

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DE UN YACIMIENTO DE PETRÓLEO CUBANO

CHARACTERIZATION OF BACTERIA ISOLATED FROM A CUBAN OIL FIELD

Thais Hernández^{1*}, Polina Yurevna², Hugo Bautista³, Alexander Govin⁴, Saúl Fernández⁴, Freya González¹

(1) Centro de Investigación del Petróleo, Churrucá No. 481, La Habana - Cuba

(2) Universidad Federal de Kazán, Instituto de Ecología, Kremlyovskaya 18, República de Tatarstán - Rusia

(3) Universidad Federal de Kazán, Instituto de Medicina y Biología, Kremlyovskaya 18, República de Tatarstán - Rusia

(4) Universidad de La Habana, Facultad de Biología, calle 25 entre I y J, La Habana - Cuba

*autor contacto (e-mail: thaishg89@gmail.com)

Recibido: 31/05/2020 - Evaluado: 19/07/2020 - Aceptado: 26/08/2020

RESUMEN

Los yacimientos de petróleo poseen una microbiota autóctona que varía dependiendo de factores tales como temperatura, pH, salinidad, presión y disponibilidad de nutrientes. El siguiente trabajo tuvo como objetivo caracterizar bacterias aisladas a partir de un crudo cubano. Los aislados se identificaron a través de pruebas convencionales y espectrometría de masa. Se evaluó la capacidad de asimilar diferentes hidrocarburos como fuente de carbono. Además, se determinó la concentración mínima inhibitoria al crudo y la formación de biopelículas. Se aislaron seis bacterias, cinco fueron ubicadas en el género *Bacillus* y una en el género *Aeromonas*. Todos los aislados utilizaron seis hidrocarburos como fuente de carbono y energía, crecieron en concentraciones superiores al 15% (v/v) del crudo y degradaron la fracción saturada y aromática del mismo. Todas las bacterias producen biopelículas y presentan características que las hacen interesantes para ser incluidas en los procesos extractivos del crudo y en la biorremediación.

ABSTRACT

Oil reservoirs have an autochthonous microbiota that varies depending on factors such as temperature, pH, salinity, pressure and availability of nutrients. The following work had the objective of characterizing bacteria isolated from a Cuban crude oil. The isolated ones were identified through conventional tests and mass spectrometry. It was evaluated the capacity to assimilate different hydrocarbons as a carbon source. It was also determined the minimum inhibitory concentration to crude and the formation of biofilms. Six bacteria were isolated, five were located in the genus *Bacillus* and one in the genus *Aeromonas*. All the isolates used six hydrocarbons as a carbon and energy source, grew in concentrations greater than 15% (v / v) of the crude oil and degraded the saturated and aromatic fraction thereof. All bacteria produce biofilms and have characteristics that make them interesting for inclusion in crude oil extraction and bioremediation.

Palabras clave: *Bacillus*, *Aeromonas*, degradación de hidrocarburos, biopelículas

Keywords: *Bacillus*, *Aeromonas*, hydrocarbon degradation, biofilms

INTRODUCCIÓN

El petróleo, de acuerdo a su etimología (del griego: *petro* = roca y *oleum* = aceite) significa textualmente "aceite de roca". Es una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos y heterocompuestos. En condiciones normales el petróleo es un líquido oleaginoso que puede presentar gran variación en diversos parámetros como color, olor y viscosidad. En Cuba esta diversificación es muy evidente, encontrándose petróleos de color amarillento-verdoso como el del yacimiento Jarahueca en Sancti Spíritus, incoloros-ligeros como la nafta de Motembo en Villa Clara, hasta líquidos negros tan viscosos que apenas fluyen como algunos de los yacimientos de Varadero (Linares *et al.*, 2011). Estas variaciones se deben a la diversidad de concentraciones de hidrocarburos que componen la mezcla. Los crudos ricos en metales pesados y azufre, así como en moléculas de elevada masa molecular, como las resinas y los asfaltenos se consideran petróleos de bajo valor comercial (Winther & Magerholm, 2016).

En los últimos años los estudios microbiológicos en la rama del petróleo y sus derivados han aumentado considerablemente, ampliando así la aplicación de la biotecnología en la industria petrolera (Sierra-García *et al.*, 2020; Veana *et al.*, 2019; Varjani *et al.*, 2018). Una de dichas aplicaciones es la recuperación de petróleo con el empleo de microorganismos (MEOR, según sus siglas en inglés de *Microbial Enhanced Oil Recovery*). MEOR es una técnica de recuperación mejorada en la que se emplean bacterias, arqueas y sus bioproductos para aumentar la movilización (el flujo) del crudo remanente en el reservorio. Además, permite recuperar el petróleo que se encuentra atrapado en los poros de las rocas por elevadas fuerzas capilares (She *et al.*, 2019; Hernández *et al.*, 2019; Andrade & Ayala, 2017).

En la actualidad existe un mayor conocimiento sobre la diversidad de las comunidades microbianas autóctonas de los reservorios de petróleo. En ellos es posible encontrar gran variedad de poblaciones microbianas, entre las cuales, las bacterias sulfato-reductoras (BSR) y nitrato-reductoras (BNR), las bacterias degradadoras de hidrocarburos (BDH) y *archaea* formadoras de metano (AFM) son parte imprescindible en el ecosistema del yacimiento y desempeñan un papel crítico en los procesos de MEOR (Sierra-García *et al.*, 2020; Hernández *et al.*, 2019). Varias son las funciones que se le atribuyen a estas poblaciones. Todos los microorganismos anteriormente mencionados, están adaptados a las severas condiciones de yacencia entre las que se destacan: potencial redox, pH, salinidad, temperatura, presión y escasez de nutrientes (Varjani *et al.*, 2018; Lipus *et al.*, 2017).

Por otro lado, la facilidad que presentan los microorganismos de biodegradar diferentes componentes existentes en los crudos varía considerablemente. No todos los componentes del petróleo se metabolizan de igual manera. Los alcanos de cadena más corta y los aromáticos de menor peso molecular se degradan más fácilmente debido a que estos hidrocarburos más pequeños pueden transportarse a través de la membrana celular sin dificultad. Los alcanos de cadena más corta se hacen solubles en agua generalmente con ayuda de surfactantes producidos por los microorganismos. Aun cuando es sabido que la degradación de petróleo de alto peso molecular ocurre, este proceso es mucho más lento (Goveas *et al.*, 2020; Al-Dhabaan, 2019). En este contexto el siguiente trabajo se trazó como objetivo caracterizar bacterias autóctonas de un crudo de la Franja petrolífera norte cubana.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de muestreo y toma de muestra

El muestreo del petróleo crudo se realizó en un pozo perteneciente al yacimiento Boca de Jaruco, el cual se ubica en el Bloque Central Boca de Jaruco (Oeste), perteneciente a la Franja petrolífera norte cubana. En la figura 1 se muestra la ubicación del mismo. Las muestras de crudo se colectaron en superficie, en la boca del pozo, en frascos estériles de 1000 ml.

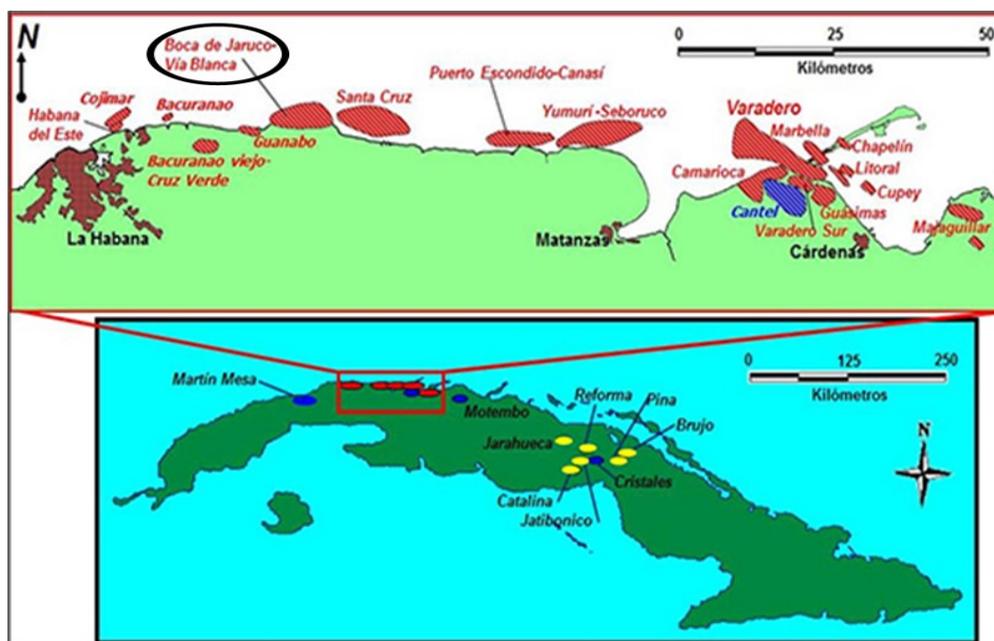


Fig. 1: Mapa de Cuba donde se señala la ubicación del yacimiento Boca de Jaruco (imagen adaptada de <http://www.juventudrebelde.cu/cuba/2016-09-16/lo-que-falta-por-descubrir-en-motembo/>).

Caracterización fisicoquímica del petróleo

Para la caracterización del petróleo se siguieron las normas avaladas para cada método. Los parámetros medidos fueron los siguientes: densidad a 15 °C (ASTM D 287-12b, 2018); °API (ASTM D 1298/99, 1999); BSW (ASTM D-4007-81, 1995); contenido de asfaltenos (ASTM D-6560-17, 2017); viscosidad dinámica a 30 y 50 °C (CI-GC / P 20 07, 2017); azufre total (ASTM D 1552-08, 2008); sedimentos por extracción (ASTM D 473-07, 2017); residuo de carbón (ASTM D 4530-11, 2011). A su vez se realizó el análisis SARA para determinación de las distintas fracciones de hidrocarburos (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) (ASTM D4124-09, 2018).

