

Perfil degradativo sobre hidrocarburos de petróleo e identificación molecular de cepas bacterianas aisladas de la base peruana "Machu Picchu" en la Antártida

Degradative profile on petroleum hydrocarbon and molecular identification of bacterial strains isolated from the Peruvian base "Machu Picchu" in Antarctica

Fernando Merino Rafael^{1,2}, Diandra Martínez Cano¹ y Susana Gutiérrez Moreno¹
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

RESUMEN

La Antártida es un ecosistema altamente vulnerable. Debido al tránsito marítimo en este continente, la amenaza de algún derrame de hidrocarburos es latente. Ante esta problemática la técnica más ecoamigable es la biorremediación. Por lo cual la presente investigación se basa en la caracterización del perfil degradativo de hidrocarburos de cepas bacterianas aisladas de la Antártida para obtener potenciales consorcios que se puedan aplicarse para solucionar posibles derrames de hidrocarburos. En este estudio se trabajó con 211 cepas de las cuales 43 presentaron actividad degradativa sobre hidrocarburos. De las 43 cepas el 63% (27 cepas) degradó crudo de petróleo, el 44% (19 cepas) degradó borra, el 42% (18 cepas) degradó parafina y el 37% (16 cepas) degradó gasolina de 84 octanos. Con respecto al número de fracciones degradadas el 16% (7 cepas) degradó 3 fracciones y el 9% (4 cepas) pudo degradar las 4 fracciones. Estas 11 cepas al degradar 3 o 4 de las 4 fracciones, fueron identificadas molecularmente; las cepas 9A2, 79Af1, 39B1, 60Bf2, 9A1 y 63B2 se identificaron como *Pseudomonas putida*; la cepa 63B1 se identificó como *Pseudomonas aeruginosa*; en tanto la cepa 79Af2 se identificó como *Lysinibacillus* sp.; la 39B2 como *Aeromonas* sp.; la 95f como *Paenibacillus lautus* y finalmente la cepa 116B como *Stenotrophomonas rhizophila*.

PALABRAS CLAVE: Degradadores de petróleo, bacterias psicrófilas, fracciones de petróleo, Antártida.

ABSTRACT

Antarctica is a highly vulnerable ecosystem. Due to the maritime traffic on this continent the threat of any oil spill is latent. Faced with this problem the bioremediation is the more supported technique. So this research is based on the characterization of the degradative profile of isolated bacterial strains of Antarctica to obtain potential consortia that can be applied to solve possible oil spills. In this study, we worked with 211 strains of which 43 had degradative-hydrocarbon activity. Of the 43 strains 63% (27 strains) degraded crude oil, 44% (19 strains) degraded vacuum residuum, 42% (18 strains) degraded paraffin and 37% (16 strains) degraded 84-octane gasoline. Regarding the number of fractions degraded 16% (7 strains) degraded 3 fractions and 9% (4 strains) could degrade the 4 fractions. These 11 strains to degrade 3 or 4 of the 4 fractions were identified molecularly: 9A2, 79Af1, 39B1, 60Bf2, 9A1 and 63B2 were identified as *Pseudomonas putida*; 63B1 was identified as *Pseudomonas aeruginosa*; 79Af2 as *Lysinibacillus* sp.; 39B2 as *Aeromonas* sp.; 95f as *Paenibacillus lautus* and 116B as *Stenotrophomonas rhizophila*.

KEYWORDS: Oil degraders, psychrophilic bacteria, petroleum fractions, Antarctica.

Recibido: 16/07/2015

Aprobado: 11/09/2015

1 Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas, UNMSM.
2 <abilio1007@gmail.com>

Introducción

La Antártida considerada el continente más remoto y frío de la Tierra, presenta la corriente oceánica más grande impulsada por el viento, la mayor variación estacional y el mayor número de especies endémicas; además, contiene casi el 80% del agua dulce del mundo y al mismo tiempo es considerado el desierto más frío en la Tierra. Por sus características y su sensibilidad climática a los cambios globales Bargagli et al. (2006) y Rogers et al. (2012) consideran a este continente un importante laboratorio natural para obtener información básica sobre el impacto de la actividad antropogénica en los ecosistemas polares. Entendiendo así que su preservación dependerá de cuánto se conozca e investigue sobre este ecosistema para así tener las herramientas propicias que concreten soluciones a los problemas que se puedan presentar.

Uno de los problemas globales que potencialmente podría afectar en gran magnitud a la Antártida son los derrames de hidrocarburos. Eckle y otros (2012) manifiestan que la data mundial entre 1974 y 2010 contiene un registro de 1213 derrames de petróleo en todo el mundo de más de 200 toneladas cada uno, de los cuales 888 derrames fueron ocasionados por embarcaciones. En este sentido la Antártida no es ajena a estos accidentes pues ya han habido derrames de hidrocarburos bien documentados en este lugar Cripps y Priddle (1991) y Aislabe et al. (2004).

Lastimosamente, dichos antecedentes confirman la poca resiliencia que presenta este ecosistema al no contar con la suficiente capacidad como para afrontar los pequeños derrames ya producidos pues lo que sucede con los hidrocarburos es que se alojan en el sedimento marino o en ciertos estratos de la capa de hielo Polmear y otros (2015) mas no llegan a ser degradados. Entendiéndose que ante problemas de este tipo, pero de gran

magnitud, los efectos llegarían a ser devastadores para el ecosistema antártico.

