

Caracterización fenotípica y molecular de poblaciones bacterianas aisladas de un suelo contaminado con diesel y sometido a dos tecnologías de biorremediación

Phenotypic and molecular characterization of bacterial populations isolated

from diesel-contaminated soil and treated by two bioremediation technologies

Recibido para evaluación: 20 de Febrero de 2012
Aceptación: 15 de Noviembre de 2012
Recibido versión final: 28 de Noviembre de 2012

Olga M. Arrieta R.¹
Angela P. Rivera R.²
Benjamin Rojano³
Orlando Ruiz⁴
Margarita M. Correa⁵
Astrid V. Cienfuegos Gallet⁶
Lida Arias⁷
Santiago A. Cardona G.⁸

RESUMEN

En este estudio se presenta la biorremediación como alternativa para la recuperación de ecosistemas contaminados. En este trabajo se realizó un derrame experimental de diesel sobre un suelo de pastoreo, el cual fue remediado haciendo uso de dos tecnologías de biorremediación: atenuación natural; conocida como la capacidad natural de los microorganismos nativos para degradar en un tiempo determinado cualquier compuesto xenobiótico, y bioestimulación; conocida como la adición al medio de nutrientes (fosforo y nitrógeno) con el fin de estimular el metabolismo de los microorganismos nativos, logrando con esto acelerar el proceso de degradación. Los resultados de la prueba de respirometría indicaron que ambos tratamientos produjeron valores significativos de remoción del hidrocarburo pero el tratamiento de bioestimulación se destacó con el 98,17% de degradación. Se obtuvieron siete aislamientos bacterianos a partir de las siembras realizadas, según la caracterización molecular pertenecen a los géneros: *Enterobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Sanguibacter*, *Staphylococcus* y *Flavobacterium*. Todos los aislamientos fueron capaces de metabolizar el diesel como fuente de carbono y energía; por ello y teniendo en cuenta que para algunos de estos microorganismos su papel en biorremediación no ha sido estudiado extensivamente, se recomienda continuar con su evaluación para conocer cuál es realmente su potencial para la solución de problemas ambientales.

Palabras Claves: Biorremediación, atenuación natural, bioestimulación, microbiología.

ABSTRACT

In this study bioremediation is presented as an alternative for the recovery of contaminated ecosystems. In this work an experimental diesel spill on pastureland was remediated using two bioremediation technologies: natural attenuation, which is the natural capability of indigenous microorganisms to degrade a xenobiotic component in a determined time, and biostimulation, which consist in the acceleration of the degradation process through the stimulation of the metabolism of indigenous microorganisms by the addition of nutrients (P and N) to the media. Results of respirometry assays indicated that both treatments produced significant levels of hydrocarbon removal but the biostimulation treatment stranded out with 98.17% degradation. Seven bacterial isolates were obtained from these treatments which according to their molecular characterization and phylogenetic analysis belong to the genus: *Enterobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Sanguibacter*, *Staphylococcus* and *Flavobacterium*. All isolates were able to metabolize diesel as a carbon and energy source; for this reason and taking into account that for some of these microorganisms their role in bioremediation have not been extensively studied, it is recommended to continue with their evaluation to know their real potential for the solution of environmental problems.

Key Words: Bioremediation, natural attenuation, biostimulation, microbiology.

1. M.Sc. en Medio Ambiente y Desarrollo. Pregrado en Microbiología UdeA
omarrietar@unal.edu.co

2. Ingeniera Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
aprivera@unal.edu.co

3. Dr., Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín,
brojano@unal.edu.co

4. Dr., Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín
osruiz@unal.edu.co

5. Dr., Universidad de Antioquia,
mcorrea@quimbaya.udea.edu.co

6. M.Sc., Universidad de Antioquia, acienfuegos@udea.edu.co

7. Dr., Universidad de Antioquia,
larias@udea.edu.co

8. Ph.D.M.Sc., Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, sacardona@unal.edu.co

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un ecosistema que contiene una gran variedad de poblaciones microbianas. Se ha estimado que la comunidad microbiana en un gramo de suelo puede contener más de mil diferentes especies de bacterias (Rosselló Mora y Amann, 2001), pero tan solo un 0,1-1% de los microorganismos son cultivables (Amann et al., 1995; Malik et al., 2008). Los estudios de las propiedades microbianas del suelo se han llevado a cabo comúnmente en procesos industriales, donde la biomasa, las tasas de respiración y la actividad de las enzimas han sido examinadas para descontaminar suelos (Hill et al., 2000).