Aislamiento e identificación de los aislados bacterianos

A partir de las muestras de crudo se realizaron diluciones en la proporción 1:100 en caldo Luria Bertani (LB) (10 g Triptona; 5 g extracto de levadura; 5 g NaCl; 1000 ml H₂O destilada, pH 7,2). Las mismas se incubaron a 30 °C durante 30 días en condiciones estáticas. Luego del período de incubación se inocularon 100 µl del cultivo en agar LB y se incubaron durante 24 horas a 30 °C.

Los aislados se identificaron a través de la espectrometría de masa MALDI-TOF MS (por sus siglas en inglés *matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer*), la cual se realizó en la Universidad Federal de Kazán, Rusia. Esta información fue complementada a través de las características micromorfológicas, tintoriales y pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa, fermentación de la glucosa y la lactosa, reducción de nitrato, producción de H₂S, asimilaciones de: D-glucosa, D-maltosa, lactosa, L-arabinosa, D-manosa, manitol, N acetil glucosamina, gluconato potásico, así como la hidrólisis de: escualina, almidón, gelatina, ADN y de la caseína).

Evaluación de diferentes hidrocarburos como fuente de carbono

La evaluación de diferentes hidrocarburos como fuente de carbono por los aislados se determinó en medio líquido y sólido. Los aislados se cultivaron en el medio Bushnell Hass (MgSO₄ 0,2 g, CaCl₂ 0,2 g, KH₂PO₄ 1 g, K₂HPO₄ 1 g, NH₄NO₃ 1 g, FeCl₃ 0,05 g, 1000 ml de agua destilada, en el caso del medio agarizado se adicionó 2 g/l de agar)

suplementado al 1% de la fuente de carbono (glicerol, keroseno, diesel, gasolina, parafina líquida y el propio crudo cubano). Los cultivos se incubaron durante 24 horas, a 30°C, en el caso del medio líquido se colocaron en zaranda a 150 r.min⁻¹ y en este el crecimiento se determinó a través de la absorbancia a $\lambda = 600$ nm.

Adicionalmente, se realizó una fermentación estática para evaluar el crecimiento de los microorganismos de interés en presencia de petróleo crudo. A partir de precultivos en frascos de 100 ml con 25 ml de LB líquido, incubados 24 horas a 30 °C y 130 r.min⁻¹, se inocularon en frascos de 1000 ml con 300 ml de medio mínimo UOM (medio para microorganismos oxidantes de hidrocarburos, a partir de la transliteración de sus siglas en ruso: Na₂HPO₄ 4,5 g/l; KH₂PO₄ 3 g/l; (NH₄)₂SO₄ 1 g/l; MgSO₄ 0,2 g/l) suplementado con 2% (m/m) de crudo. Cada aislado se inoculó por duplicado y se realizaron mediciones de la absorbancia a $\lambda = 600$ nm periódicamente hasta completar 5 semanas.

Degradación bacteriana de la fracción saturada y aromática del petróleo crudo y CMI al petróleo

Para determinar la degradación del petróleo crudo por los aislados se realizó una fermentación estática. A partir de precultivos en frascos de 100 ml con 25 ml de LB líquido, incubados durante 24 horas a 30 °C y 130 r. min⁻¹, se inocularon erlenmeyers de 1000 ml con 300 ml de medio mínimo UOM suplementado con 2% (v/v) de crudo cubano. Cada aislado se inoculó por duplicado y se determinó la absorbancia a $\lambda = 600$ nm diariamente hasta completar cinco semanas. La cuantificación de la degradación de la fracción saturada y aromática de la muestra (alcanos, n-alcanos y cicloalcanos), se siguió según la norma rusa PND F 14.1:2:4.5-95 (2011). La concentración de la fracción de interés se determinó en un espectrómetro de infrarrojo (Concentratomer AH-2, Rusia). Cada medición se realizó por triplicado. La concentración de los productos derivados del petróleo se determinó por la siguiente fórmula:

$$Csf = Cs \times Vext \div 10 \quad (1)$$

Donde Csf: concentración final de la fracción saturada (mg/l); Vext: volumen del extracto (ml).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de petróleo crudo en medio líquido

La concentración mínima inhibitoria (CMI) al petróleo se determinó a partir de precultivos en medio LB (incubados 18 h a 130 r. min⁻¹ y 30°C). Se inocularon tubos con 5 mL de UOM con concentraciones crecientes del crudo en estudio (1% al 40% v/v). Los cultivos se incubaron durante 72 horas a 30°C en estático. El crecimiento se determinó a través de la turbidez en el medio y su comparación con el medio sin inocular.

Formación de biopelículas

La capacidad de formación de biopelícula se evaluó por la adhesión a placas de poliestireno, pero incluyendo algunas modificaciones (Faleiro, 2010). A partir de precultivos en LB sólido, se inocularon cinco colonias en tubos con 5 ml de caldo LB y se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Posteriormente, se inoculó 1,3 μ l de los cultivos en 130 μ l de los caldos LB, M9 (Na₂HPO₄ 6,7 g/l, KH₂PO₄ 3 g/l, NaCl 0,5 g/l, NH₄Cl 1 g/l, pH 7,0) y UOM en pocillos de placas microtiter de poliestireno no tratadas para cultivo celular y con fondo plano (GreinerBio-one, Stuttgart, Alemania). Los cultivos se incubaron en condiciones estáticas, a 30 °C durante 24 horas. Se utilizaron pocillos con los distintos caldos sin inocular como controles negativos. El crecimiento se determinó a través de la absorbancia del cultivo a $\lambda = 620$ nm en lector de placas microtiter (DYNEX Technologies Inc., Vancouver, Canada). Se aspiró los caldos, se lavaron los pocillos con 150 μ l de agua destilada y las placas se secaron a 35 °C durante 20 minutos. Los pocillos se tiñeron con 130 μ l de violeta cristal al 1% (p/v) durante 5 minutos, se retiró el colorante y se lavaron los pocillos cuatro veces con 150 μ l de agua destilada. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 hora, se añadió 130 μ l de etanol absoluto a cada pocillo, se incubaron durante cinco minutos y se determinó la absorbancia a $\lambda = 570$ nm. La capacidad de formación de biopelículas se determinó a través de las fórmulas:

$$FB1 = DO_b - DO_c \quad (2)$$

$$FB2 = DO_b \div DO_c \quad (3)$$

$$FEB = (DO_b - DO_c) \div DOC_{620nm} \quad (4)$$

En las cuales FB son los índices de formación de biopelícula, FEB es el índice de formación específica de biopelícula, DO_b la densidad óptica a 570 nm de las bacterias adheridas, DO_c la absorbancia a 570 nm del pocillo teñido conteniendo caldo no inoculado (para eliminar valores inespecíficos o abióticos) y DOC_{620nm} la absorbancia a 620 nm del crecimiento bacteriano en caldo.

Análisis biométricos

A los datos se les realizaron las pruebas de normalidad y de homogeneidad de varianza. Una vez comprobadas las premisas, los resultados fueron analizados mediante el método paramétrico ANOVA y posteriormente con la prueba de significación honesta de Tukey. Todos los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico "Statistica" versión 8.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica del petróleo

La composición elemental del petróleo está normalmente comprendida dentro de los siguientes intervalos: 83-87% de C, 11-14% de H, 0-2% de S, 0-2% de N y 0-0,5% de otros elementos tales como oxígeno, metales y sales minerales como cloruros y sulfatos de Ca, Mg y Fe (Winther & Magerholm, 2016). Los resultados de la caracterización fisicoquímica del petróleo del pozo muestreado, perteneciente a la Franja petrolífera norte cubana, se muestran en la tabla 1. Entre las propiedades más importantes para la extracción, transportación y refinación del crudo se encuentra la densidad, que puede expresarse como gravedad específica en grados API (de sus siglas en inglés *American Petroleum Institute*). Considerando este parámetro el petróleo en estudio se define como crudo mediano (24,5 °API y 0,9 g/cm³). Este valor resulta favorable dadas las condiciones cubanas, donde se encuentran varios yacimientos con crudos pesados y extrapesados.

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas del crudo muestreado en un pozo de la Franja petrolífera norte de Cuba.

Parámetro	Método	Valor
Densidad, 15 °C, g/cm ³	ASTM-D 287-12b	0,9074
°API	ASTM-D 1298/99	24,5
BSW, %	ASTM D-4007-81	0,2
Asfaltenos, %	ASTM D-6560	4,6
Viscosidad dinámica, (30 °C) cP	CI – GC/ P 20 07	33
Viscosidad dinámica, (50 °C) cP	CI – GC/ P 20 07	14
Azufre total, % m/m	ASTM D1552-08	4,24
Sedimentos por Extracción, % m/m	ASTM D473-07	0,01
Residuo de Carbón (Micro), % m/m	ASTM D4530-11	5,78
SARA, %	ASTM D4124-09	Saturados: 46,47 Aromáticos: 25,1 Resinas: 22,73 Asfaltenos: 5,7

El azufre es el compuesto más abundante en el crudo después del carbono y del hidrógeno. Su contenido en el petróleo puede variar en un intervalo de 0,03% en peso a valores superiores al 8%, e incluso hasta 30%. Se han identificado al menos 200 compuestos azufrados distintos, incluyendo sulfuros, mercaptanos, tiofenos, alquiltiofenos tetrahidrotiofenos, tiofenoles y benzotiofenos (Pazo *et al.*, 2018; Alonso, 2010). La variabilidad del

contenido de estos compuestos azufrados depende del yacimiento en el que se ha formado el crudo, así como la madurez del mismo. Generalmente, los crudos más maduros químicamente son ricos en azufre y compuestos azufrados no tiofénicos, mientras que los aceites inmaduros van a contener una mayor proporción de benzotiofenos y dibenzotiofenos alquilados, de elevado peso molecular, siendo estos los que representan la mayor parte del azufre contenido en el crudo (Linares *et al.*, 2011). Mientras mayor es la concentración de azufre se requieren procesos de refinación más complejos y, por ende, un mayor costo final. Además, es uno de los factores determinantes del tipo y diversidad de la microbiota presente en el yacimiento (Hernández *et al.*, 2019). Si el contenido de azufre que presentan los crudos es igual o mayor al 2 % m/m se consideran altamente sulfurados (Ortega *et al.*, 2015). Considerando este valor, el petróleo muestreado es altamente sulfurado (agrio), ya que cuenta con un % m/m de azufre total de 4,24 (tabla 1).