Cripps y Priddle (1991) sostienen que el ecosistema marino antártico contiene baja concentración de hidrocarburos, y que gran parte de ellos tienen un origen biogénico. Los bajos niveles naturales de hidrocarburos y la pequeña cantidad de actividad antropogénica local, hacen que el ecosistema marino antártico sea adecuado como referencia para evaluar la contaminación por hidrocarburos a nivel global. En la actualidad, la contaminación es muy baja y difícil de resolver. Pues la contaminación local se limita a muy pocos eventos generalmente derrames por transporte marítimo.

Debido a la latente amenaza de algún posible derrame de hidrocarburos muchos estudios han optado por proyectar soluciones a través de la biorremediación aplicando organismos como plantas, hongos y bacterias. Con respecto a la fitorremediación las investigaciones describen plantas con potencial uso en este campo, como Bramley-Alves et al. (2014) que demuestran el potencial de la hierba nativa sub-antártica *Poa foliosa* de la Isla Macquarie junto a las comunidades microbianas asociadas a la tierra para degradar combustible SAB (*Special Antarctic Blend*).

Por otro lado, en procesos de biorremediación usando hongos se han descrito en especial hongos filamentosos con capacidad degradativa. Hughes y otros (2007) describen algunas cepas aisladas de la Base Rothera, de tierra previamente impactada con hidrocarburos donde demuestra que el crecimiento de las hifas de dichos hongos se comportan muy diferente entre diversos tipos de hidrocarburos. Describe que la tasa de extensión de las hifas se redujo más en presencia de los hidrocarburos aromáticos que alifáticos. Además, propone a *Mortierella* sp. como cepa de potencial uso en biorremediación.

Sin embargo, la biorremediación usando bacterias es la más estudiada debido a

la ubicua capacidad que éstas tienen para degradar hidrocarburos de petróleo según Atlas (1995) y porque presentan una mayor interacción con los hidrocarburos, debido a la permanencia de éstos en el sedimento bacteriano, según lo reportado por Dilille y Dilille (2000). Aunque normalmente las bacterias que degradan hidrocarburos se reproducen a una temperatura entre 20 y 30 grados en ambientes extremos como la Antártida, existen microorganismos que están perfectamente adaptados a temperaturas inferiores a los 0°C, a la pobreza de nutrientes y a la presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono mostrando al mismo tiempo un alto dinamismo degradativo como comunidad bacteriana de acuerdo con Vázquez et al. (2009).

El Protocolo de Madrid, que establece normas de preservación ambiental del continente helado, prohíbe introducir bacterias o cualquier microorganismo a este continente; obligando a utilizar bacterias autóctonas para su remediación. Debido a estos acuerdos existen investigadores como Stallwood et al. (2005) y Delille et al. (2004) que viran al uso de la bioestimulación y bioaumentación de ciertos géneros bacterianos específicos. Pero, la necesidad de prevención exige contar con bancos de cepas aisladas y caracterizadas provenientes de este continente, además de la realización de ensayos pilotos para su correcta aplicación. Afortunadamente, las investigaciones que describen cierta diversidad de cepas bacterianas con actividad degradativa e investigaciones que confirman la presencia de una gran cantidad y diversidad de genes involucrados en la degradación de hidrocarburos en muestras provenientes de la Antártida como las de Muangchinda et al. (2014) muestran gran potencial y futuro para las investigaciones en este campo.

Para la búsqueda de cepas potenciales, un factor importante a considerar es la zona de muestreo; por eso, el muestreo de esta investigación se realizó en la base peruana Machu

Picchu en la Antártida. Esta zona no presenta antecedentes de derrames; aún así, existe la posibilidad de encontrar cepas con actividad degradadora de hidrocarburos debido a la conocida totipotenciabilidad metabólica microbiana. Atlas (1981) sostiene que existe una probabilidad menor al 0.1% de encontrar microorganismos que puedan degradar hidrocarburos en cualquier ecosistema que no haya sido contaminado por estos; por otro lado, el porcentaje de microorganismos degradadores posibles en un ambiente contaminado por hidrocarburos constituye hasta un 100% de los microorganismos viables del ecosistema, dicho porcentaje refleja el grado a la exposición de este ecosistema a los hidrocarburos y la selección natural que estos producen tal como lo manifiestan Cripps y Priddle (1991).

Es importante además de contar con cepas degradadoras de hidrocarburos, el determinar el tipo de hidrocarburo de petróleo que degradan. Debido a que el petróleo es una mezcla extremadamente compleja de hidrocarburos formada por cientos de componentes los cuales varían dependiendo de la naturaleza de su formación. La mezcla de petróleo puede ser fraccionada en: fracción saturada o alifática, fracción aromática y fracción asfáltica o polar. Para investigaciones del perfil degradativo es necesario enfrentar a las cepas tanto con el crudo de petróleo que contiene una gran mezcla de hidrocarburos como con todas las fracciones posibles para describir de mejor manera la capacidad degradativa de cada cepa.

En esta investigación se busca estudiar la presencia de bacterias con capacidad degradativa sobre hidrocarburos en la base peruana "Machu Picchu" en la Antártida e identificar molecularmente las cepas que presentan mejor perfil degradativo sobre hidrocarburos de petróleo para construir consorcios aplicables en procesos de biorremediación en la Antártida y en ambientes de baja temperatura.

