

CRECIMIENTO DE *Pseudomonas alcaligenes* EN ANTRACENO Y NAFTALENO POR RECuento EN PLACAS Y MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCENCIA

Laugeny Díaz-Borrego^{1*}, José Dupontt¹, Lorena Atencio²,
Xiomara Montiel³ y Luz Marina Soto¹

¹Laboratorio de Microbiología Acuática.

²Laboratorio de Genética y Biología Molecular.

³Laboratorio de Microbiología Industrial y del Petróleo.

Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias,
Universidad del Zulia, Apartado Postal 526. Maracaibo, Venezuela.
E-mail: laugenydiazb@hotmail.com, laugeny@yahoo.com

Resumen. Se evaluó el crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 en presencia de naftaleno y antraceno, por microscopía de epifluorescencia y recuento en placas. Con la técnica de recuento en placas, el número de conteos bacterianos/tiempo fue mayor que el obtenido con la microscopía de epifluorescencia. Las velocidades de crecimiento, en presencia de naftaleno, fueron mayores a las obtenidas para el antraceno; mientras que los tiempos de duplicación fueron menores. Esto sugiere que el naftaleno se utilizó más rápido y eficientemente que el antraceno; lo que podría estar relacionado con la estructura química de los hidrocarburos y con restricciones enzimáticas bacterianas. El crecimiento en la mezcla de hidrocarburos evidenció la formación de dos fases logarítmicas, siendo las velocidades de crecimiento y los tiempos de duplicación similares con ambas técnicas. La biomasa bacteriana incrementó sustancialmente en presencia de los hidrocarburos y su mezcla, lo cual indica que son utilizados por la bacteria como única fuente de carbono. La técnica de epifluorescencia es inadecuada

*Autor para correspondencia

Recibido: 07 Mayo 2004 / Aceptado: 21 Marzo 2005
Received: 07 May 2004 / Accepted: 21 March 2005

para evaluar el crecimiento bacteriano en hidrocarburos altamente insolubles en agua y fluorescentes, ya que la longitud de onda irradiada se solapa con la emitida por el fluorocromo que tiñe la bacteria. Estas limitaciones permiten recomendar el recuento en placas.

Palabras clave: Crecimiento, epifluorescencia, *Pseudomonas alcaligenes*, recuento en placas.

GROWTH OF *Pseudomonas alcaligenes* IN ANTHRACENE AND NAPHTHALENE BY PLATE COUNTS AND EPIFLUORESCENT MICROSCOPY

Abstract. We evaluated growth of *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 in the presence of naphthalene and anthracene, using epifluorescent microscopy and plate count techniques. With plate counts, bacterial counts/time was higher than with epifluorescent microscopy. Growth rates in naphthalene were higher than in anthracene, whereas duplication times were lower, suggesting that naphthalene was used more quickly and efficiently than anthracene. This result may be related to the chemical structure of the hydrocarbons and enzymatic restrictions of the bacteria. Bacterial growth in the hydrocarbon mixtures exhibited two logarithmical phases. In addition, growth rates and duplication times were similar for both techniques. Bacterial biomass increased substantially in presence of hydrocarbons and their mixtures, suggesting that bacteria use these mixtures as the only carbon source. Epifluorescent microscopy is inadequate in evaluating bacterial growth in hydrocarbons that are highly insoluble in water and fluorescent, because the irradiating wavelength overlaps with the wavelength produced by the fluorochrome used to stain the bacteria. Thus, we recommended the plate count technique.

Key words: Growth, epifluorescent microscopy, plate counts, *Pseudomonas alcaligenes*.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son capaces de oxidar todo tipo de hidrocarburos en forma líquida, gaseosa o sólida de series alifáticas, olefínicas, aromáticas y nafténicas; esta habilidad facilita que el compuesto sea

dispersado y removido del ambiente (Atlas 1978). Por lo tanto, la capacidad de las bacterias para utilizar una variedad de compuestos orgánicos sugiere que la microflora autóctona tiene el potencial de degradar *in situ* los agentes contaminantes (Atlas y Bartha 2002).