A su vez, en el crudo analizado se aprecia un predominio de la fracción saturada (46,47%), siendo esta más de ocho veces superior que la fracción asfáltica (5,7%), más del doble de la de resinas (22,73%) y 1,85 veces mayor que el contenido de hidrocarburos aromáticos (25,1%). Aun así, este petróleo no se puede considerar parafínico, ya que el contenido de hidrocarburos saturados requerido para esta clasificación debe ser de un 75% (Winther & Magerholm, 2016). Las características fisicoquímicas descritas para el petróleo, entre otras, son parámetros condicionantes de la biodiversidad de microorganismos que proliferará en las condiciones de yacencia y que constituirán la microbiota autóctona de cada pozo.

Aislamiento e identificación de bacterias autóctonas del yacimiento de petróleo cubano

Los yacimientos de petróleo resultan ecosistemas que poseen una gran biodiversidad microbiana. El funcionamiento de los ecosistemas está determinado por su microbiota autóctona y la biodiversidad de la misma. Por tal motivo es importante el estudio de estas comunidades, incluyendo las variaciones que pueden ocurrir en respuesta a los factores ambientales capaces de modificarlas. Todo esto permite obtener información relevante para el estudio de fenómenos de simbiosis, competición, comunicación entre microorganismos y su papel sobre los ciclos biogeoquímicos y de los procesos de biodegradación de disímiles compuestos, así como las nuevas funciones génicas relacionadas con el papel de los microorganismos en la modificación del medio ambiente (Veana *et al.*, 2019).

A partir de una muestra de crudo y mediante un aislamiento tradicional en medio sólido, se obtuvieron seis bacterias teniendo en cuenta las diferencias en cuanto a las características culturales. Los aislados se denotaron como: CC21, CC22, CC23, CC31, CC32 y CC33. Se observó una reducida biodiversidad bacteriana en la muestra de crudo en estudio. La microbiota bacteriana autóctona de los yacimientos varía en diversidad y número según las condiciones de presión, temperatura, salinidad del agua de formación, presencia de metales pesados, entre otros factores y su actividad depende de la disponibilidad de nutrientes (Hernández *et al.*, 2019; Lipus *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2016). Además, solo es posible aislar y cultivar en el laboratorio una ínfima fracción de la biodiversidad existente en los ecosistemas naturales (entre 0,1-10%). Lo anterior se debe a que se desconocen los requerimientos nutricionales necesarios de todos ellos, las condiciones fisicoquímicas precisas de su ambiente natural y la información sobre las relaciones simbióticas, comensales o parasitarias que se mantienen en una comunidad microbiana (Madigan *et al.*, 2019; Varjani *et al.*, 2018).

Las características micromorfológicas y tintoriales, así como las respuestas a las pruebas bioquímicas de los aislados bacterianos se relacionan en la tabla 2. El 100% de los aislados mostró morfología bacilar y cinco de ellos fueron Gram positivos formadores de endospora. Se obtuvo un solo aislado (CC22) Gram negativo, no formador de endospora.

La técnica MALDI-TOF MS, consiste en una ionización suave del analito que provoca la vaporización de moléculas termolábiles, no volátiles tales como proteínas y lípidos en un intervalo de peso molecular entre 2 y 20 kDa. Es muy utilizada para obtener, mediante espectrometría de masas, un espectro propio de un organismo. Al compararlo con bases de datos es posible identificar a nivel de género, especie e incluso cepas bacterianas y

fúngicas. Los resultados de la identificación a través de esta técnica fue la siguiente: *Bacillus subtilis* (CC21, CC23, CC31 y CC32), *Aeromonas veronii* (CC22), *Bacillus licheniformis* (CC33).

Tabla 2: Respuestas a las pruebas bioquímicas aplicadas a los aislados bacterianos en estudio. (+) respuesta positiva a la prueba, (-) respuesta negativa.

Características	Aislados bacterianos					
	CC21	CC22	CC23	CC31	CC32	CC33
Respuesta a la tinción de Gram	+	-	+	+	+	+
Morfología	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo	bacilo
Endospora	+	-	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Fermentación de la glucosa	+	+	-	+	+	+
Fermentación de la lactosa	-	-	-	-	-	-
Reducción de nitrato	+	+	+	+	+	+
Producción de H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Asimilación de la D- glucosa	+	+	+	+	+	+
Asimilación de la D- maltosa	+	+	+	+	+	+
Asimilación de la lactosa	-	-	-	-	-	-
Asimilación de la L- arabinosa	-	+	+	-	+	-
Asimilación de la D- manosa	+	+	+	+	+	+
Asimilación del manitol	+	+	+	+	+	+
Asimilación del N acetil glucosamina	-	-	+	-	+	-
Asimilación de gluconato potásico	-	-	+	-	+	+
Hidrólisis de la escualina	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis del almidón	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de la gelatina	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis del ADN	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de la caseína	+	+	+	+	+	+

En el presente estudio se obtuvo que el 100% de los aislados pertenecientes al género *Bacillus* hidrolizan la escualina, almidón, gelatina, ADN y caseína (tabla 2). Además, mostraron la capacidad de asimilar diferentes fuentes de carbono. Estos resultados coinciden con los informados para el género *Bacillus*, en el cual los miembros se caracterizan por la asimilación de diferentes fuentes de carbono y la producción de una amplia diversidad de enzimas hidrolíticas como amilasas, nucleasas y proteasas (Madigan *et al.*, 2019). Con los resultados obtenidos se confirma la identificación taxonómica antes mencionada de los aislados CC21, CC23, CC31, CC32 y CC33. Además, este género se refiere con frecuencia en aislamientos a partir de petróleo (Fan *et al.*, 2020; Hamzah *et al.*, 2020; Parthipan *et al.*, 2017), así como de suelos (Hamzah *et al.*, 2020; Al-Dhabaan, 2019; Moein *et al.*, 2019) y aguas (Sohail & Jamil, 2020; Dur-E-Shahwar *et al.*, 2019; Sahar *et al.*, 2019) contaminadas con hidrocarburos.

El aislado CC22 fermenta la glucosa y la lactosa, reduce nitrato y asimila diferentes fuentes de carbono. Además, produce las cinco enzimas hidrolíticas evaluadas. Estos resultados coinciden con los referidos para el género *Aeromonas*. Los miembros de este género se caracterizan por producir amilasas, ADNasas, estersas, peptidasas y otras enzimas hidrolíticas. A su vez, producen ácido a partir de la asimilación de diferentes carbohidratos, fundamentalmente de D-glucosa. Estos microorganismos además reducen nitrato (Madigan *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos (tabla 2) corroboran la ubicación taxonómica del aislado CC22 en el género *Aeromonas*. El género *Aeromonas* también se ha aislado a partir de crudo (Cui *et al.*, 2019; Kamal *et al.*, 2015).

Evaluación de diferentes hidrocarburos como fuente de carbono

Las fuentes de carbono y energía hidrosolubles son de más fácil degradación y con ellas generalmente se obtiene un crecimiento microbiano rápido y abundante. Han sido comúnmente utilizados azúcares como glucosa, sacarosa y maltosa, así como desechos industriales tales como las melasas (Fan *et al.*, 2020; Hernández *et al.*, 2019). No obstante, la biodegradación de hidrocarburos ha sido ampliamente demostrada (Rathi & Yadav, 2019). En el presente estudio resultaba de interés evaluar el crecimiento a expensas de hidrocarburos como: glicerol, parafina, keroseno, gasolina, diésel y petróleo crudo. El 100% de las cepas crecieron en presencia de las seis fuentes de carbono evaluadas tanto en el medio sólido (Figura 2) como en el líquido (Figura 3).

En el medio sólido se observó un crecimiento más intenso en presencia de glicerol (Figura 2A) y parafina líquida (Figura 2F). El glicerol es el compuesto de menor tamaño y complejidad estructural, de los seis compuestos hidrocarbonados evaluados. Es el único sustrato soluble en agua por lo cual se favorece el crecimiento de todas las cepas en presencia de este compuesto, en comparación con las restantes fuentes de carbono (Iraqi & Ayatollahi, 2019).