Materiales y métodos

Localización de la zona de muestreo

La zona de muestreo se ubicó en la base científica peruana "Machu Picchu" ubicada en la Ensenada Mackellar, Bahía del almirantazgo - Isla Rey Jorge en la Antártida. El muestreo se desarrolló durante el Plan de Monitoreo Ambiental en la temporada de verano 2006-2007.

El muestreo se realizó en 11 áreas alrededor de la base peruana "Machu Picchu", de las cuales se obtuvieron diferentes tipos de muestras: agua de deshielo (D), agua marina superficial (S) y tierra de sedimento (F). Las estaciones se encuentran ubicadas entre la latitud 62°04'0.16"-62°06'06.8" y la longitud 58°24'56.9"- 58°29'069" (Tabla N° 1).

Metodología del muestreo

La metodología de muestreo consistió en la recolección de 1L de agua superficial, 1kg de tierra de sedimento y 1L de Agua de deshielo. De acuerdo a las condiciones de las 11 zonas de muestreo se pudo recolectar 1 ó 2 de los tipos de muestras mencionadas en cada una de las áreas (Tabla 1). Para el aislamiento de las cepas se empleó Agar Tripticasa Soya. Las cepas aisladas fueron mantenidas en refrigeración hasta su empleo para el presente estudio.

Criotolerancia

Las cepas aisladas fueron reactivadas en Caldo Nutritivo e incubadas por duplicado a 4°C, 18°C y 25°C durante un máximo de 7 días para determinar su criotolerancia. Se supervisó el crecimiento diariamente mediante turbidimetría.

Perfil Degradativo de Petróleo

El perfil degradativo sobre petróleo y sus fracciones se evaluó según la metodología de Mills et al. (1978). Se sembraron las cepas en Caldo Nutritivo a 4°C, luego de su crecimiento se centrifugó el caldo a 5000 rpm por 15

minutos, se lavó dos veces el paquete celular con solución salina al 0.85% mediante centrifugación a 5000 rpm por 15 minutos y se resuspendió el paquete celular con Caldo Mills hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland.

Se preparó una batería de 4 tubos para cada cepa, los cuales contenían 9 ml de Caldo Mills cada uno, con 0.2 ml de crudo de petróleo, gasolina de 84 octanos, parafina líquida y borra por separado. Se agregó 1 ml del resuspendido obtenido de cada cepa en cada tubo. Se incubaron a 4°C por 7 días. Se supervisó su crecimiento diariamente mediante turbidimetría.

Actividad emulsificante

Se cultivaron las cepas en Caldo Nutritivo a 4°C, luego de su crecimiento se lavó dos veces el paquete celular con solución salina al 0.85%, y se resuspendió con el Medio Mínimo propuesto por Goldman et al. (1982) modificado por Escalante (2002) hasta alcanzar una turbidez equivalente a 0.5 en la escala de McFarland.

En un matraz de 100 ml de capacidad conteniendo 18 ml del medio Goldman modificado se agregaron 2 ml del paquete celular resuspendido. Se incubó a 18°C y 150 rpm por 72 horas. El cultivo obtenido se centrifuga a 5000 rpm por 30 minutos, el sobrenadante resultante se somete a una segunda centrifugación en las mismas condiciones.

En tubos estériles, se agregó 10 ml del sobrenadante de la última centrifugada y 0.2 ml del crudo de petróleo, el tubo se tapó con *parafilm* y se agitó de forma manual en sentido de arco por 5 minutos. Después de 5 minutos de reposo, se extrajeron 3 ml de la emulsión para la lectura en el espectrofotómetro a 540 nm. Se usaron como blancos el medio Goldman modificado estéril y la emulsión de 10 ml del medio y 0.2 ml de petróleo.

Para determinar la actividad emulsificante por ml de sobrenadante (UAE/ml), se tomó

como referencia que 0,816 de absorbancia es equivalente a 1 unidad de actividad emulsificante por ml según Escalante (2002).

Identificación molecular

Para la reactivación se sembró de 1 a 2 colonias de cada cepa en Caldo Luria Bertani a temperatura ambiente por 24 horas. Se procedió a la extracción de DNA, para esto se usó el kit para purificación de DNA *Wizard® Genomic* (Promega). Después de obtener el DNA se procedió a amplificar la secuencia de ADN ribosomal 16S usando los *primers* 27F [5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'] Lane y otros (1991) y 1492R [5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'] Turner y otros (1999). Se usó el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* para la edición de las secuencias. Para la construcción del árbol filogenético se descargaron las secuencias del NBLAST (NCBI). Para el alineamiento de las secuencias se usó ClustalX V2.0.10, una vez alineadas las secuencias se usó el programa Mega V6.06. para la construcción del árbol filogenético, en el cual se usó la metodología de *Maximum Likelihood Bootstrap* de 1000 repeticiones.

Resultados

Aislamiento y reactivación

Se obtuvieron 380 cepas aisladas correspondientes a las 11 áreas de muestreo. La reactivación posterior recuperó el 63.9% es decir 243 cepas, de estas 243 cepas 17 eran hongos y 15 eran bacterias mesófilas. Obteniéndose finalmente que 211 fueron las cepas bacterianas seleccionadas para la prueba de criotolerancia (Figura 1-I).

Criotolerancia

Al analizar la criotolerancia de las 211 cepas seleccionadas se obtuvo que un 1,42% (3 cepas) sólo crecieron a 4°C; el 1,9% (4 cepas) crecieron a 4°C y a 18°C; el 94.78% (200 cepas)

crecieron a 4°C, 18°C y 25°C y el 1.9% (4 cepas) crecieron a 18°C y 25°C. (Figura N° 1-II).