Las bacterias requieren de una serie de condiciones fisicoquímicas y nutricionales óptimas (nitrógeno, fósforo, azufre, vitaminas y otros compuestos), para metabolizar y utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (Atlas y Bartha 2002). Muchas cepas bacterianas son sensibles a la acidez y con frecuencia crecen muy poco cuando el pH es menor de 5,0. La descomposición de los hidrocarburos puede ocurrir desde 0°C hasta 55°C, aunque la oxidación es sensible a elevadas temperaturas; además de requerir concentraciones de oxígeno adecuadas y la participación de enzimas como las mono o dioxigenasas bacterianas (Atlas y Bartha 2002, Madigan *et al.* 2004).

Se ha determinado que la disponibilidad de otros sustratos carbonados afecta el catabolismo de los hidrocarburos, siendo común una disminución de la velocidad de crecimiento microbiano en presencia de un sustrato fácilmente degradable (Atlas y Bartha 2002).

La degradación completa de los contaminantes del petróleo, en los ecosistemas, generalmente se lleva a cabo por poblaciones microbianas mixtas, más que por una sola especie. En la mayoría de los ecosistemas naturales el inóculo inicial de microorganismos que utilizan los hidrocarburos limita la tasa de degradación del mismo, pero posterior a un corto período de exposición aumenta dicha tasa porque las bacterias comienzan a utilizar su maquinaria bioquímica que les permite metabolizarlos (Atlas 1978).

Existe una gran cantidad de información sobre el metabolismo microbiano del antraceno y naftaleno, los cuales están ampliamente distribuidos en todos los sistemas terrestres y acuáticos (Van Hamme *et al.* 2003). Estos compuestos se han utilizado como sustratos modelos en estudios sobre la degradación de hidrocarburos aromáticos, ya que sus estructuras constituyen poliaromáticos complejos y carcinogénicos tales como: el benzo [*a*] pireno, el ben-

zo [a] antraceno y el 3-metilcloroantreno (Cerniglia 1984, Van Hamme *et al.* 2003).

El crecimiento bacteriano, en presencia de hidrocarburos, se ha cuantificado por diversas técnicas como: el recuento de células viables, la espectrofotometría y la epifluorescencia. Esta última ha permitido simplificar la estimación del número de células y la biomasa bacteriana al realizar contajes directos en un volumen determinado de muestra; sin embargo, su desventaja estriba en que se cuentan las células viables y no viables, y se requieren de equipos costosos y personal especializado (Porter y Freig 1980, Bitton *et al.* 1993, Kepner y Pratt 1994, Soto 2001, Bracho *et al.* 2004).

Por otra parte, el método de recuento de viables es el método más sensible para la determinación del número de bacterias, ya que permite detectar, incluso, a una célula viable en suspensión. Sus desventajas radican en que se debe tener un número de colonias que sea estadísticamente representativo, se corre el riesgo de contaminación por otros microorganismos, y es una técnica laboriosa que requiere mucho material de laboratorio y rinde resultados a largo plazo (Stanier *et al.* 1986, Madigan *et al.* 2004). El propósito de este trabajo es evaluar el crecimiento de una cepa de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19, a través de la microscopía de epifluorescencia y de recuento de viables en placas.

MATERIALES Y MÉTODOS

CEPA BACTERIANA

Se empleó la cepa de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19, la cual fue aislada por Díaz *et al.* (1999), a partir del sedimento impactado con hidrocarburos de la playa Caimare Chico, municipio Páez, estado Zulia.

INÓCULO BACTERIANO

Se tomaron 500 μL del cultivo bacteriano desarrollado en un caldo nutritivo durante 18 a 24 h hasta alcanzar la turbidez del tubo

N° 2,0 de MacFarland, y se sembró en una fiola de 1000 mL conteniendo 500 mL de caldo nutritivo estéril. El cultivo se incubó a 30°C en un baño con agitación continua a 150 rpm. El cultivo se monitoreó cada 30 min por 24 h empleando la técnica de espectrofotometría (Spectronic 20) a una DO de 540 nm.

BIOMASA BACTERIANA

Se filtró un volumen de 250 mL del cultivo bacteriano desarrollado en fase logarítmica a través de un filtro millipore de 0,22 μm para recuperar el paquete celular. El sobrenadante se conservó para su uso posterior y el paquete celular se lavó tres veces con solución salina fisiológica (0,85%), se secó en una estufa a 80°C hasta peso constante para determinar el peso final (P_2). El peso seco del paquete celular $\mu\text{g/mL}$, se estimó por diferencia de peso y se relacionó con el volumen del cultivo centrifugado: $P_2 - P_1 / V \text{ (mL)} = \mu\text{g/mL}$, lo que permitió cuantificar la biomasa contenida en el inóculo hasta la fase logarítmica, para posteriormente evaluar la cinética de crecimiento en presencia de antraceno y naftaleno.