La transformación de ecosistemas enteros a causa de derrames de hidrocarburos producto de descargas de efluentes contaminados, fugas en tanques subterráneos, afloramientos naturales a través de las fisuras de la corteza terrestre y pérdidas accidentales en puntos de distribución y almacenamiento, se constituyen como uno de los problemas ambientales más importantes (Verma et al., 2006). En la actualidad los suelos contaminados con estos compuestos representan cerca del 70% del total de los ecosistemas impactados (Ortiz et al., 2005).

Entre los hidrocarburos del petróleo contaminantes para el ambiente, se encuentra el diesel, el cual es una mezcla compleja de alcanos y compuestos aromáticos, que con frecuencia se presentan como contaminantes del suelo por fugas de los tanques de almacenamiento y las conducciones o en accidentes por derrames (Gallego et al., 2001). Una de las mejores alternativas para restaurar los suelos contaminados es por medio del uso de las poblaciones microbianas autóctonas, las cuales tienen la capacidad de degradar compuestos tóxicos, en un proceso conocido como biorremediación (Hill G.T et al, 2000). La biorremediación es una tecnología eficaz, económica y respetuosa con el ambiente (Alexander, 1999; Rittmann y McCarty, 2001), es aplicable en áreas grandes, y puede conducir en la mayoría de los casos, a la mineralización del contaminante (Frankenberger, 1992). Los procesos de biorremediación pueden ser divididos en tres clases: 1) Atenuación natural, la cual no es una tecnología propiamente dicha, pues en ella la concentración del contaminante es reducida por los microorganismos nativos del suelo, sin recibir ningún estímulo de nutrientes y oxígeno. 2) Bioestimulación, en esta tecnología se adicionan nutrientes y oxígeno al sistema para mejorar su efectividad y acelerar la biodegradación (Seklemova et al., 2001). 3) Bioaumentación, consiste en la inoculación en el sitio contaminado de un consorcio microbiano con capacidad degradativa conocida (Richard y Vogel, 1999; Barathi y Vasudevan, 2001; Salinas et al., 2007). Una de las dificultades en el desarrollo de las estrategias de biorremediación reside en el logro de buenos resultados, tanto en campo como en el laboratorio (Juhász et al., 2000).

Por otro lado, pese a existir una gran diversidad microbiana en el suelo, no todos los microorganismos allí presentes tienen la capacidad de crecer en medios de cultivo tradicionales, y menos en aquellos suplementados con hidrocarburo (diesel), como única fuente de carbono y energía, debido a algunas propiedades del petróleo como: hidrofobicidad y flotación (Lin et al., 2005; Ronald, 1995), las cuales entorpecen el crecimiento y desarrollo de los microorganismos presentes en el suelo, y con ello se dificulta la caracterización y evaluación del papel desempeñado por las comunidades microbianas presentes en sitios contaminados. Por ello actualmente, las técnicas moleculares independientes de cultivo y comúnmente utilizadas para estudiar dichas comunidades, se basan frecuentemente en el análisis del DNA ribosomal que codifica para la subunidad pequeña del gen 16S. Este constituye un marcador molecular muy adecuado dado que está presente en todos los organismos, tiene una tasa de evolución baja y presenta tanto regiones conservadas como variables (Bracho, 2007). Se considera que el empleo simultáneo del cultivo y métodos fenotípicos continúa siendo de gran utilidad para la obtención de cepas puras que puedan ser utilizadas en estudios posteriores (Thompson, *et al.*, 2005). El objetivo de este estudio fue aislar e identificar por métodos fenotípicos y moleculares cepas bacterianas con capacidad de utilizar el diesel como fuente de carbono y energía, y evaluar su tasa de degradación mediante dos tecnologías de biorremediación, atenuación natural y bioestimulación, con el fin poder emplearlas como herramientas estratégicas en la recuperación de ecosistemas alterados.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Obtención y caracterización del suelo

Para este estudio se utilizó un suelo con funciones de pastoreo, el cual no había presentado contaminación previa con hidrocarburos. El suelo fue extraído de predios de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, Facultad de Agronomía. La caracterización del suelo se realizó en el Laboratorio

de Química de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, allí se midieron los siguientes parámetros: textura, pH, materia orgánica, nitrógeno (NO_3^- y NH_4^+) y fósforo (Jaramillo, 1998).