Perfil degradativo sobre petróleo

El 80% (168 cepas) de las cepas analizadas no presentaron ninguna actividad degradativa en presencia del crudo o alguna de las fracciones de petróleo. A diferencia de este grupo, el 20% (43 cepas) restante presentó actividad degradativa al manifestar crecimiento usando crudo de petróleo, parafina, gasolina o borra como fuente de carbono.

De estas 43 cepas el 63% (27 cepas) degradó crudo de petróleo, el 44% (19 cepas) degradó borra, el 42% (18 cepas) degradó parafina y el 37% (16 cepas) degradó gasolina de 84 octanos. Al analizar este grupo por el número de fracciones degradadas se obtuvo que el 49% (21 cepas) pudo degradar 1 de las fracciones, el 26% (11 cepas) degradó 2 de las fracciones, el 16% (7 cepas) degradó 3 fracciones y el 9% (4 cepas) pudo degradar 4 fracciones (Figura 2-I).

Actividad emulsificante

De las 43 cepas seleccionadas se encontró que el 70% (30 cepas) mostró una actividad emulsificante entre 0.1 y 0.46 UAE/ml, el 25% (11 cepas) tuvo una actividad entre 0.5 y 0.66 UAE/ml y que un 5% (2 cepas) mostró una actividad mayor a 1 UAE/ml. (Figura 2-II).

Identificación molecular

Se identificaron las 7 cepas que degradaron 3 de las fracciones y las 4 cepas que pudieron degradar las 4 fracciones. En estas 11 cepas se encontraron: 7 cepas del género *Pseudomonas*, de las cuales 9A2, 79Af1, 39B1, 60Bf2, 9A1 y 63B2 fueron identificadas como *Pseudomonas putida* y 63B1 fue identificada como *Pseudomonas aeruginosa*. Además, se identificó a 79Af2 como *Lysinibacillus* sp.; 39B2 como *Aeromonas* sp.; 95f como *Paenibacillus lautus* y 116B como *Stenotrophomonas rhizophila* (Tabla 2) (Figura 3).

Discusión

Según Atlas (1981) y Bertrand et al. (1993), el número de cepas aisladas con capacidad hidrocarbonoclástica en determinado ecosistema depende del previo contacto que ha tenido esta área con los hidrocarburos. En esta investigación aproximadamente el 11% de las cepas aisladas tuvieron actividad degradativa sobre hidrocarburos, este porcentaje de cepas apoya la información de la presencia de hidrocarburos en este ecosistema ya sea de origen biogénico como menciona Cripps y Priddle (1991) o por los derrames accidentales ocasionados por tránsito marítimo.

El perfil de criotolerancia de las cepas estudiadas demostró que estas bacterias psicrófilas y psicrótrofas según Moyer y Morita (2007) presentaban en un 94% un amplio rango de temperatura de crecimiento. Michaud et al. (2004) han descrito que esta característica en cepas propias de zonas antárticas es de gran ventaja debido a que aumenta su potencial para utilizarlas en procesos de biorremediación. Cabe mencionar que en esta investigación, dentro de este grupo de cepas de amplio rango de temperatura de crecimiento se encuentran las cepas que presentaron el mejor perfil de degradación de hidrocarburos y que posterior fueron identificadas molecularmente.

Con respecto al perfil degradativo bacteriano encontrado se observa gran diversidad de patrones, desde la capacidad para solo degradar el crudo de petróleo o alguna de las fracciones presentadas, hasta el degradar todas las fracciones a la vez. Estos resultados se apoyan en las investigaciones de Alexander y Schwarz (1980) quienes sostienen que la respuesta metabólica a los hidrocarburos es altamente variable en la comunidad bacteriana.

En esta investigación las posibles razones de la diversidad de patrones encontra-

dos pueden estar ocasionadas a que las cepas fueron obtenidas de diversos puntos de muestreo y de muestras de diferente naturaleza. Así pues, aunque todos los puntos de muestreo correspondan a una misma bahía la diversidad bacteriana y la capacidad degradativa de éstas llega a ser diferente aunque los puntos de muestreo sean cercanos debido al microambiente nutricional al cual ha sido expuesta cada cepa, estudios como el de Delille y Delille (2000) apoyan esta hipótesis.

A diferencia del óptimo perfil degradativo presentado, la actividad emulsificante en su mayoría es baja. El 70% de las cepas presentan menos de 0.5 UAE/ml y solo el 5% presenta más de 1 UAE/ml. Según Escalante (2002) las UAE/ml presentadas por bacterias mesófilas involucradas en procesos de biorremediación normalmente superan las 2 ó 3 UAE/ml. Sin embargo al comparar estos resultados con las UAE/ml obtenidas por otras bacterias de origen antártico la diferencia disminuye. Así pues, aunque existen reportes como los de Vasileva y Gesheva (2004) de bacterias con más de 2 UAE/ml, la mayoría presenta menos de 1 UAE/ml.

Además del perfil degradativo y de la actividad emulsificante se buscó determinar que bacterias estaban presentes en dicho ecosistema. Estudios que comparan la composición de comunidades microbianas en la Antártida, en áreas prístinas, en otras con impacto antropogénico y otras con impacto por hidrocarburos manifiestan que aunque se evidencia cambios entre una y otra zona aun teniendo las mismas condiciones climáticas, la presencia de hidrocarburos incrementa dramáticamente la presencia de las gamma-proteobacterias como reportan Yakimov et al. (2004) y Brakstad y Bonaunet (2006), información que concuerda con las cepas seleccionadas que fueron identificadas.