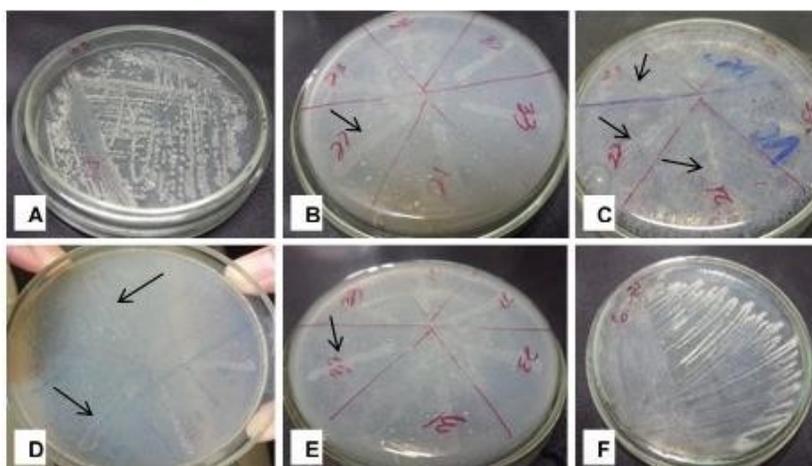


Fig. 2: Crecimiento de los aislados en medio sólido Bushnell-Hass, con diferentes fuentes de carbono: (A) glicerol, (B) keroseno, (C) crudo, (D) diésel, (E) gasolina, (F) parafina líquida.

Tal como ocurrió en el medio sólido, en el cultivo líquido se obtuvo mayor crecimiento en presencia de la fuente de carbono hidrosoluble (Figura 3). En medio líquido el 83,3% de las cepas mostraron sus mayores valores de absorbancia en presencia de glicerol, siendo *A. veronii* CC22 y *B. licheniformis* CC33 las que mostraron mayores crecimientos. Resultados similares los obtuvieron Sohail & Jamil (2020), quienes evaluaron la cinética de crecimiento y de producción de biotensioactivos de aislados de un yacimiento de petróleo. En el caso de la cepa *B. subtilis* creciendo con glicerol como única fuente de carbono, los investigadores observaron luego de 96 h de cultivo, abundante biomasa y una producción de biotensioactivo del 31%.

En el caso de la cepa *B. subtilis* CC32 su mayor crecimiento se registró cuando creció en presencia de parafina como única fuente de carbono. En presencia de keroseno el crecimiento no fue tan abundante lo que puede estar dado por la complejidad de la fuente de carbono empleada. El mayor crecimiento en este caso lo mostró *B. licheniformis* CC33. Por otro lado, al ser el diésel una mezcla compleja de compuestos parafínicos y aromáticos, se obtuvo escaso crecimiento en presencia de esta fracción, siendo el aislado *B. subtilis* CC23 el que mostró el mayor crecimiento seguido de los aislados *A. veronii* CC22 y *B. subtilis* CC32. La cepa *B. subtilis* CC21, mostró el mayor crecimiento en presencia de gasolina como fuente de carbono, seguido del aislado de la misma especie CC32 y *B. licheniformis* CC33. De manera general, la asimilación y degradación de distintas fracciones de hidrocarburos por los géneros *Bacillus* y *Aeromonas*, ha sido ampliamente reportada (Wang *et al.*, 2019; Rathi & Yadav, 2019; Álvarez-Mejía *et al.*, 2016; Kamal *et al.*, 2015).

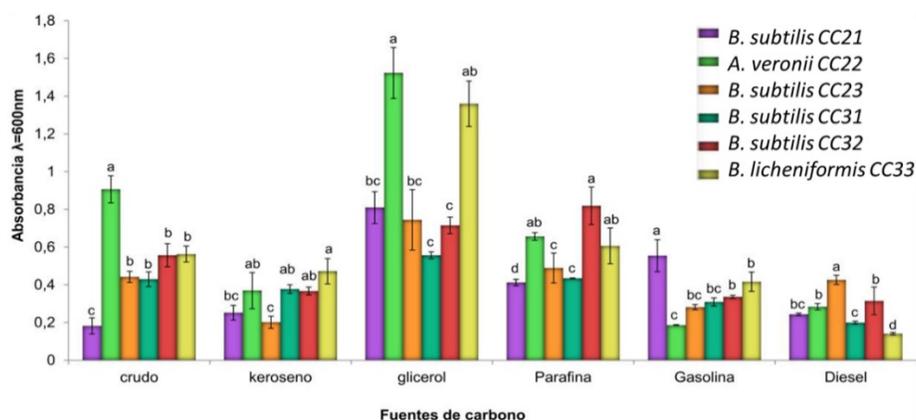


Fig. 3: Crecimiento de los aislados en medio mínimo Bushnell-Hass líquido suplementado al 1% de diferentes fuentes de carbono (crudo, keroseno, glicerol, parafina, gasolina y diésel). Las barras muestran la desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas, Tukey (n=3, p<0,05).

En presencia del crudo el crecimiento no fue abundante, siendo *A. veronii* CC22 quien presentó los mayores valores de absorbancia y mostró diferencias significativas con el resto de las cepas. Le continuaron en el crecimiento las cepas *B. subtilis* CC23, *B. subtilis* CC31, *B. subtilis* CC32, *B. licheniformis* CC33, entre las cuales no se observó diferencias significativas. Estos resultados sugieren que estas bacterias pueden asimilar, al menos, una de las fracciones que componen el petróleo y que existe una rápida expresión del sistema enzimático de estos microorganismos para la asimilación del crudo como fuente de carbono. Resultados similares fueron reportados en un estudio reciente, donde se evaluó el crecimiento y la formación de exopolisacárido (EPS) por la cepa *B. licheniformis* DM-1 en medio líquido con distintas fuentes de carbono y energía (Fan *et al.*, 2020). En presencia de petróleo crudo estos investigadores obtuvieron el menor crecimiento y producción del EPS, seguido del obtenido frente a la parafina líquida como fuente de carbono y energía.

Los géneros *Bacillus* y *Aeromonas* han sido ampliamente reportados como microorganismos que desempeñan un papel crítico en la degradación de hidrocarburos con potencialidades para MEOR (Fan *et al.*, 2020; Hamzah *et al.*, 2020; Jahanbani *et al.*, 2019). Además, son utilizados en la biorremediación de ambientes afectados por derrames de petróleo o sus derivados (Wang *et al.*, 2019). En el caso de las seis cepas descritas en el presente estudio, demostraron la capacidad para metabolizar los diferentes compuestos evaluados, lo que les confiere potencial tanto para los procesos de MEOR como para de biorremediación.

Degradación bacteriana de la fracción saturada y aromática del petróleo crudo

Una vez demostrada la asimilación de los distintos hidrocarburos evaluados, se procedió a valorar el crecimiento de los seis aislados bacterianos en presencia del petróleo crudo cubano, previamente caracterizado. Para ello se realizó una fermentación estática con el objetivo de no favorecer el crecimiento bacteriano debido a la aireación del medio, ya que en los pozos de petróleo naturalmente las tensiones de oxígeno son bajas. Los resultados se muestran en la figura 4.

Durante el período de incubación se aprecian tres de las cuatro fases del crecimiento bacteriano. La fase estacionaria para todas las cepas analizadas no fue menor de cuatro días, momento a partir del cual comienza un ligero aumento de la densidad óptica, evidenciándose el cambio a la fase exponencial a partir del día 17. Es conocido que, al pasar las cepas bacterianas de un medio de cultivo rico a uno mínimo, es necesario la adaptación a las nuevas condiciones, incluyéndose un cambio de la maquinaria enzimática y la síntesis de nuevos bioproductos (Madigan *et al.*, 2019). En el caso que nos atañe, se utilizó petróleo crudo, altamente sulfuroso, como única fuente de carbono y energía.

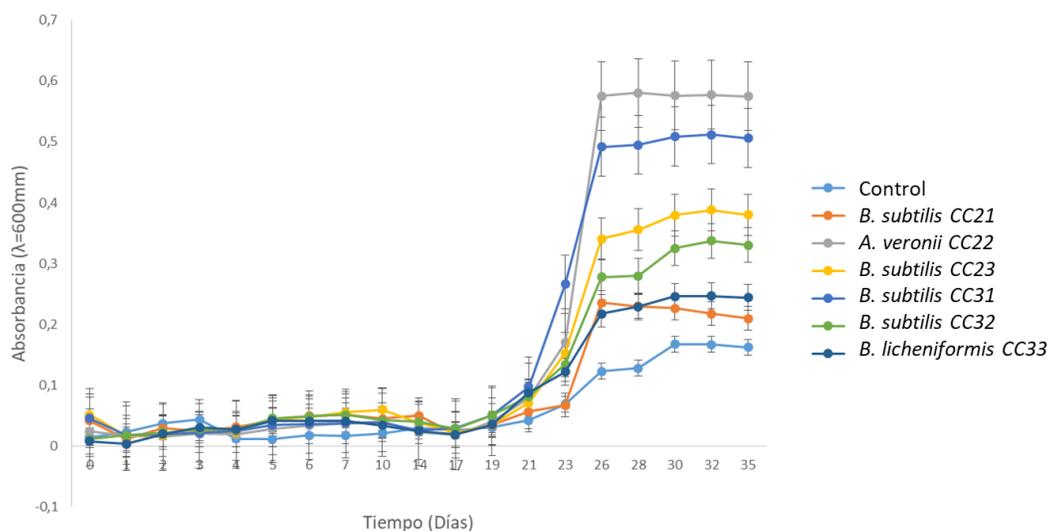


Fig. 4: Crecimiento de los aislados en medio líquido UOM suplementado con 2% de crudo cubano, durante 35 días en condiciones estáticas y temperatura ambiente. Las barras representan el valor medio de tres determinaciones \pm desviación estándar.