2.2. Tratamientos de Biorremediación

El suelo se atomizó con 40.000 ppm de diesel comercial, obtenido en una estación de gasolina local. Se llevaron a cabo dos tratamientos para evaluar la eficiencia de la degradación del diesel en el suelo contaminado. Los tratamientos fueron: (a) atenuación natural y (b) bioestimulación, además, un tratamiento control, que consistió en un suelo esterilizado en autoclave a 121 °C, durante 30 min; todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Los microcosmos fueron establecidos con muestras de 2.000 g de suelo en bandejas de aluminio. El experimento tuvo una duración de 4 meses, los tratamientos permanecieron en un cuarto a temperatura ambiente (22 °C), se realizó monitoreo semanal de las variables ambientales que influyen en el proceso de biodegradación, como son: pH, temperatura, humedad. Adicionalmente se realizó un control de la volatilización del diesel, para esto se utilizó una probeta con una cantidad conocida del hidrocarburo, ésta se expuso al ambiente, y durante el tiempo de la experimentación se midió la cantidad de diesel que se perdía por procesos de evaporación.

En el tratamiento de bioestimulación se adicionaron 40,22 g de Urea (CON_2H_4) y 5,98 g de Tripolifosfato ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), en tres aplicaciones cada 8 días. Las bandejas fueron agitadas semanalmente para favorecer el proceso de aireación, el cual mejora las tasas de degradación por volatilización al facilitar la migración de la fase volátil de los contaminantes y por biodegradación, dado que al incrementar la oxigenación en el suelo se estimula la actividad bacteriana (Maroto y Rogel, 2002).

2.3. Análisis del suelo

Se tomaron muestras de los tratamientos experimentales para realizar los análisis físico-químicos y microbiológicos. Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Química de Suelos de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

2.3.1. Prueba de respirometría

Conocer la tasa de respiración microbiana en el suelo (mg de CO_2 / gr suelo), es de gran importancia, puesto que con los resultados de las concentraciones, eficiencias de remoción y bacterias heterótrofas, puede tenerse un panorama completo para identificar el motivo por el cual se ve favorecida la degradación. La actividad microbiana se demuestra por la producción de CO_2 , la cual indica que los microorganismos al consumir los contaminantes están consumiendo oxígeno y lo liberan como CO_2 . Para los análisis respirométricos se tomaron 50 g muestra por tratamiento y se siguió el procedimiento descrito por *Nannipieri* (Cookson, 1995).

2.3.2. Extracción de hidrocarburos totales

Para la recuperación de los hidrocarburos totales de petróleo (HTPs) del suelo, se empleó el método de agitación - centrifugación (Schwab et al., 1999).

El procedimiento fue el siguiente:

En viales de polipropileno de 50ml para centrifuga se depositó 1g de suelo seco al cual se le adicionaron 2,5 g de Na_2SO_4 anhidro (Panreac®, Barcelona, España), luego se agregó a cada vial 5 ml de diclorometano grado analítico (Chemi, Barcelona, España) y se llevo al vortex por 90 segundos. Las muestras fueron centrifugadas en un equipo Jouan serie MR22 a 7000 rpm durante 20 minutos. El proceso de lavado del suelo se repitió dos veces más sobre el residuo sólido remanente hasta lograr un volumen aproximado de 15 ml de sobrenadante. Se empleó un rotaevaporador Heidolph (Laborota 4003-control) operando a una temperatura de 40°C y una presión de 740 mmHg para separar el extracto orgánico del solvente, el cual finalmente se resuspendió en 1ml de diclorometano en viales ámbar de 1,5 ml (Agilent) provistos de tapas roscadas con tapón de teflón. Las muestras fueron almacenadas a una temperatura de -5°C hasta finalizar los muestreos para ser analizadas por cromatografía de gas acoplada a masas usando un estándar de diesel determinado.

2.3.3. Aislamiento y cultivo de microorganismos

En condiciones estériles, se prepararon 500 ml de solución salina, se adicionó 1 g del suelo a una botella o matraz con tapa de rosca con 99 ml de solución salina isotónica estéril (dilución 10^{-2}), se homogenizó con agitación vigorosa en vortex. Posteriormente, se tomó 1 ml y se transfirió a un tubo con 9 ml de solución salina estéril para una dilución 10^{-3} ; a partir de esta, se hicieron diluciones sucesivas hasta obtener la dilución 10^{-9} , se utilizó una punta o pipeta estéril para realizar cada dilución. Se agitó de forma constante con vórtex en cada paso. Se tomó 0,1 ml de la dilución seleccionada y se colocó en el centro de la superficie del medio de cultivo. Se realizó la siembra por triplicado y con tres diluciones consecutivas, para asegurar que el recuento se hiciera en forma correcta. Se extendió la alícuota en la superficie de la placa con una varilla de vidrio previamente esterilizada por inmersión en alcohol y pasándola por la flama de un mechero, asegurándose que estuviera fría antes de entrar en contacto con la muestra. Se incubaron las placas de forma invertida a temperatura ambiente por un periodo de 3 a 5 días. Se empleó el medio Luria Bertani, LB (Difco™), para el aislamiento de microorganismos heterótrofos y el medio mineral Bushnell – Hass, BH (Difco™), para el aislamiento de microorganismos hidrocarbonoclastos.