Las cepas identificadas fueron las bacterias que presentaron el mejor perfil degradati-

vo sobre hidrocarburo. Ha sido descrito que el género *Pseudomonas* comprende a bacterias que pueden adaptarse muy bien a ambientes fríos como el de la Antártida tanto así que han llegado a ser consideradas miembros de la microbiota normal de este ecosistema de acuerdo con Stallwood et al. (2005). Saul et al. (2005) mencionan que este género usualmente es predominante en ambientes contaminados con hidrocarburos y además de presentar un buen perfil degradativo es capaz de producir surfactantes aun en condiciones de frío extremo como lo manifiesta Carrión et al. (2015), esta investigación demuestra lo antes mencionado pues de las 11 cepas identificadas 7 pertenecen a este género.

Con respecto al resto de bacterias identificadas, se comprobó que todas son propias de este ecosistema o fácil de hallar en éste por su capacidad adaptativa. Por ejemplo, el género *Aeromonas* ha sido reportado como parte de la microbiota en el *permafrost* antártico por Gilichinsky et al. (2007) y en muestras de agua de lagos antárticos por Franzmann et al. (1990). *Lysinibacillus* sp. al ser una bacteria formadora de esporas es reportada como uno de los géneros más abundante en hielo glacial por Shivaji et al. (2013).

Otra de las cepas identificadas fue *Paenibacillus lautus*. Este género ha sido reportado en análisis microbiológico de hielo polar por Antony et al. (2012), y Dsouza et al. (2014) encontraron cierta variedad de representantes de este género en ecosistemas antárticos. Y con respecto a *Stenotrophomonas rhizophila*, Vasileva et al. (2014) ha descrito su presencia como parte de la microflora estable que coloniza ciertas plantas antárticas, además que es considerada parte de la microbiota natural antártica pues se ha encontrado miembros de este género en restos de sedimentos de aproximadamente de 1600 años según Xiao et al. (2005).

Conclusiones

La identificación molecular de las cepas confirmó la predominancia del género *Pseudomonas* y la diversidad bacteriana existente en este tipo de ecosistema.

Las cepas bacterianas aisladas en la Base peruana de la Antártida presentaron una variedad de perfiles degradativos sobre hidrocarburos de petróleo lo que demuestra su potencial para participar en consorcios aplicables a procesos de biorremediación.

Agradecimientos

Los autores agradecen el soporte económico brindado por el Instituto Antártico del Perú para el muestreo y al VRI por el financiamiento al Proyecto CON CON N°121001271

Referencias bibliográficas

- AISLABIE, Jackie M. et al. 2004 "Hydrocarbon Spills on Antarctic Soils: Effects and Management". En: *Environmental Science and Technology* Vol. 38, N° 5: 1265-1274. Nueva Zelanda.
- ALEXANDER, S. y SCHWARZ, J. 1980 "Short-term effects of South Louisiana and Kuwait crude oils on glucose utilization by marine bacterial populations". En: *Applied and Environmental Microbiology* Vol. 40: 341-345. Texas.
- ANTONY, Runa et al. 2012 "Diversity and physiology of culturable bacteria associated with a coastal Antarctic ice core". En: *Microbiological research* Vol. 167, N°6: 372-380. India.
- ATLAS, Ronald M. 1981 "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective". En: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 45, N° 1:180-209. Estados Unidos.
- ATLAS, Ronald M. 1995 "Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation". En: *Marine*