CURVAS DE CRECIMIENTO BACTERIANO

El paquete celular desarrollado en el caldo nutritivo hasta fase logarítmica de crecimiento bacteriano, se lavó tres veces con solución salina al 0,85%, y se centrifugó a 10.000 rpm en cada lavado, con objeto de eliminar cualquier fuente de carbono orgánico contaminante.

El experimento se realizó en fiolas con capacidad nominal de 1.000 mL, las cuales contenían 500 mL de Medio Mínimo Mineral (MMM) con hidrocarburo al 0,1% p/v según lo propuesto por Jobson *et al.* (1972), y un inóculo inicial de 3 mL de la cepa bacteriana en fase logarítmica. Antes de adicionar los hidrocarburos al MMM, éstos se trituraron en un mortero para obtener un particulado fino accesible para las bacterias (Volkering *et al.* 1992). Las mediciones se realizaron por triplicado durante 16 días cada 48 h, a 30°C \pm 1°C, pH inicial del medio de cultivo de 7,0 y agitación constante de 150 rpm. Los resultados de las mediciones se expresaron como valores promedio.

Se utilizó la técnica de recuento en placas, para estimar el número de UFC/mL, tomando 1 mL de cada fiola para realizar diluciones seriadas en solución salina al 0,85% hasta 10^{-8} y sembrando 100 μL de cada dilución en placas de agar nutritivo, las cuales se incubaron por 24 h a 30°C ; después de lo cual se cuantificaron las colonias bacterianas en las placas que contenían entre 30 y 300 colonias.

En la técnica de epifluorescencia se tomó un volumen entre 4 y 5 mL de cada fiola durante cada medición, se pasó por un tamiz de 0,45 μm para separar las partículas más grandes, y se procedió a fijar con formol al 40% hasta obtener un volumen final del 2% de formol. Luego se tiñeron las células con 4 a 5 gotas de DAPI (4',6- diamino-2-fenilindol) durante 10 min, se filtró la muestra al vacío en filtros de policarbonato negro de 0,22 μm y posteriormente se realizaron los contajes bacterianos directamente al microscopio de fluorescencia. Las bacterias se observaron de color blanco sobre un fondo negro, ya que el DAPI se incorpora al material genético de la célula, emitiendo fluorescencia al excitarse en presencia de luz ultravioleta (365 nm) (Porter y Freig 1980).

Se emplearon, como controles, fiolas con MMM + antraceno; MMM + naftaleno y MMM + antraceno + naftaleno al 0,1% sin inóculo bacteriano, y MMM con inóculo bacteriano sin hidrocarburos. Adicionalmente, durante cada medición se realizó un frotis y tinción de Gram para verificar la pureza del cultivo.

PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Se calcularon los siguientes parámetros de crecimiento microbiano: velocidad de crecimiento microbiano (μ), tiempo de duplicación (t_d) y biomasa bacteriana final (x_f), la cual se realizó al término de la fase logarítmica a una velocidad de crecimiento constante (Stanier *et al.* 1986), con los datos obtenidos por la técnica de epifluorescencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biomasa inicial de la cepa de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 fue de 346,94 $\mu\text{g/mL}$, la cual alcanzó, al final de la fase logarítmica en caldo nutritivo y en 14,5 horas aproximadamente, una D.O máxima de 1,3467, la cual correspondió a un conteo de $2,88 \times 10^6$ cel/mL empleando la técnica de microscopía de epifluorescencia. Las Figuras 1 a 6 muestran las curvas de *P. alcaligenes* LDA19 en presencia de los hidrocarburos naftaleno, antraceno y naftaleno + antraceno obtenidas por las técnicas de epifluorescencia y de recuento en placas. Las Tablas 1 a 3 presentan los parámetros de crecimiento bacteriano.

La técnica de recuento en placas reveló mayores conteos bacterianos a través del tiempo, en comparación con los obtenidos con la microscopía de epifluorescencia (Figs. 1, 2, 3 y 4).

Por otra parte, la biomasa final alcanzada por la bacteria, en presencia de antraceno, fue mayor a la obtenida en naftaleno (Tablas 1 y 2).