2.3.4. Medios de cultivo empleados

Medio Luria Bertani, LB (Difco™). Este medio se empleó para el aislamiento de microorganismos heterótrofos. Su contenido por litro fue: Bacto triptona 10g, extracto de levadura 5g y NaCl 10 g.

Medio mineral Bushnell – Hass, BH (Difco™). Este medio se empleó para el aislamiento de microorganismos hidrocarbonoclastos, su contenido por litro fue: $Mg\ SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2g, $CaCl_2$ 0,02g, KH_2PO_4 1.,0g, $(NH_4)_2\ HPO_4$ 1.0g, KNO_3 1.0g, $FeCl_3$ 0.05g.

Para la preparación de ambos medios se siguieron las recomendaciones del fabricante. Después de realizar la esterilización del medio y antes de servirlo en las cajas de petri, se realizó la adición del diesel 1% V/V, en condiciones de esterilidad, para esto se empleó un filtro de 0,20 μ , dado que un combustible no puede agregarse al medio de cultivo antes de la esterilización.

2.3.5. Caracterización fenotípica de los microorganismos aislados

Para la caracterización *fenotípica* de los microorganismos aislados en cultivo, se usaron las siguientes pruebas bioquímicas:

Coloración de Gram: se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el *Clinical Microbiology Procedures Handbook* (2010).

Prueba de Oxidasa: para la detección de la enzima citocromo oxidasa se seleccionó una colonia aislada y se impregnó sobre una tirilla que contenía 0,1 μ mol N,N-Dimetil-1,4 fenilén cloruro diamonio y 1,0 μ mol 1-naftol (Bactident® Oxidase, Darmstadt, Alemania). La lectura se realizó entre 20 y 60 segundos después de impregnada la tirilla. Se consideró una reacción positiva el viraje de color de la tirilla hacia azul o violeta.

Prueba de Catalasa: para la detección de la catalasa se seleccionó una colonia aislada y se colocó sobre un portaobjetos limpio y seco, y se agregó una gota de peróxido (H_2O_2 al 3%). Se consideró una reacción positiva la presencia de burbujas después de adicionar el peróxido.

Identificación de *Staphylococcus* spp: para la identificación de especies de *Staphylococcus* se utilizó el kit *Slidex Staph Plus* (Biomériux, Marcy l'Etoile, Francia). Este es un sistema de detección simple, basado en un látex azul sensibilizado con fibrinógeno humano y anticuerpos monoclonales; permite detectar simultáneamente el factor *clumping*, la proteína A y un antígeno específico del grupo ligado a la estructura periférica de *Staphylococcus aureus*. Se consideró una reacción positiva la presencia de aglutinación.

2.3.6. Caracterización molecular de los microorganismos aislados.

Extracción de ADN: para la extracción de ADN genómico se empleó el kit DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN, Hilden, Alemania). Para ello, se replicó una colonia de cada una de las cepas aisladas en agar LB a medio líquido Infusión-Cerebro-Corazón (BHI, Oxoid, Hampshire, Reino Unido)

y se incubó a 37°C en agitación durante 18 horas. La extracción de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Amplificación del gen ribosomal 16S: el gen ribosomal 16S (16S ADNr) fue amplificado usando los cebadores universales Eubac 27F (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') y 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Dunbar et al., 1999). La amplificación se realizó en un volumen final de 50 µL, conteniendo 4 µL de ADN, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 67 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.01% Tween-20, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,5 µM de cada cebador y 1,9 unidades de BIOLASE™ DNA Polymerase (Biolone, Londres, Reino Unido). La amplificación fue realizada en un termociclador *iCycler* (BioRad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 25 ciclos, desnaturalización a 94°C durante 30 seg, alinamiento a 50°C durante 30 seg, extensión a 72°C durante 1 min, y un paso de extensión final a 72°C durante 5 min. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1, con tinción de bromuro de etidio (5 µg/mL) en el Sistema de Imágenes GelDoc-It® (UVP, Upland, Estados Unidos). El tamaño de los productos de PCR (~1000 pb) fue determinado utilizando el marcador molecular HyperLadder I™ (Biolone, Londres, Reino Unido). Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados utilizando el kit QIAquick Spin (QIAGEN, Hilden, Alemania) y secuenciados en ambos sentidos, utilizando los cebadores Eubac 27F y 1492R por medio de un equipo ABI Prism 3730xl (PE Applied Biosystems).