- Pollution Bulletin* Vol. 31, N° 4-12: 178-182. Estados Unidos.
- BARGAGLI, Roberto. 2006 *Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact*, Editorial Springer Berlin Heidelberg, Alemania. (Primera Edición).
- BERTRAND, Jean-Claude, et al. 1993 "Hydrocarbon biodegradation and hydrocarbonoclastic bacterial communities composition grown in seawater as a function of sodium chloride concentration". En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* Vol. 168: 125-138. Francia.
- BRAKSTAD, Odd y BONAUNET, Kristin. 2006 "Biodegradation of petroleum hydrocarbons in seawater at low temperatures (0-5 °C) and bacterial communities associated with degradation". En: *Biodegradation* Vol. 17, N° 1: 71-82. Noruega.
- BRAMLEY-ALVES, Jessica et al. 2014 "Phytoremediation of hydrocarbon contaminants in subantarctic soils: An effective management option". En: *Journal of Environmental Management* Vol. 142: 60-69. Australia.
- CARRIÓN, Ornella et al. 2015 "New emulsifying and cryoprotective exopolysaccharide from Antarctic *Pseudomonas* sp. ID1". En: *Carbohydrate Polymers* Vol. 117: 1028-1034. Barcelona.
- CRIPPS, G.C. y PRIDDLE, J. 1991 "Hydrocarbons in the Antarctic marine environment". En: *Antarctic Science* Vol. 3, N° 3: 233-250. Reino Unido.
- DELILLE, D. et al. 2004 "Biostimulation of natural microbial assemblages in oil-amended vegetated and desert sub-Antarctic soils". En: *Microbial ecology* Vol. 47, N° 4: 407-415. Francia.
- DELILLE, D. y DELILLE, B. 2000 "Field observations on the variability of crude oil impact on indigenous hydrocarbon-degrading bacteria from sub-Antarctic intertidal sediments". En: *Marine Environmental Research* Vol. 49, N° 5: 403-417. Bélgica.
- DSOUZA, Melissa et al. 2014 "Genome-based comparative analyses of Antarctic and temperate species of *Paenibacillus*". En: *PloS one* Vol. 9, N° 10: e108009. Nueva Zelanda.
- ECKLE, Petrisa et al. 2012 "Risk of large oil spills: A statistical analysis in the aftermath of deep-water horizon". En: *Environmental Science and Technology* Vol. 46, N° 23: 13002-13008. Suiza.
- ESCALANTE, Rocío M. 2002 "Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios". Tesis para optar al grado de Magister en Biotecnología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- FRANZMANN, P. et al. 1990 "The heterotrophic, bacterial microbiota of Burton Lake, Antarctica". En: *Polar Biology* Vol. 10, N° 4: 261-264. Australia.
- GILICHINSKY, D. et al. 2007 "Microbial populations in Antarctic permafrost: biodiversity, state, age, and implication for astrobiology". En: *Astrobiology* Vol. 7, N° 2: 275-311. Rusia.
- GOLDMAN, S. et al. 1982 "Emulsan in *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1: Distribution of Cell-Free and Cell-Associated Cross-Reacting Material". En: *Applied and environmental microbiology* Vol. 44, N° 1: 165-170. Israel.
- HUGHES, Kevin A. et al. 2007 "Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons". En: *Science of the Total Environment* Vol. 372, N° 2-3: 539-548. Reino Unido.
- LANE, D. J. 1991 "16S/23S rRNA sequencing". En: Stackebrandt, E. y Goodfellow, M. (Editor), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* 115-175. Nueva York.
- MICHAUD, Luigi et al. 2004 "The biodegradation efficiency on diesel oil by two psychrotrophic Antarctic marine bacteria during a two-month-long experiment". En: *Marine Pollution Bulletin* Vol. 49, N° 5-6: 405-409. Italia.
- MILLS, A. L. et al. 1978 "Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms by the most probable number method". En: *Canadian journal of microbiology* Vol. 25, N° 5: 522-527. Estados Unidos.
- MOYER, Craig L. y MORITA, Richard Y. 2007 "*Psychrophiles and Psychrotrophs*", Editorial John Wiley and Sons, Chichester. (Primera Edición)
- MUANGCHINDA, C. et al. 2014 "Abundance and diversity of functional genes involved in the degra-

- dation of aromatic hydrocarbons in Antarctic soils and sediments around Syowa Station". En: *Environmental Science and Pollution Research* Vol. 22, N° 6:4725-4735. Tailandia.
- POLMEAR, R. et al. 2015 "The effects of oil pollution on Antarctic benthic diatom communities over 5 years". En: *Marine Pollution Bulletin* Vol. 90, N° 1-2: 33-40. Australia.
- ROGERS, Alex D. et al. 2012 "Antarctic Ecosystems: An Extreme Environment in a Changing World"; Editorial Blackwell Publishing Ltd., Reino Unido. (Primera Edición).
- SAUL, David et al. 2005 "Hydrocarbon contamination changes the bacterial diversity of soil from around Scott Base, Antarctica". En: *FEMS Microbiology Ecology* Vol. 53, N° 1: 141-155. Nueva Zelanda.
- SHIVAJI, Sisinthy et al. 2013 "Antarctic ice core samples: Culturable bacterial diversity". En: *Research in Microbiology* Vol. 164, N° 1: 70-82. India.
- STALLWOOD, B. et al. 2005 "Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica". En: *Journal of Applied Microbiology* Vol. 99, N°4: 794-802. Reino Unido.
- TURNER, S. et al. 1999 "Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis". En: *Journal of Eukaryotic Microbiology* Vol. 46: 327-338. Indiana.
- VASILEVA-TONKOVA, E. et al. 2014 "Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica". En: *World journal of microbiology & biotechnology* Vol. 30, N° 4: 1387-1398. Bulgaria.
- VASILEVA-TONKOVA, E. y GESHEVA, V. 2004 "Potential for Biodegradation of Hydrocarbons by Microorganisms Isolated from Antarctic Soils". En: *Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences* Vol. 59, N° 1-2: 140-145. Bulgaria.
- VÁZQUEZ, S. et al. 2009 "Bacterial community dynamics during bioremediation of diesel oil-contaminated antarctic soil". En: *Microbial Ecology* Vol. 57, N° 4: 598-610. Argentina.
- XIAO, Xiang et al. 2005 "Chitinase genes in lake sediments of Ardley Island, Antarctica". En: *Applied and environmental microbiology* Vol. 71, N° 12: 7904-7909. China.
- YAKIMOV, Michail et al. 2004 "Crude oil-induced structural shift of coastal bacterial communities of rod bay (Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica) and characterization of cultured cold-adapted hydrocarbonoclastic bacteria". En: *FEMS Microbiology Ecology* Vol. 49, N° 3: 419-432. Italia.