El proceso de biodegradación del petróleo depende de la emulsificación del crudo, de manera que el hidrocarburo pueda transportarse al interior de las células bacterianas para su conversión a ácidos grasos. Este proceso implica la producción de biosurfactantes y su duración varía dependiendo del microorganismo involucrado. En un estudio similar se evaluó la biodegradación de petróleo por parte de las cepas de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus cereus* aisladas de suelo contaminado con hidrocarburos (Al-Dhabaan, 2019). En este caso se cuantificó la degradación a los 7, 14, 21 y 28 días, obteniéndose los mejores resultados en el máximo período de tiempo evaluado (56% de degradación para el caso de *P. aeruginosa* y 52% para *B. subtilis*). Por otro lado, Parthipan *et al.* (2017), evaluaron la producción de biotensioactivos y de enzimas degradativas que median la degradación de petróleo crudo por la cepa *B. subtilis* A1, aislada de un yacimiento de la India, obteniendo la eficiencia de biodegradación del crudo del 87%.

A pesar del largo período de adaptación de los seis aislados bacterianos en estudio, todos crecieron a expensas únicamente de petróleo crudo como fuente de carbono y energía. La cepa *A. veronii* CC22 presentó el mayor crecimiento alcanzando la fase estacionaria el día 25. Este resultado coincide con el estudio preliminar, donde se comprobó el crecimiento de los aislados en medio mínimo suplementado con distintos hidrocarburos. En la fermentación estática realizada por 35 días le siguen al aislado *A. veronii* CC22, en orden decreciente según el máximo crecimiento alcanzado, las cepas *B. subtilis* CC31, *B. subtilis* CC23, *B. subtilis* CC32, *B. licheniformis* CC33 y *B. subtilis* CC21. En el control también se apreció un ligero aumento de los valores de densidad óptica, aunque su valor es ínfimo comparado con el de los frascos inoculados. Esto puede deberse a que el petróleo utilizado no fue previamente esterilizado y puede contener microorganismos.

De esta manera se demuestra que los seis aislados analizados crecen en un período largo de tiempo únicamente a expensas de un medio salino y petróleo crudo como fuente de carbono y energía. Se pretende continuar los estudios con estos aislados y en un futuro optimizar el medio de cultivo para obtener un máximo crecimiento en un menor período de tiempo.

Degradación bacteriana de la fracción saturada y aromática del petróleo crudo

En la práctica analítica se acostumbra a considerar como fracción saturada y aromática (FSA) a la suma de hidrocarburos no polares y poco polares (alifáticos, alicíclicos y aromáticos) diluidos en tetracloruro de carbono,

que no son absorbidos en ácido de aluminio (Fan *et al.*, 2020). En tal sentido, se evaluó la degradación de la dicha fracción del crudo, para lo cual se determinó su concentración en el momento inicial de la fermentación estática y transcurridos 30 días. Los resultados se muestran en la figura 5. En todos los casos se apreció una reducción considerable de la FSA, donde la concentración inicial de las fracciones analizadas fue de aproximadamente 0,4%. Transcurrido un mes la cepa CC21 disminuyó la concentración en el medio de hidrocarburos alifáticos, alicíclicos y aromáticos en un 88%. Le siguieron los aislados *A. veronii* CC22 (83%), *B. subtilis* CC32 (77,5%), *B. subtilis* CC31 (75%), *B. subtilis* CC23 (72%) y *B. licheniformis* CC33 (71%).

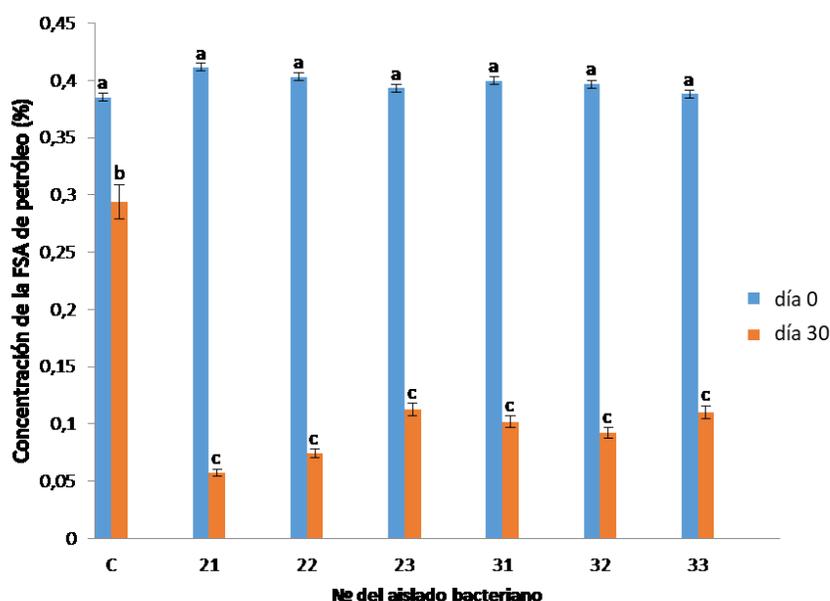


Fig. 5: Degradación de la fracción saturada y aromática del crudo. En azul el momento inicial y en naranja la medición realizada después de 30 días. Las barras representan el valor medio de tres determinaciones \pm desviación estándar. Las letras diferentes indican diferencias significativas, Tukey ($n=3$, $p<0,05$).

En los controles también se apreció una disminución de la FSA del petróleo el que fue significativamente inferior a los cultivos bacterianos. Esto puede ser debido a que, como se indicó anteriormente, el petróleo utilizado no fue previamente esterilizado y el mismo puede contener microorganismos con potencial degradativo. Por otro lado, puede existir una evaporación parcial de las fracciones ligeras. Tal fenómeno fue descrito por Tahhan *et al.* (2011), donde en la muestra control, el contenido de la fracción ligera disminuyó en 15%. Aun dados estos factores, en nuestro caso de estudio se aprecian diferencias significativas entre el control y todos los frascos inoculados con cada uno de los aislados bacterianos, siendo entre tres y cuatro veces menor en el medio sin inocular.

No todos los componentes del petróleo se metabolizan de igual manera. Los alcanos de cadena más corta y los aromáticos de menor peso molecular se degradan más fácilmente debido a que estos hidrocarburos más pequeños pueden transportarse a través de la membrana celular sin dificultad. Los alcanos de cadena más corta se hacen solubles en agua generalmente con ayuda de surfactantes producidos por los microorganismos. Las enzimas enlazadas a la membrana convierten el alcano en un alcohol. Las reacciones químicas posteriores catalizadas por otras enzimas convierten el alcohol a un aldehído y luego a un ácido orgánico referido como un ácido monocarboxílico (Iraji & Ayatollahi, 2019). La biología del metabolismo de alcanos de cadena corta es la más estudiada y mejor comprendida. Los hidrocarburos de mayor peso molecular son menos polares y más difíciles de transportar a través de la membrana celular. Aun cuando es sabido que la degradación de petróleo de alto peso molecular ocurre, este proceso es mucho más lento (Iraji & Ayatollahi, 2019). Algunos autores reportan que esta biodegradación puede tardar hasta 990 días para aquellos elementos con varios anillos aromáticos (Montenegro, 2007).

La fracción de alcanos saturados (n-alcanos) es el mayor constituyente del petróleo crudo y potencialmente la fuente de carbono y energía más abundante y disponible en el reservorio de petróleo. Las seis cepas en estudio, aisladas de un pozo de la Franja petrolífera norte cubana, poseen un gran potencial degradativo de la fracción saturada y aromática del petróleo, obteniéndose conjuntamente un 78 % de disminución de dicha fracción. Resultados similares fueron reportados por Fan *et al.* quienes evaluaron la degradación de esta fracción por la cepa *B. licheniformis* DM-1, prestando principal atención al catabolismo de las largas cadenas (C12-C36), durante 10 días de incubación en condiciones óptimas de crecimiento. Estos investigadores obtuvieron una degradación media de esta fracción por encima del 70%. Los mejores resultados los obtuvieron en la degradación de C18, la cual fue del 81,33%.

Concentración mínima inhibitoria de petróleo crudo en medio líquido

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la menor concentración de una sustancia que inhibe el crecimiento micorbio (Madigan *et al.*, 2019). Los resultados de la CMI del petróleo sobre el crecimiento de los aislados bacterianos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Concentración mínima inhibitoria del petróleo crudo en el crecimiento de las cepas autóctonas del yacimiento de petróleo cubano, después de 72 horas en medio mínimo UOM.

Concentración de petróleo	1%	2%	3%	4%	5%	10%	15%	20%	25%	30%	35%	40%
Aislados												
<i>B. subtilis</i> CC21	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>A. veronii</i> CC22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. subtilis</i> CC23	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i> CC31	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>B. subtilis</i> CC32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>B. licheniformis</i> CC33	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Luego de 72 horas de incubación en condiciones estáticas a 30 °C, el 100% de los aislados crecieron en concentraciones de hasta 20% v/v de petróleo crudo cubano. El 83% de las cepas lo hicieron en concentraciones de 25% v/v de crudo y en el 50% de los casos hubo turbidez a una concentración de 35% v/v de petróleo. La cepa *B. subtilis* CC23 mostró menor tolerancia a elevadas concentraciones de petróleo, mientras que los aislados *B. subtilis* CC21, *B. subtilis* CC32 y *B. licheniformis* CC33 mostraron la mayor capacidad de crecer en elevadas concentraciones de crudo. A una concentración de 40% v/v en ningún frasco se apreció turbidez demostrando que esta concentración era inhibitoria para el crecimiento microbio. Para todas las concentraciones de petróleo evaluadas en el control no se apreció turbidez del medio.