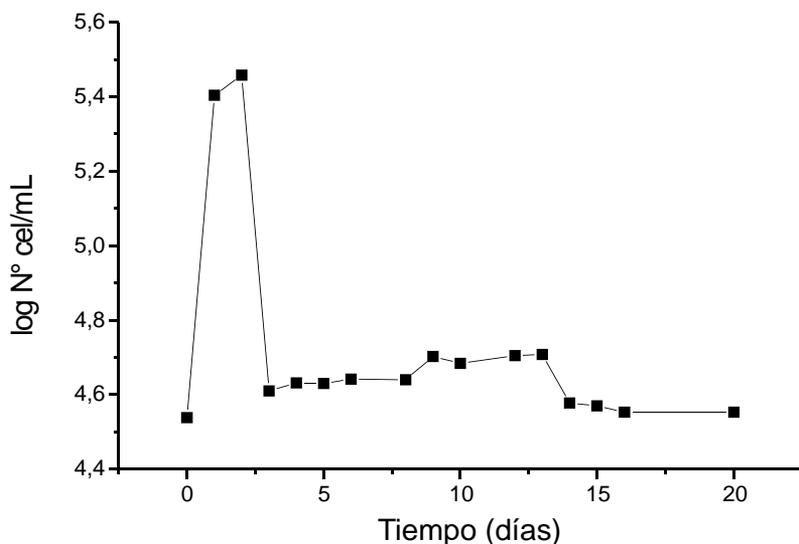


FIGURA 1. Crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 en presencia de naftaleno estimada por epifluorescencia.

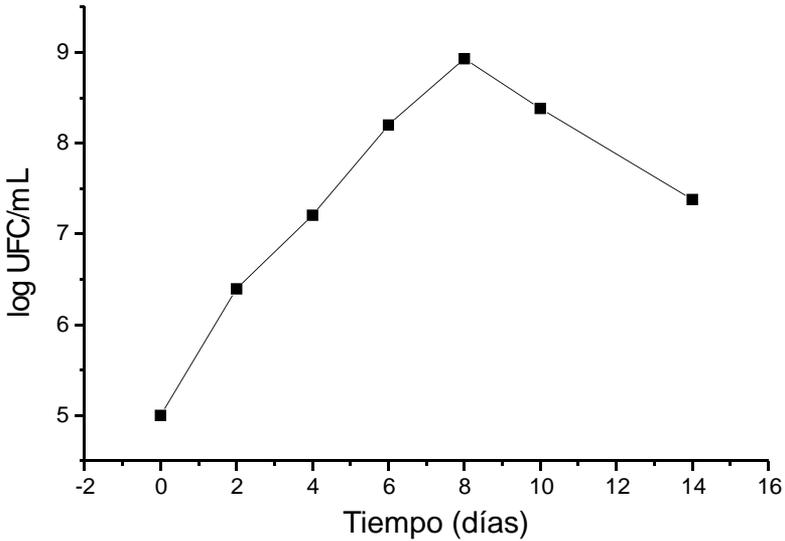


FIGURA 2. Crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 en presencia de naftaleno estimada por recuento en placas.

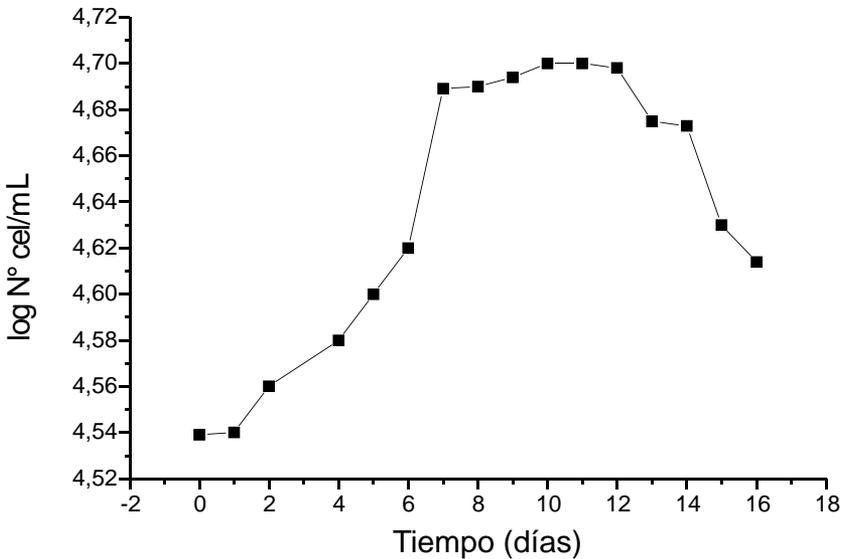


FIGURA3 . Crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 en presencia de antraceno estimada por epifluorescencia.