ANEXOS

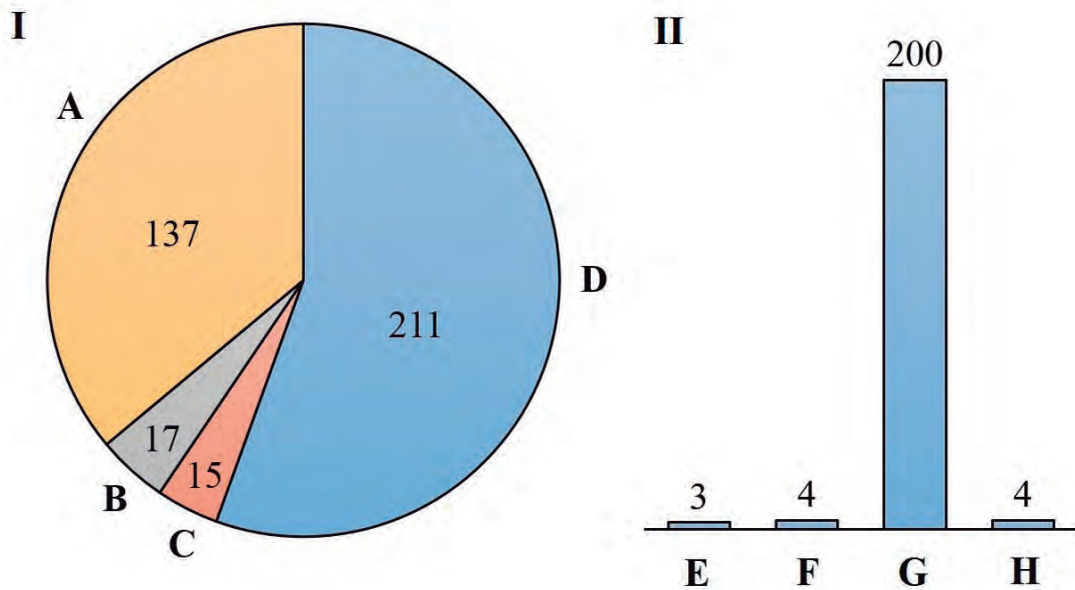


Figura 1. Total de cepas aisladas (I). Cepas no reactivadas (A), cepas de hongos (B), cepas de bacterias mesófilas (C) y cepas bacterias psicrófilas y psicrótrofas (D). Perfil de criotolerancia de las cepas del grupo D (II). Cepas que crecieron solo a 4°C (E), cepas que crecieron a 4°C y a 18°C (F), cepas que crecieron a 4°C, 18°C y 25°C (G) y cepas que crecieron a 18°C y 25°C (H).

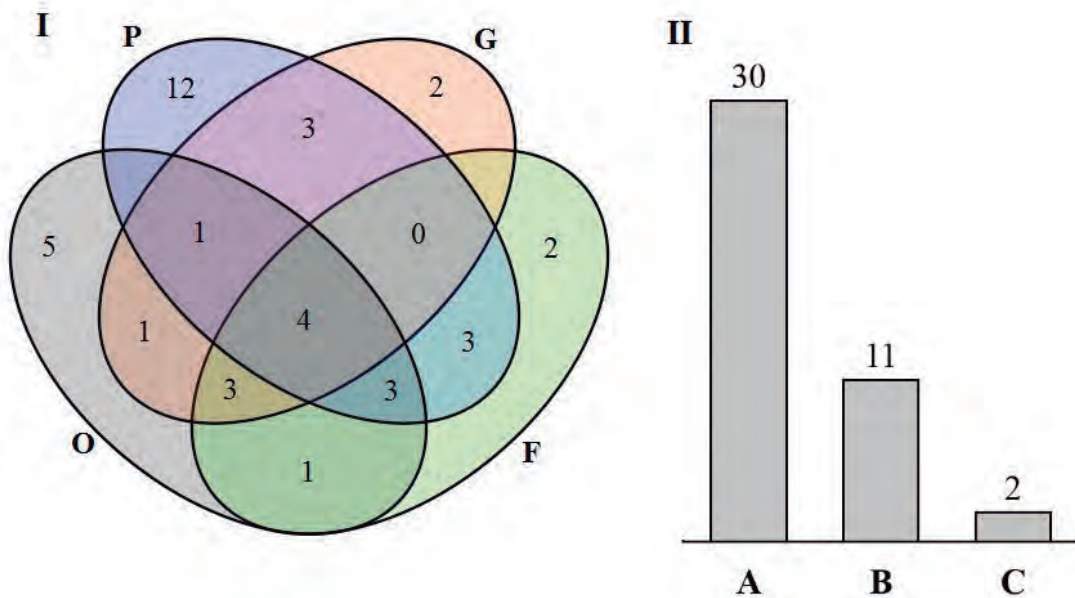


Figura 2. Perfil degradativo sobre hidrocarburos de petróleo de las cepas seleccionadas (I). Cepas que degradaron crudo de petróleo (P), cepas que degradaron borra (O), cepas que degradaron parafina (F) y cepas que degradaron gasolina de 84 octanos (G). Actividad emulsificante de las cepas seleccionadas (II). Cepas con una actividad emulsificante entre 0.1 y 0.46 UAE/ml (A), cepas con una actividad emulsificante entre 0.5 y 0.66 UAE/ml (B) y cepas con una actividad emulsificante mayor a 1 UAE/ml (C).

