicidas. Infoagro. En: http://www.infoagro.com/abonos/aplicacion_plaguicidas.htm. (Consulta: septiembre 6 de 2005)
- INVERMAR. 2005. Selección y Aplicación de Bacterias Marinas Nativas con Capacidad Degradadora de Compuestos Orgánicos Persistentes (COP) en el Pacífico y Caribe Colombiano. Proyecto 2105-09-13524. INVERMAR COLCIENCIAS. Santa Marta.
- Islam, M.S. and Tanaka, M. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48(7-8): 624-649.
- Jacobson, S.M & D.B. Boylan. 1973. Seawater soluble fractions of kerosene: effects on chemotaxis in a marine snail, *Nassarius obsoletus*. *Nature*, 241: 213-215p.
- Kaplan, C. and Kitts, C. 2004. Bacterial Succession In A Petroleum Land Treatment Unit. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(11):5625-5633.
- Kennish, M. 1994. *Practical Handbook of Marine Science*. 2nd edition. Editorial CRC Press. United States of America. Pg 439.
- Khan, J. 1980. Persistent chlorinated pesticides. En: <http://www.cfr.washington.edu/classes/esc.518/Lectures/persisten%20pesticides.pdf>. (Consulta: septiembre 12 de 2005)
- Kvenvolden, K. 2004. Oil Pollution In Prince William Sound, Alaska. U. S. Geological Survey. En: <http://menlocampus.wr.usgs.gov/50years/accomplishments/oil.html>. (Consulta: septiembre 6 de 2005)
- Leahy, J. and Colwell, r. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 54(3):305-315.
- López, L., Pozo C., Gómez, M., Calvo, C., y González, J. 2002. Studies on the effects on the insecticide Aldrin on aquatic microbial populations. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 50(2): 83-87.
- Madigan, M., Martinko, M, y Parker, J. 2004. *Brock: Biology of Microorganisms*. 10th edition. Prentice Hall. Madrid - España.
- Márquez, F., Hernández, V., y Lamela, T. 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by a microbial consortium. *Water, Air, and Soil Pollution*. 128:313-320
- Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie. 2005. Bisher unbekannter Abwehrmechanismus gegen Krankheitserreger entdeckt . En: <http://www.mpg.de/bilderBerichteDokumente/multimedial/bilderWissenschaft/showBdW.shtml?motiv=mikroskopisch>. (consulta: septiembre 8 de 2005)
- Mironov, O. 1970. The effect of oil pollution on the flora and fauna of the black sea. *FAO Tech.Conf.Mar.Poll.Rome. Paper E-92p*.
- Narváez, S. 2005. Selección de bacterias aisladas de sedimentos del Caribe colombiano con capacidad degradadora de hidrocarburos. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. 86 páginas.
- Naumann, K., and E. Griesbach. 1993. The ability of plant pathogenic microorganisms to survive in soil a summarizing reflection. *Zentbl. Mikrobiol.* 148:451-466
- Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales. 2005. Plaguicidas y Sustancias Tóxicas. Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales. En: <http://www.olca.cl/olca/oclog.htm>. (Consulta: septiembre 13 de 2005)
- Organización Mundial del Consumidor. 2004. Flash: ¡¡¡ Alto a los plaguicidas que envenenan el futuro sostenible del Perú !!! . Organización Mundial del Consumidor. En: <http://www.omco.org/macroderecho/peru/scanews4/scan1.htm>. (Consulta: septiembre 6 de 2005)
- Picard, A., Palavan, G., Robert, S., Pesando, D., and Ciapa, B. 2003. Effect of Organochlorine Pesticides on Maturation of Starfish and Mouse Oocytes. *Toxicol. Sci.* 73: 141-148.
- Prescott, L., Harley, J., and Klein, D. 2002. *Microbiology*. 5th edition. McGraw Hill. New York. United States of America.
- Prince, R. 2002. Bioremediation: an overview of how microbiological processes can be applied to the cleanup of organic and inorganic environmental pollutants. Pag: 693-712. in: Bitton, G. *Encyclopedia of environmental microbiology*. John Wiley & Sons. New York. United States of America.
- Prince, R. 2002. Petroleum and other hydrocarbons, Biodegradation of. Pag: 2402-2415. in: Bitton, G. *Encyclopedia of environmental microbiology*. John Wiley & Sons. New York. United States of America.
- Pulich, W., Winters & C. Van Baalen. 1974. The Effects Of A No 2 Fuel Oil And Two Crude Oils On The Growth And Photosynthesis Of Microalgae. *Mar. Biol.*, 28:87-94.
- Quijano, L. 2000. Seguimiento microbiológico de la técnica de land farming empleada en la biorremediación de lodos aceitosos en el área de campo Dina (ECOPETROL - Huila). Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. 103 páginas.
- Safe, S. H. 2000. Endocrine disruptors and human health—is there a problem? An update. *Environ. Health Perspect.* 108, 487-493.
- Salamanca, S. 1999. Degradación de hidrocarburos por bacterias aisladas de la Bahía de Cartagena. Tesis de pregrado en Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia. 57 páginas.
- Smidt, H., Ackermans, D., van der Ost and Vos, W. 2000. *Enzyme Microb. Technol.* 27, 812-820.
- Snedeker, S. M. 2001. Pesticides and breast cancer risk: A review of DDT, DDE, and dieldrin. *Environ. Health Perspect.* 109(Suppl. 1), 35-47.
- Spinnler, G., and Johnson, P. 2001. Bioaugmentation field testing for MTBE treatment. *Environmental Protection Agency*. En: <http://www.clu-in.org/products/newsletters/gwc/view.cfm?issue=gwc1001.htm>. (Consulta: septiembre 28 de 2005)
- Suárez, L. Degradación de Tolueno y Xileno por bacterias nativas colombianas y detección de los genes *tolA* y *xylB*. Tesis de Magister en Biología. Facultad de Ciencias. Departamento de Ciencias Biológicas. Universidad de los Andes. Bogotá-Colombia. 121 páginas.
- Swanell, R., Lee, K. y McDonagh, M. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiological Reviews*. 60(2):342-365
- The Victory Garden. 2005. Know-how: Primers & Projects: Can do Compost. En: <http://www.pbs.org/wgbh/victorygarden/knowhow/pp/compost.html>. (Consulta: septiembre 7 de 2005)
- Van Beilen, J. B., Wubbols, M., and Witholt, B. "Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*. 5, 161-174 (1994)
- Van Gelderen de Komaïd, A. 1988. Viability of fungal cultures after ten years of storage in distilled water at room temperature. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 30:219-221.
- Van Hamme, J., Singh, A. And Ward, O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 67(4):503-549
- Vargas, P., Cuellar, R., y Dussán, J. 2004. Biorremediación de residuos del petróleo. En: *Hipótesis. Apuntes científicos uniandesinos*. No. 4, dic-2004. Pág.:42-49
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J. V., Brandt, I., and Vethaak, A. D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 71-133.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES MARINAS Y COSTERAS

“José Benito Vives De Andréis”

Vinculado al Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial

Serie Documentos Generales No. 19

Teléfonos: (+57)(+5) 421 1380 / 421 4774 / 421 4775 / 431 2978 / 421 4413 / 431 2980

Telefax: (+57) (+5) 431 2975 / 431 2986

Cerro Punta de Betín, Santa Marta, Colombia

www.invemar.org.co