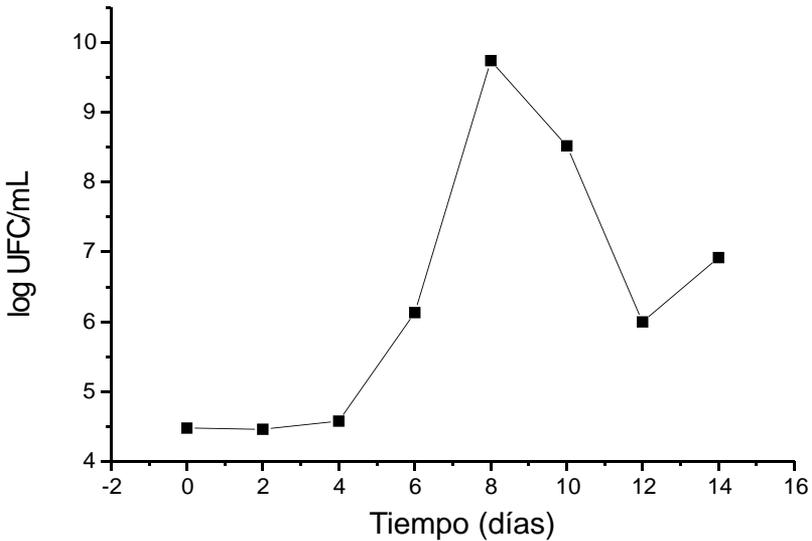


FIGURA 4. Crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 en presencia de antraceno estimada por recuento en placas.

TABLA 1. Parámetros de crecimiento bacteriano de la cepa de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 en presencia de naftaleno.

Técnica	Velocidad de crecimiento (μ)	Tiempo de duplicación (t_d)	Biomasa final (x_f)
Epifluorescencia	$0,012 \times h^{-1}$	57,286 h	1.670,80 $\mu\text{g/mL}$
Recuento en placas	$0,093 \times h^{-1}$	7,430 h	-

TABLA 2. Parámetros de crecimiento bacteriano de la cepa de *Pseudomonas. alcaligenes* LDA19 en presencia de antraceno.

Técnica	Velocidad de crecimiento (μ)	Tiempo de duplicación (t_d)	Biomasa final (x_f)
Epifluorescencia	$0,006 \times h^{-1}$	113,59 h	8.305 $\mu\text{g/mL}$
Recuento en placas	$0,285 \times h^{-1}$	2,43 h	-

Las velocidades de crecimiento en naftaleno, determinadas mediante la técnica de epifluorescencia, son mayores que las correspondientes al antraceno; a diferencia de lo que ocurre con los tiempos de duplicación durante el crecimiento bacteriano en dichos medios (Tablas 1 y 2). Se ha establecido que un microorganismo necesita energía adicional para metabolizar sustratos complejos; es por ello que la velocidad específica de crecimiento microbiano en sustratos sencillos es mayor que en los complejos, en contraste con lo observado para los tiempos de duplicación (Crueger y Crueger 1993).

Se ha indicado que las bacterias sometidas a limitación de nutrientes, como el crecimiento en hidrocarburos, pueden experimentar fenómenos de tolerancia hacia el compuesto, que le permiten sobrevivir por largo tiempo empleando sólo su metabolismo basal y las reservas carbonadas de su propia estructura y de células muertas; pero después de este período, comienza la producción de enzimas para la degradación de los hidrocarburos (Stanier *et al.* 1986, Soto 2001, Atlas y Bartha 2002). Este fenómeno de tolerancia podría explicar las bajas velocidades de crecimiento y los elevados tiempos de duplicación alcanzados por las bacterias en presencia de los hidrocarburos.

Los resultados indican que la bacteria utilizó más eficientemente y en menor tiempo el naftaleno que el antraceno. En este caso en particular, el antraceno (tres anillos aromáticos) es más resistente al ataque microbiológico que el naftaleno (dos anillos aromáticos), lo cual se podría relacionar tanto con factores físicos (estructura), como a restricciones enzimáticas de las bacterias (Cerniglia 1984).