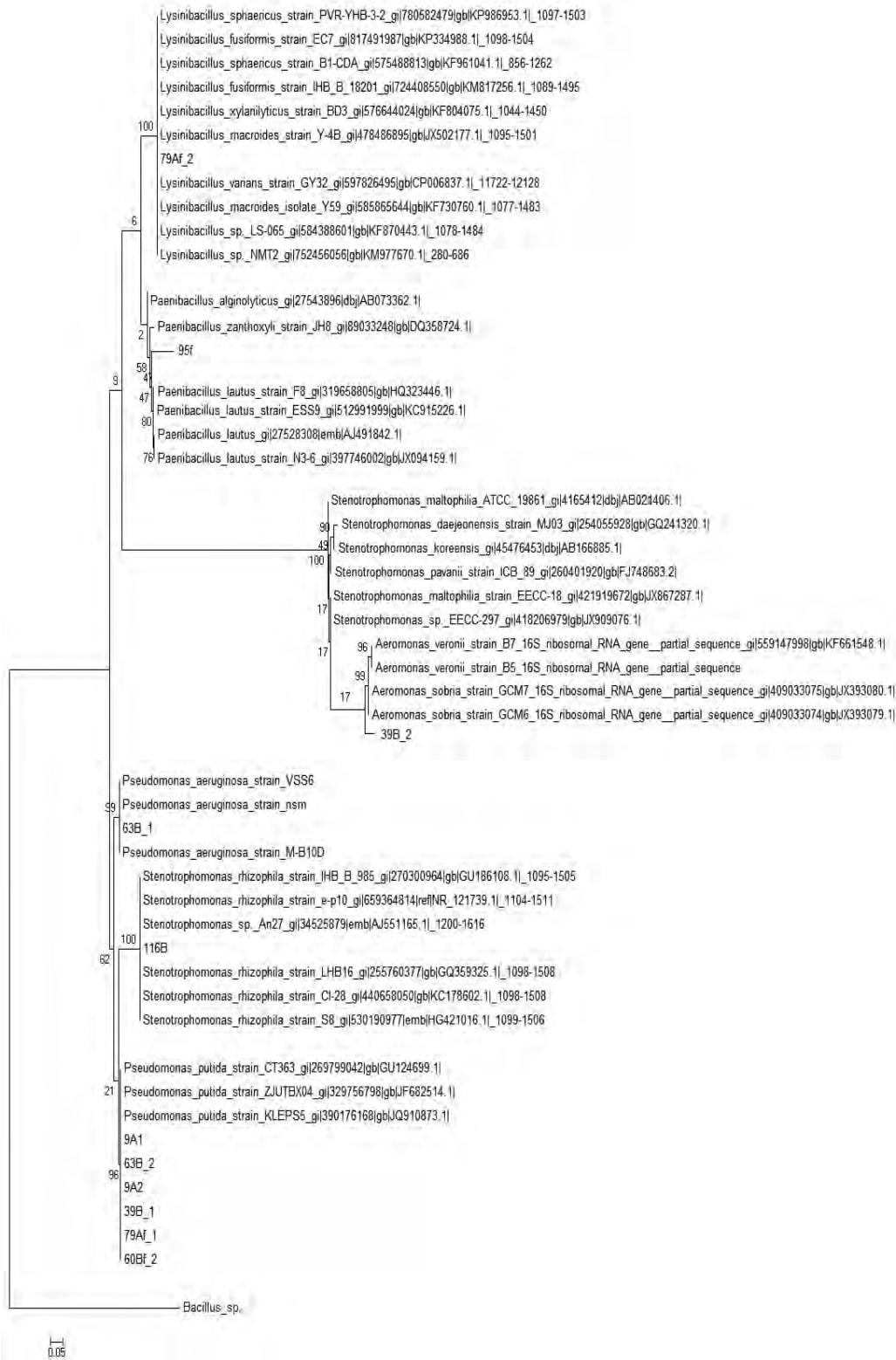


Figura 3. Árbol filogenético basado en secuencias del gen 16S ARNr para la identificación de las cepas que presentaron mejor perfil degradativo sobre hidrocarburos de petróleo.

TABLA 1
Coordenadas geográficas de las zonas de muestreo y naturaleza de las muestras colectadas

ÁREAS	MUESTRAS	LATITUD	LONGITUD
E1	Agua superficial y sedimento	62°05'27.6"	58°29'069"
E2	Agua superficial	62°04'50.4"	58°27'52"
E3	Agua superficial y sedimento	62°04'37.9"	58°26'46.6"
E4	Agua superficial y sedimento	62°04'0.16"	58°25'15"
E5	Sedimento	62°05'34.3"	58°27'50.6"
E6	Agua superficial y sedimento	62°05'11.1"	58°27'04.4"
E7	Agua superficial	62°04'59.8"	58°26'03.9"
E8	Agua superficial y sedimento	62°04'33.1"	58°25'26.9"
E9	Agua superficial	62°06'06.8"	58°27'24.6"
E11	Agua superficial	62°05'21.3"	58°24'56.9"
D2	Agua de deshielo	62°05'42.3"	58°28'0.38"

TABLA 2
Identificación molecular de las cepas seleccionadas

CÓDIGO DE CEPA	IDENTIFICACIÓN
9 A 2	<i>Pseudomonas putida</i>
116 B	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>
79Af 1	<i>Pseudomonas putida</i>
79 Af 2	<i>Lysinibacillus sp.</i>
9 A 1	<i>Pseudomonas putida</i>
39 B 1	<i>Pseudomonas putida</i>
39 B 2	<i>Aeromonas sp.</i>
60 Bf 2	<i>Pseudomonas putida</i>
63 B 1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
63 B 2	<i>Pseudomonas putida</i>
95 f	<i>Paenibacillus lautus</i>