El petróleo posee en su composición sustancias que son tóxicas para los seres vivos ya que se incorporan a las membranas celulares e impiden el correcto funcionamiento de las células (Zaira *et al.*, 2016). Entre estos compuestos podemos mencionar los hidrocarburos aromáticos, las fracciones pesadas del crudo, los metales pesados asociados a cadenas hidrocarbonadas, etc. Es por ello que resulta de interés conocer la resistencia de las cepas en estudio a elevadas concentraciones de petróleo crudo. Kamal *et al.* (2015), estudiaron el efecto de la concentración de gasolina sobre el crecimiento celular de una cepa de *Aeromonas salmonicida*. Estos investigadores encontraron que la CMI a gasolina de la cepa evaluada era de 2% v/v. Vázquez-Luna *et al.* (2011), evaluaron el impacto del petróleo crudo sobre el crecimiento de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en un suelo contaminado con cinco concentraciones de petróleo (1,2; 3,5; 10; 20 y 40 %). Los resultados de este estudio arrojaron que a la máxima concentración de petróleo evaluada existió un conteo considerablemente alto de UFC, sugiriendo que algunos microorganismos incrementan su población en presencia de hidrocarburos.

La elevada tolerancia de las cepas aisladas a altas concentraciones del crudo y su capacidad de crecimiento a expensas de él como única fuente de carbono y energía demuestra su resistencia ante los efectos tóxicos que puede causar el mismo. Esta característica es indispensable para la utilización de las cepas en los procesos de MEOR. Además, este hecho las convierte en buenas candidatas para ser evaluadas en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con petróleo.

Formación de biopelículas

Determinar la capacidad de generación de biopelículas por parte de los aislados resulta una característica de interés, ya que su producción desempeña un papel importante en los procesos de MEOR (López-Peña *et al.*, 2019). El crecimiento de las seis cepas en estudio en los tres caldos utilizados LB, UOM y M9, se muestran en la figura 6. Para todas las cepas y condiciones estudiadas las absorbancias a $\lambda = 620$ nm obtenidas en los caldos inoculados fueron superiores a las observadas en los pocillos control, indicando que todas las cepas crecieron en los tres medios de cultivo utilizados. Asimismo, las DO_{620nm} fueron menores en los caldos mínimos (UOM y M9) que en el medio rico (LB) para todas las cepas, lo cual se sustenta en el hecho de que el último medio es complejo, con factores de crecimiento, por lo que la velocidad de crecimiento es mayor. Estos resultados se corresponden con los informados por Faleiro (2010), quien analizó el comportamiento de cuatro cepas de *E. coli* en cuatro medios de cultivos (dos complejos y dos mínimos).

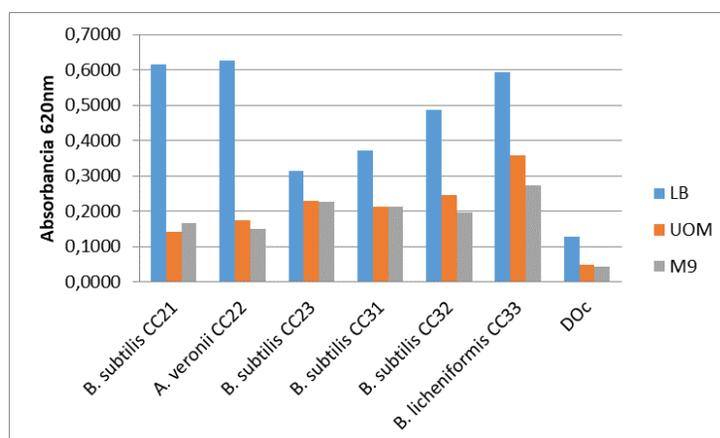


Fig. 6: Valores de absorbancia de los cultivos de las cepas y de los pocillos control en los diferentes medios. DOC: DO a 620nm en los pocillos control no inoculados.

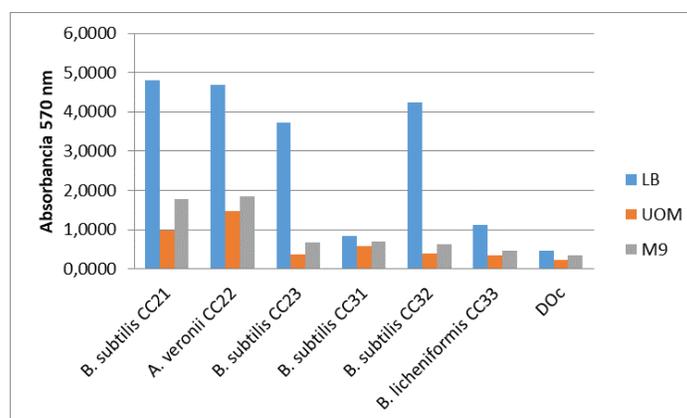


Fig. 7: Absorbancia a 570 nm de bacterias adheridas de las seis cepas aisladas de crudo cubano y de los pocillos control teñidos con cristal violeta en las distintas condiciones evaluadas. DOC: DO a 570 nm en los pocillos control no inoculados.

En la figura 7 se muestran las DO a 570 nm alcanzadas por las seis cepas estudiadas. Esta medición demuestra la adhesión bacteriana a los pocillos ya que fue realizada después de la tinción con cristal violeta y luego de varios lavados sucesivos. Se obtuvieron diversos valores de absorbancia dependiendo de la cepa y caldo de cultivo. En general, todas las cepas obtuvieron densidades más altas en el caldo rico y todas las condiciones evaluadas fueron superiores a las lecturas de DO en los pocillos control. *B. subtilis* CC31 y *B. licheniformis* CC33 fueron las cepas que mostraron menor absorbancia a 570 nm, demostrando su menor adherencia. No se encontraron diferencias significativas entre la cantidad de células adheridas en los medios mínimos, pero sí entre estos y el caldo LB.

En la mayoría de los estudios, la formación de biopelículas por diferentes especies de microorganismos es estimada por las absorbancias obtenidas después de la tinción de las bacterias adheridas con cristal violeta u otros colorantes que indican la biomasa total. El cristal violeta es un colorante básico que se une a moléculas superficiales cargadas negativamente y a polisacáridos en la matriz celular, por lo que da una medida de la cantidad de células viables y no viables (Rondeau *et al.*, 2019; Peeters *et al.*, 2008).

Los valores de DO a 630 nm y DO a 570 nm se utilizaron para determinar la capacidad de formación de biopelícula por medio de tres fórmulas diferentes. Los valores obtenidos se distribuyeron en cuartiles para clasificar semicuantitativamente la capacidad de formación de biopelícula en cuatro categorías: Fuerte (F), Moderada (M), Débil (D) y No formadora (N). Los criterios de clasificación que se siguieron están acordes a los descritos por Faleiro (2010), y que muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Criterio de clasificación semicuantitativa de la capacidad de formación de biopelícula en cuatro categorías utilizando tres fórmulas diferentes (Faleiro, 2010).

Fórmula	Fuerte (F)	Moderada (M)	Débil (D)	No formadora (N)
FB1 (2)	$\geq 0,3$	0,2 – 0,29	0,1 – 0,19	$< 0,1$
FB2 (3)	$\geq 6,1$	4,1 – 6,0	2,0 – 4,0	$< 2,0$
FBE (4)	$\geq 1,1$	0,7 – 1,09	0,35 – 0,69	$< 0,35$

La capacidad de las seis cepas estudiadas para formar biopelículas bajo las diferentes condiciones experimentales probadas está expuesta en la tabla 5.

Teniendo en cuenta los tres caldos de cultivos evaluados y las tres fórmulas empleadas, se obtuvieron 9 resultados por cada cepa. El tratamiento de las densidades ópticas obtenidas con diferentes fórmulas matemáticas es un importante factor a considerar ya que, como es el caso de este estudio, es posible encontrar discordancias en la clasificación de la capacidad de formación de biopelícula entre las tres fórmulas utilizadas. Se considera que la fórmula que permite obtener el índice FEB es la más adecuada ya que contempla todas las variables del sistema: los valores de las densidades ópticas de las bacterias adheridas y teñidas, de los pocillos control no inoculados que tienen en cuenta los factores inespecíficos, como tinción del material abiótico o precipitaciones del colorante y las densidades ópticas alcanzadas por el crecimiento bacteriano (Faleiro, 2010).

Según los resultados obtenidos en la presente investigación, en el medio rico empleado (LB) todas las cepas fueron formadoras de biopelículas excepto el aislado *B. subtilis* CC31, no obstante, este sí mostró su formación en los medios mínimos evaluados. Las mayores variaciones se encuentran en la formación en los medios mínimos, sin embargo, si se considera la ecuación FEB todas las cepas fueron formadoras de la estructura biológica. Los aislados *B. subtilis* CC21 y *A. veronii* CC22 mostraron los mejores resultados en los tres caldos de cultivo catalogándose como fuertemente formadoras de biopelículas en todas las condiciones evaluadas. Estos resultados coinciden con los reportados en la literatura, donde ha sido ampliamente descrito la formación de biopelículas por cepas de *B. subtilis* (Páramo *et al.*, 2015; Cairns *et al.*, 2014) y *A. veronii* (Triyitno & Murwantoko, 2020; Dias *et al.*, 2018).

Tabla 5: Categorías de formación de biopelícula por las cepas en estudio. F: Cepa fuertemente formadora; M: moderadamente formadora; D: débilmente formadora; N: no formadora.