Las velocidades de crecimiento, en presencia de naftaleno, fueron menores a las reportadas por Volkering *et al.* (1992) para *Pseudomonas* sp. ($\mu = 0,3 \times h^{-1}$), mientras que en presencia de antraceno las velocidades de crecimiento bacteriano fueron mayores ($\mu = 0,0003 \times h^{-1}$). A pesar de que en ambos casos se emplearon cepas de *Pseudomonas* sp., éstas se aislaron de ambientes completamente diferentes; por lo tanto, las diferencias metabólicas en cuanto a la utilización de los hidrocarburos, van a depender de que la bacteria posea genes codi-

ficadores de enzimas dioxigenasas específicas para la degradación de estos compuestos (Atlas y Bartha 2002, Madigan *et al.* 2004).

Cantini *et al.* (2001), al evaluar el crecimiento de *Bacillus* sp. en fenantreno, obtuvieron una velocidad de crecimiento y un tiempo de duplicación ($\mu = 0,049 \text{ h}^{-1}$, $t_d = 0,024 \text{ h}$) diferentes a los obtenidos para el naftaleno y el antraceno con ambas técnicas. Mientras que Bracho *et al.* (2004) encontraron para *Pseudomonas stutzeri*, valores de velocidad de crecimiento y tiempos de duplicación en presencia de dibenzotiofeno ($\mu = 0,212 \text{ h}^{-1}$, $t_d = 3,36 \text{ h}$), similares a los obtenidos en este trabajo al evaluar el crecimiento bacteriano en antraceno por recuento en placas. Estas investigaciones se llevaron a cabo en suelos contaminados con petróleo en diferentes sitios del estado Zulia.

El crecimiento en la mezcla antraceno + naftaleno, evidenció la formación de dos fases logarítmicas de desarrollo bacteriano (Figs. 5 y 6). Este tipo de crecimiento denominado diáuxico es común en bacterias sometidas a dos fuentes alternativas de carbono, en el cual se emplea primero la fuente de carbono más sencilla y luego la más

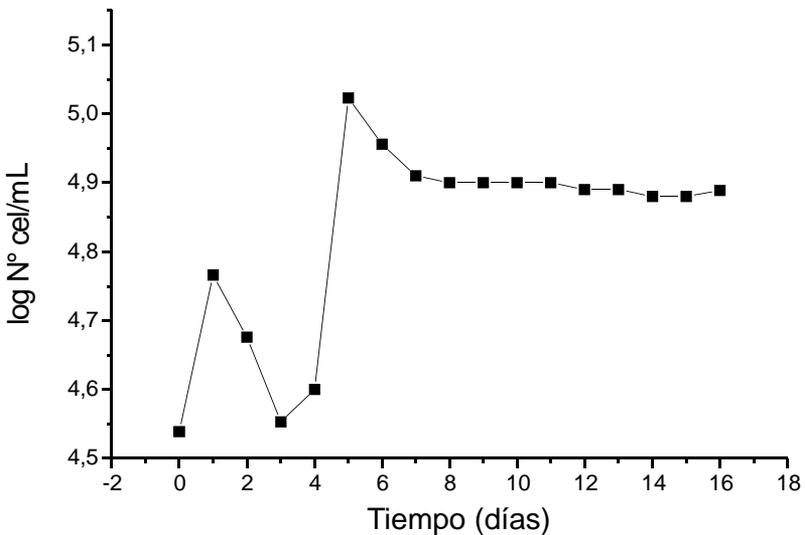


FIGURA 5. Crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 en presencia de antraceno + naftaleno estimada por epifluorescencia.

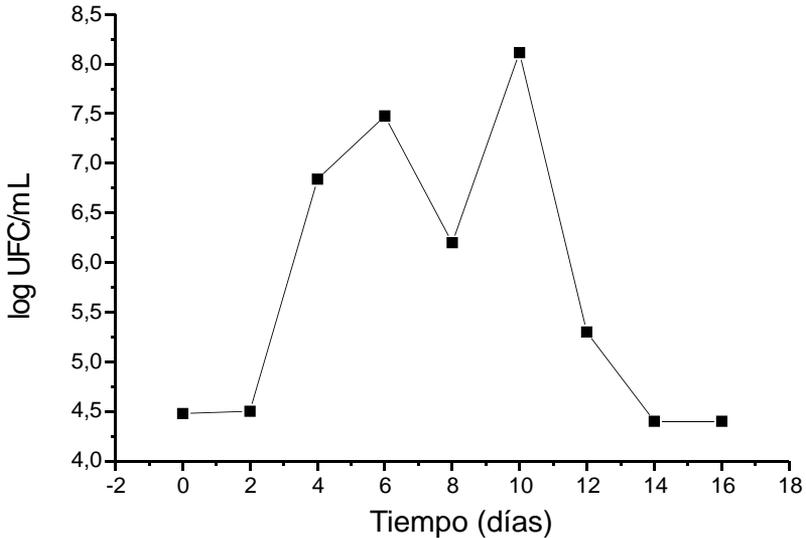


FIGURA 6. Crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 en presencia de antraceno + naftaleno estimada por recuento en placas.

compleja (Lendenmann *et al.* 1996). De acuerdo a la estructura química de ambos hidrocarburos, es probable que el naftaleno sea empleado primero que el antraceno.

Las velocidades de crecimiento y los tiempos de duplicación estimados, en ambas fases logarítmicas de crecimiento bacteriano en la mezcla de hidrocarburos, fueron similares con las dos técnicas (Tabla 3). De igual forma, la biomasa fue similar en ambas fases de crecimiento bacteriano, pero menor a la alcanzada en los hidrocarburos por separado. La mezcla de compuestos complejos imposibilita más aún el ataque enzimático microbiano de los hidrocarburos, lo que hace que la asimilación de los mismos sea deficiente (Atlas y Bartha 2002).

Soto (2001) demostró, por epifluorescencia, que las velocidades de crecimiento (μ entre $0,0075$ y $0,0204 \times h^{-1}$) y los tiempos de duplicación (td entre 34,03 y 166,29 h) de bacterias Gram positivas, en una mezcla de dibenzotiofeno y tiantreno, son menores y mayores respectivamente, que los obtenidos en la mezcla de antraceno y naftaleno. Esto podría estar vinculado con la estructura química, más

TABLA 3. Parámetros de crecimiento bacteriano de la cepa de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19 en presencia de antraceno + naftaleno.

Técnica	μ^1	μ^2	t_{d1}	t_{d2}	X_{f1}	X_{f2}
Epifluorescencia	$0,049 \text{ h}^{-1}$	$0,1035 \times \text{h}^{-1}$	13,98 h	6,69 h	867,30 $\mu\text{g/mL}$	915,40 $\mu\text{g/mL}$
Recuento en placas	$0,070 \times \text{h}^{-1}$	$0,090 \times \text{h}^{-1}$	9,86 h	7,66 h	-	-

compleja, de los hidrocarburos aromáticos azufrados, dibenzotiofeno y tiantreno (Cerniglia 1984).

Es importante hacer referencia a los inconvenientes metodológicos surgidos al cuantificar el crecimiento bacteriano en presencia de los hidrocarburos por microscopía de epifluorescencia. Estas limitaciones estuvieron relacionadas con la alta insolubilidad en agua y la elevada fluorescencia de los hidrocarburos, especialmente del antraceno, lo cual pudo ocasionar subestimaciones en los recuentos bacterianos al compararlos con los obtenidos por recuento en placas.

Los hidrocarburos aromáticos (hidrofóbicos) en agua forman una emulsión producto de la reducción de la tensión superficial entre ambos compuestos, por acción de algunas sales presentes en el medio mínimo mineral (Mac Murry 1992) y en estas emulsiones quedan adheridas algunas bacterias. Por otra parte, la longitud de onda irradiada por el antraceno (390 nm) se solapa con la emitida por la bacteria teñida con el fluorocromo; el naftaleno fluoresce a longitudes de ondas más cortas (Pretsch *et al.* 1980).

Los resultados permiten presumir que la bacteria efectivamente creció en presencia de los hidrocarburos y los utilizó como única fuente de carbono, ya que presentó incremento en la biomasa estimada en fase logarítmica. Esta fuente de carbono pasaría a formar parte de la estructura bacteriana una vez asimilada.

Las observaciones revelaron, de forma cualitativa, una disminución en la fluorescencia del hidrocarburo a medida que incrementó el número de células a través del tiempo. Este hecho se explica porque a medida que el hidrocarburo es clivado, producto del ataque enzimático (Cerniglia 1984), va perdiendo conjugaciones e instauraciones, lo cual trae como consecuencia una disminución en la fluorescencia (Pretsch *et al.* 1980).