Fórmula	<i>B. subtilis</i> CC21	<i>A. veronii</i> CC22	<i>B. subtilis</i> CC23	<i>B. subtilis</i> CC31	<i>B. subtilis</i> CC32	<i>B. licheniformis</i> CC33
LB						
FB1	(F) 4,1366	(F) 4,0307	(F) 3,0725	(D) 0,1757	(F) 3,5749	(F) 0,4530
FB2	(F) 7,2311	(F) 7,0715	(M) 5,6281	(N) 1,2646	(D) 6,3849	(N) 1,6823
FEB	(F) 21,363	(F) 20,816	(F) 15,867	(N) 0,9072	(F) 18,462	(F) 2,3393
UOM						
FB1	(F) 0,7471	(F) 1,2493	(D) 0,1418	(M) 0,3554	(D) 0,1722	(D) 0,1278
FB2	(M) 4,2754	(F) 6,4768	(N) 1,6216	(D) 2,5580	(N) 1,7549	(N) 1,5601
FEB	(F) 15,829	(F) 26,467	(F) 3,0042	(F) 7,5296	(F) 3,6483	(F) 2,7069
M9						
FB1	(F) 1,4341	(F) ,4992	(F) 0,3396	(F) 0,3477	(M) 0,2862	(D) 0,1271
FB2	(M) 5,1991	(M) 5,389	(N) 1,9942	(D) 2,0179	(N) 1,8380	(N) 1,3721
FEB	(F) 33,691	(F) 35,22	(F) 7,9772	(F) 8,1675	(F) 6,7243	(F) 2,9859

No se ha establecido un medio de cultivo estandarizado para los estudios de biopelículas, por lo que diferencias en la metodología influyen en el comportamiento de las cepas evaluadas (Chen *et al.*, 2020). En el presente estudio la formación de biopelículas fue significativamente mayor en el medio de cultivo rico. Sin embargo, este aspecto es controversial y otros autores han descrito que tanto la adherencia bacteriana como la formación de biopelículas son estimuladas en condiciones de escasez de nutrientes en el medio (Chen *et al.*, 2020; Reisner *et al.*, 2006). Eze & El Zowalaty (2019), encontraron una notable variación en la adherencia de los aislados cultivados en medio mínimo y rico, lo que también estuvo influenciado por la temperatura. En otra investigación Perera *et al.* (2019), evaluaron la degradación de hexadecano y la formación de biopelículas formadas por un hongo y una bacteria. El ensayo se llevó a cabo en un medio mínimo por 14 días, demostrándose la eficiencia del tratamiento con biopelículas y la proliferación de las mismas en el medio de cultivo mínimo.

El medio poroso de un yacimiento de petróleo es una extensa superficie que provoca mucho contacto con la misma durante el transporte de componentes. En un proceso de MEOR los microorganismos penetran en el reservorio, a la vez que consumen sustratos y producen importantes metabolitos. Los mecanismos de MEOR más importantes en los que se ha descrito la influencia de las biopelículas son los siguientes: desvío de fluidos debido al crecimiento microbiano y a la producción de biopolímeros (taponamiento selectivo); reducción de la tensión interfacial y alteración de la mojabilidad debido a la producción *in situ* de biotensoactivos y acumulación del mismo en la vecindad de la biopelícula (Nikolova & Gutierrez, 2020; Nielsen, 2010). Debido a los efectos descritos, son notables las ventajas de contar con cepas formadoras de biopelículas en el diseño de procesos de MEOR, aun cuando estas deben ser controladas ya que un aumento excesivo de la biomasa puede causar daños a la formación (Jaimes *et al.*, 2019).

CONCLUSIONES

A partir de un petróleo crudo de la Franja petrolífera norte cubana se aislaron 6 cepas bacterianas, las cuales se identificaron como *Bacillus subtilis* (4 de ellas); una como *Bacillus licheniformis* y otra como *Aeromonas veronii*. Se evidenció que las cepas degradan hidrocarburos desde moléculas más simples como el glicerol y la parafina, hasta fracciones complejas como la gasolina, diésel, keroseno y el propio petróleo crudo. Todas las cepas crecieron en presencia en el medio de hasta 20% de crudo, mientras que la concentración mínima inhibitoria del crecimiento para *B. subtilis* CC21, *B. subtilis* CC32 y *B. licheniformis* CC33 fue de 35%. Además, se comprobó que los microorganismos estudiados son formadores de biopelículas. Todas estas características le confieren a los aislados bacterianos potencialidades para su utilización en procesos de MEOR y biorremediación de ecosistemas impactados con hidrocarburos.

REFERENCIAS

- Al-Dhabaan, F.A. (2019). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia Saudi. *Journal of Biological Sciences*, 26, 1247–1252. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2018.05.029>.
- Alonso, R. (2010). *Biodesulfuración de fracciones petrolíferas con Pseudomonas putida CECT5279: optimización del proceso*. PhD. Thesis. Facultad de Química, Universidad de Alcalá, España. <https://ebuah.uah.es/dspace/handle/10017/9701>
- Álvarez-Mejía, C., Aguirre-Gómez, E., Navarro-Garrido, A. & López-Ramírez, V. (2016). Degradación microbiana de gasolina en suelos agrícolas de Pueblo Nuevo, Guanajuato. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 3-8, 24-32.
- Andrade, M. & Ayala, D. (2017). Factibilidad analítica de la aplicación de la recuperación mejorada de petróleo, caso de estudio ecuador. *El Reventón Energético*, 5(2), 19-30. doi: <http://dx.doi.org/10.18273/revfue.v15n2-2017002>.
- ASTM D1298-99 (1999). *Standard Test Method for Density, Relative Density (Specific Gravity), or API Gravity of Crude Petroleum and Liquid Petroleum Products by Hydrometer Method*, ASTM International, West Conshohocken, PA. www.astm.org.
- ASTM D1552-08 (2008). *Standard Test Method for Sulfur in Petroleum Products (High-Temperature Method)*, ASTM International, West Conshohocken, PA. www.astm.org.
- ASTM D287-12b (2012). *Standard Test Method for API Gravity of Crude Petroleum and Petroleum Products (Hydrometer Method)*, ASTM International, West Conshohocken, PA. www.astm.org.
- ASTM D4007-81 (1995)e1. *Standard Test Method for Water and Sediment in Crude Oil by the Centrifuge Method (Laboratory Procedure)*, ASTM International, West Conshohocken, PA. www.astm.org.
- ASTM D4124-09 (2018). *Standard Test Method for Separation of Asphalt into Four Fractions*, ASTM International, West Conshohocken, PA. www.astm.org.
- ASTM D4530-11 (2011). *Standard Test Method for Determination of Carbon Residue (Micro Method)*, ASTM International, West Conshohocken, PA. www.astm.org.
- ASTM D473-07 (2017)e1. *Standard Test Method for Sediment in Crude Oils and Fuel Oils by the Extraction Method*, ASTM International, West Conshohocken, PA. www.astm.org.
- ASTM D6560-17 (2017). *Standard Test Method for Determination of Asphaltenes (Heptane Insolubles) in Crude Petroleum and Petroleum Products*, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2017. www.astm.org.
- Cairns, L.S., Hopley, L. & Stanley-Wall, N.R. (2014). Biofilm formation by *Bacillus subtilis*. new insights into regulatory strategies and assembly mechanisms. *Molecular Microbiology*, 93 (4), 587–598. doi: <http://doi.org/10.1111/mmi.12697>.
- Chen, X., Rolighed, T., Winkler, H., & Xu, Y. (2020). Influence of biofilm growth age, media, antibiotic concentration and exposure time on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm removal *in vitro*. *BMC Microbiology*, doi: <http://doi.org/10.21203/rs.3.rs-20023/v2>.
- CI-GC / P 20 07 (2017). *Determinación de la viscosidad en el equipo Phisycá MCR-301 Antom Paar*. Procedimiento interno. Laboratorio de Física de Yacimiento, Centro de Investigación del Petróleo, La Habana, Cuba.
- Cui, K., Zhang, Z., Zhang, Z., Sun, S., Li, H. & Fu, P. (2019). Stimulation of indigenous microbes by optimizing the water cut in low permeability reservoirs for green and enhanced oil recovery. *Scientific Reports*, 9, 15772. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52330-2>.

- Dias, C., Borges, A., Saavedra, M.J. & Simões, M. (2018). Biofilm formation and multidrug-resistant *Aeromonas* spp. from wild animals. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 12, 227-234. ISSN 2213-7165.
- Dur-E-Shahwar, Sheikh, R.A. & Jamil, N. (2019). Isolation and Characterization of Biosurfactant Producing Bacteria Isolated from Produced Water. *Punjab Univ. J. Zool.*, 34 (1), 35-40. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.pujz/2019.34.1.35.40>.
- Eze, E.C. & El Zowalaty, M.E. (2019). Combined effects of low incubation temperature, minimal growth medium, and low hydrodynamics optimize *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3523–3536.
- Faleiro, P.L. (2010). *Formación de biopelículas por "Escherichia coli" y su correlación con factores de virulencia: prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas*. PhD. Thesis, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, España. ISBN: 978-84-692-8575-6. <https://eprints.ucm.es/9780/>.
- Fan, Y., Wang, J., Gao, Ch., Zhang, Y., & Wen Du, W. (2020). A novel exopolysaccharide producing and long-chain n-alkane degrading bacterium *Bacillus licheniformis* strain DM-1 with potential application for *in-situ* enhanced oil recovery. *Scientific Reports*, 10, 8519. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65432-z>.
- Goveas, L., Krishna, A., Salian, A., Menezes, J., Alva, M., Basavapattan, B. *et al.* (2020). Isolation and Characterization of Bacteria from Refinery Effluent for Degradation of Petroleum Crude Oil in Seawater. *J. Pure Appl. Microbiol.*, 14 (1), 473-484.
- Hamzah, A.F., Al-Tamimi, W.H., Mahdi, S.S. & Alameri, N.Z. (2020). Isolation and identification new bacterial strains isolated from different sources of Al-Rafidiyah oil field in Iraq. *CATRINA*, 21 (1), 15-22.
- Hernández, M.A., Ojeda, U.M. & Martínez, A. (2019). Recuperación Mejorada de Petróleo Asistida por Microorganismos con Capacidad de Sintetizar Biosurfactantes. *Journal of Basic Sciences*, 5 (15), 58-81.
- Iraji, S. & Ayatollahi, S. (2019). Experimental investigation on asphaltene biodegradability using microorganism: cell surface properties' approach. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 9, 1413–1422. doi: <https://doi.org/10.1007/s13202-018-0537-1>.
- Jahanbani, V., Ganji, A., Deihimi, T., Niazi, A. & Ayatollahi, S. (2019). Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactant characterization, production optimization and wetting effect on carbonate surfaces. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 9, 233–245. doi: <https://doi.org/10.1007/s13202-018-0457-0>.
- Jaimés, M.G., Escobar, M.A. & Torres, R.G. (2019). Experimental Design for Evaluation of Formation Damage by Microbial Contamination in Water Flooding Processes. A Colombian Study Case. *Revista Fuentes: El reventón energético*, 17(2), 7-17. doi: <http://dx.doi.org/10.18273/revfue.v17n2-2019001>.
- Kamal, I., Blaghen, M., Lahlou, F.Z. & Hammoumi, A. (2015). Evaluation of biosurfactant production by *Aeromonas salmonicida* sp. degrading gasoline. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.*, 3, 89-95.
- Linares, E.C., García D.D., Delgado, O.L. López., J.G. & Strazhevich, V. (2011). *Yacimientos y manifestaciones de hidrocarburos de la República de Cuba*. p. 53. 1ª ed. La Habana: Palcograf.
- Lipus, D., Vikram, A., Ross, D., Bain, D., Gulliver, D., Hammack, R. *et al.* (2017). Predominance and metabolic potential of *Halanaerobium* spp. in produced water from hydraulically fractured Marcellus Shale wells. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83 (8), 1-15. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.02659-16>.
- Lopez-Peña, L.A., Meulenbroek, B. & Vermolen, F. (2019). A network model for the biofilm growth in porous media and its effects on permeability and porosity. *Comput. Visual Sci.* 21, 11–22. <https://doi.org/10.1007/s00791-019-00316-y>

- Madigan, M.T., Bender, K.S., Buckley, D.H., Sattley, W.M. & Stahl, D.A. (2019). *Brock Biology of Microorganisms*. p. 118: Prentice Hall, New Jersey.
- Moein, J.V., Ehsan, G.A., Tahereh, D., Ali, N. & Shahab, A. (2019). Isolation and screening of *Bacillus subtilis* MJ01 for MEOR application: biosurfactant characterization, production optimization and wetting effect on carbonate surfaces. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 9, 233–245. doi: <https://doi.org/10.1007/s13202-018-0457-0>.
- Montenegro, F. (2007). *Aislamiento y selección de cepas bacterianas nativas de suelos de la XII región de Chile, para la degradación de crudos de petróleo*. MS.C. Thesis. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2007/fam777a/doc/fam777a.pdf>.
- Nielsen, S.M. (2010). *Microbial Enhanced Oil Recovery - Advanced Reservoir Simulation*. PhD. Thesis, Kgs. Lyngby, Denmark: Technical University of Denmark (DTU). https://backend.orbit.dtu.dk/ws/portalfiles/portal/5455607/61126_Sidsel+Marie+Nielsen_.pdf.
- Nikolova, C. & Gutierrez, T. (2020). Use of Microorganisms in the Recovery of Oil From Recalcitrant Oil Reservoirs: Current State of Knowledge, Technological Advances and Future Perspectives. *Front. Microbiol.* 10, 2996. doi: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02996>.
- Ortega, L., Rodríguez, S., Fernández, E. & Bárcenas, L. (2015). Principales métodos para la desulfurización del biogás. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*, 36 (1), 45-56.
- Paramo, L., Narváez, A. & Morales, J. (2015). La bioprecipitación de carbonato de calcio por la biota nativa como un método de restauración. *Nexo Revista Científica*, 28 (01), 25-40. doi: <http://doi.org/10.5377/nexo.v28i01.1779>.
- Parthipan, P., Preetham, E., Machuca, L.L., Rahman, P., Murugan, K. & Rajasekar A (2017). Biosurfactant and Degradative Enzymes Mediated Crude Oil Degradation by Bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Front. Microbiol.*, 8, 193. doi: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00193>.
- Pazo, C.A., Fernández, L.E., Negrín, J.G. & Rondón, W.M. (2018). Desarrollo de una metodología de análisis de compuestos azufrados en gasóleo de vacío (VGO) por cromatografía de gases acoplado a detector específico de azufre por quimioluminiscencia. *Catálisis*, 7, 1-14. <https://www.researchgate.net/publication/333635025>.
- Peeters, E., Nelis, H. J. & Coenye, T. (2008). Comparisons of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbial Methods*, 72, 157-165.
- Perera, M., Wijayarathna, D., Wijesundera, S., Chinthaka, M., Seneviratne, G., & Jayasena, S. (2019). Biofilm mediated synergistic degradation of hexadecane by a naturally formed community comprising *Aspergillus flavus* complex and *Bacillus cereus* group. *BMC Microbiology*, 19, 84. doi: <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1460-4>.
- PND F 14.1:2:4.5-95 (2011). *Análisis químico cuantitativo de aguas. Métodos para medir la concentración másica de productos petrolíferos en aguas potables, superficiales y residuales mediante espectrometría IR*. Rusia. https://standartgost.ru/g/%D0%9F%D0%9D%D0%94_%D0%A4_14.1:2:4.5-95.
- Rathi, V. & Yadav, V. (2019). Oil Degradation Taking Microbial Help and Bioremediation: A Review. *J. Bioremediat. Biodegrad.* 10 (2), 1000460.
- Reisner, A., Krogfelt, K.A., Klein, B.M., Zechner, E.L. & Molin, S. (2006). *In vivo* biofilm formation of commensal and pathogenic *Escherichia coli* strains: Impact of environmental and genetic factors. *J. Bacteriol.*, 188, 3572-3581.
- Rondeau, M., Esmaeel, Q., Crouzet, J., Blin, P., Gosselin, I., Sarazin, C. *et al.* (2019). Biofilm-constructing variants of *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN outcompete the wild-type form in free-living and static conditions but not *in planta*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85, e02670-18. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.02670-18>.

- Sahar, S.M., Manal, S.S., Manal G.M., Abeer, Y.I. & Eman, A.G. (2019). Production, characterization, and antioxidant activities of bacterial exopolysaccharides extracted from petroleum oil water. *Egypt Pharmaceut. J.*, 18, 42–52. doi: https://doi.org/10.4103/epj.epj_36_18.
- She, H., Kong, D., Li, Y., Hu, Z. & Guo, H. (2019). Recent Advance of Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) in China. *Geofluids*, 2019: 1-16. doi: <https://doi.org/10.1155/2019/1871392>.
- Sierra-García, I.N., Belgini, R.B., Torres-Ballesteros, A., Paez-Espino, D., Capilla, R., Santos E.V. *et al.* (2020). In depth metagenomic analysis in contrasting oil wells reveals syntrophic bacterial and archeal associations for oil biodegradation in petroleum reservoirs. *Science of the Total Environment*, 715, 136646. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136646>.
- Sohail, R. & Jamil, N. (2020). Isolation of biosurfactant producing bacteria from Potwar oil fields. *Green Process Synth.*, 9, 77–86. doi: <https://doi.org/10.1515/gps-2020-0009>.
- Tahhan, R., Ammari, T., Goussous, J. & Al-Shdaifat, I. (2011). Enhancing the biodegradation of total petroleum hydrocarbons in oily sludge by a modified bioaugmentation strategy. *Int. Biodet. Biodeg*, 65, 130-134.
- Triyitno & Murwantoko, M. (2020). Quorum Sensing Inhibition Activity of Water Extract of Rhizome Herbs on *Aeromonas hydrophila*. *E3S Web of Conferences*, 147, 01012. doi: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014701012>.
- Varjani, S., Srivastava, V.K., Sindhu, R., Thakur, I.S. & Gnansounou, E. (2018). Culture based approaches, dependent and independent, for microbial community in petroleum oil reservoirs. *Indian Journal of Experimental Biology*, 56, 444-450.
- Vázquez-Luna, M., Montiel-Flores, A., Vázquez-Luna, D. & Herrera-Tenorio, M.F. (2011). Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, 511 – 523.
- Veana, F., González-Purata, P.Y., Wong-Paz, J.E., Aguilar-Zárate, P. & Muñoz-Marquez, D.B. (2019). Tendencias de la bioenergía: del metagenoma de hábitats ricos en azufre a la purificación del biogás. *TIP Rev. Esp. Cienc. Quím. Biol.*, 22, 1-11. doi: <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2019.0.190>.
- Wang, D., Lin, J., Lin, J., Wang, W. & Li, S. (2019). Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by *Bacillus subtilis* BL-27, a Strain with Weak Hydrophobicity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24 (17), 3021. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules24173021>.
- Winther, A. & Magerholm, A.F. (2016). *Sustainability Strategies in the Oil and Gas Industry*. p. 162: Norwegian Petroleum Academy AS, Norway. ISBN: 978-82-315-0064-3.
- Xiao M., Sun, S.S., Zang, Z.Z, Wang, J.M., Qiu, L.W., & Sun, H.Y. (2016). Analysis of bacterial diversity in two oil blocks from two lower permeability reservoirs with high salinities. *Scientific Reports*, 6 (19600), 1-10. doi: <http://www.dx.doi.org/10.1038/srep19600>.
- Zaira, M.M., Blázquez, B., Baraquet, C., Harwood, C.S., Zamorro, M.T. & Díaz, E. (2016). Degradation of cyclic diguanosine monophosphate by a hybrid two-component protein protects *Azoarcus* sp. CIB from toluene toxicity. *PNAS*, 113 (46), 13174-13179. doi: <http://www.dx.doi.org/10.1073/pnas.1615981113>.