Pseudomonas sp. se ha reportado en innumerables estudios como una biodegradadora potencial de diversos hidrocarburos (Cantini *et al.* 2001, Soto 2001, Van Hamme *et al.* 2003, Bracho *et al.* 2004), incluso mucho más complejos que los empleados en este trabajo.

CONCLUSIONES

El crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19, en presencia de naftaleno y antraceno, a través de la microscopía de epifluorescencia y de recuento de viables fue diferente, obteniéndose mayores recuentos bacterianos por la técnica de conteo en placas.

El uso de la microscopía por epifluorescencia resulta inapropiado para estimar el crecimiento bacteriano en hidrocarburos fluorescentes y altamente insolubles en agua.

La capacidad de crecimiento de *Pseudomonas alcaligenes* LDA19, en presencia de los hidrocarburos aromáticos, sugiere su uso potencial para la descontaminación del sedimento de la playa Caimare Chico, estado Zulia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la División de Investigación de la Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Proyecto FDI N° 023-04, por el co-financiamiento para esta investigación, y a José Ortega del Departamento de Química (FEC-LUZ), por su aporte en el análisis de las propiedades químicas de los hidrocarburos.

LITERATURA CITADA

- ATLAS R. M. 1978. Microorganisms and petroleum pollutants. *BioScience* 28(6): 387-390.
- ATLAS R. M. y R. BARTHA. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental* (4 ed.). Editorial Prentice Hall. 677 pp.
- BITTON G., B. KOOPMAN, K. JUNG y G. VOILAND. 1993. Modification of the standard epifluorescence microscopic method for total bacterial counts in environmental samples. *Wat Research* 27 (7): 1109-1112.
- BRACHO M., L. DÍAZ y L. SOTO. 2004. Crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* en presencia de dibenzotiofeno y en función de nitrógeno y fósforo. *Ciencia* 12(3): 125-131.
- CANTINI L., L. DÍAZ, S. DÁVILA y L. SOTO. 2001. Crecimiento a diferentes concentraciones de fósforo y nitrógeno de un cultivo puro de bacterias degradadoras de fenantreno. *Ciencia* 9 (2): 207-216.
- CERNIGLIA C. E. 1984. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Advances in Applied Microbiology* 30: 31-51.
- CRUEGER W. y A. CRUEGER. 1993. *Biología Manual de Microbiología Industrial*. 1ª ed. Editorial Acirbia, S.A., España. 413 pp.
- DÍAZ L., J. DUPONTT, L. ATENCIO y A. PÉREZ. 1999. Caracterización de bacterias que utilizan hidrocarburos aisladas de la playa "Caimare Chico" (Estado-Zulia). 26 Jornadas Microbiología "Dr. José Esparza", Soc. Venezolana Microbiología-Capítulo Carabobo. p. 47.
- JOBSON A., F. D. COOK y D. W. S WESTLAKE. 1972. Microbial utilization of crude oil. *Appl. Microbiol.* 23 (6): 1082-1089.
- KEPNER R. L. y J. R. PRATT. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: Past and present. *Microbiol. Reviews* 58(4): 603-615.
- LENDENMANN U., M. SNOZZI y T. EGLI. 1996. Kinetics of the simultaneous utilization of sugar mixtures by *Escherichia coli* in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (5): 1493-1499.
- MACMURRY J. 1992. *Organic Chemistry* (3 ed.). Brooks/Cole Publishing Co., California. 1212 pp.

- MADIGAN M. T., J. M. MARTINKO y J. PARKER. 2004. Brock Biología de los Microorganismos (10 ed.). Editorial Prentice Hall, Inc. 1011 pp.
- PORTER K. C. y Y. S. FREIG. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.* 25(5): 943-948.
- PRETSCHKE, T. CLERC, J. SEIBL y W. SIMON. 1980. Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos (1 ed.). Editorial Alhambra, España. 525 pp.
- SOTO L. 2001. Influencia de las relaciones bacterianas en el proceso de biodesulfuración de hidrocarburos aromáticos. Tesis Doctoral en Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela, Caracas. 150 pp.
- STANIER R. Y., E. A. ADELBERG y J. INGRAHAM. 1986. Microbiología. Versión Española actualizada de "The Microbial World" (4 ed.). Editorial Reverté, S. A., Barcelona-España. 931 pp.
- VOLKERING F., A. M. BREURE., A. STERKENBURG y J. G. VAN ADEL. 1992. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotech.* 36: 548-552.
- VAN HAMME J., A. SING y O. WARD. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 503-549.