Análisis de las secuencias obtenidas: las secuencias del gen ribosomal 16S fueron analizadas utilizando el programa Geneious Pro (Biomatters Ltd). Inicialmente se alinearon las secuencias sentido y anti-sentido de cada aislamiento, y se aclararon las ambigüedades existentes utilizando como criterio un valor de calidad mínimo (*Q value*) ≥ 20. Luego, las secuencias fueron comparadas con aquellas reportadas en *The International Gene Bank* (National Center for Biotechnology Information-NCBI), utilizando la herramienta BLASTN (Altschul, et al., 1990), y se seleccionaron como referentes las secuencias con mayor porcentaje de similitud obtenidas. Adicionalmente, las secuencias fueron analizadas con la herramienta *Classifier* del *Ribosomal Database Project* (Cole et al., 2009), para obtener la clasificación taxonómica de cada uno de los microorganismos aislados de acuerdo al análisis del rRNA implementado en esta herramienta (Wang et al., 2007). Posteriormente, se realizó un alineamiento de las secuencias de los aislamientos obtenidos y las secuencias descargadas de *GenBank* utilizando el programa *MUSCLE* (Edgar, 2004). Para determinar las relaciones genéticas entre éstas secuencias, se construyó un árbol de similitud usando el algoritmo Neighbor-Joining (NJ) (número de diferencias, 10.000 réplicas) en el programa MEGA versión 5 (Tamura et al., 2011). Todas las secuencias obtenidas en este estudio fueron registradas en GenBank.

2.3.7. Microscopia Electrónica de Barrido (MEB)

El estudio de microscopia electrónica de barrido se realizó a las cepas bacterianas aisladas en el experimento, con el fin de corroborar la morfología y disposición de los aislamientos. Se usó un microscopio electrónico de barrido de marca Jeol JSM -5910 LV Scanning Electrón Microscope. El estudio se realizó en el Laboratorio de Microscopia Avanzada de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización del suelo

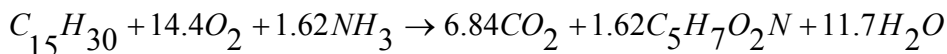
Con base a los resultados obtenidos de la caracterización del suelo (tabla 1), se puede observar que el suelo extraído se ubica en la clase arcilloso, siendo muy compacto y fino en ausencia de humedad y muy plástico y pantanoso en presencia de esta. El suelo inicialmente mostró una variedad de marcas de color ocre que son comúnmente atribuidas al alto contenido de hierro (Schwertmann and Taylor, 1989) (tabla 1). Después del derrame con el hidrocarburo la textura del suelo no fue afectada, pero el contenido de materia orgánica, hierro, magnesio y fósforo tuvo cambios significativos, al igual que la presencia de nitritos y nitratos, los cuales aumentaron el doble del valor inicial.

3.2. Degradación del hidrocarburo

Se realizaron pruebas de respirometría para conocer si la población microbiana estaba

asimilando el hidrocarburo como fuente carbono y energía.

La fórmula para describir la reacción de oxido-reducción del compuesto orgánico es la siguiente:



La relación molar entre el diesel consumido y el CO₂ producido se presenta en la figura 1. En esta se compara el porcentaje de rendimiento que se obtuvo en cada uno de los tratamientos al cabo de 61 días de experimentación.

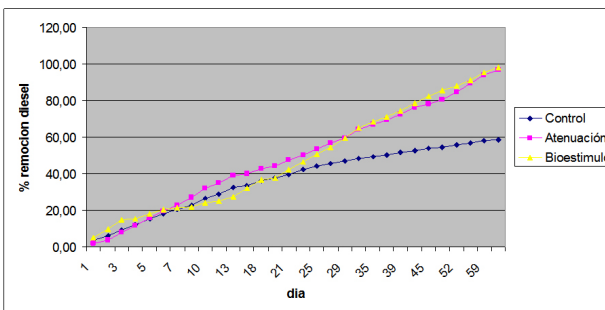
Tabla 1. Caracterización del suelo antes y después de la contaminación experimental y resultados de la prueba de respirometría.

Características	Antes del derrame	Después del derrame	Respirometría		
			Control	Atenuación	Bioestimulo
A%	28	28			
L%	28	28			
Ar%	44	44			
Clase	Arcilloso	Arcilloso			
pH	5,5	5,6	4,3	5,4	7,7
Materia Orgánica %	4,2	10,7	7,4	7,9	7,3
Ca cmolc kg ⁻¹	10,8	10,8	10,7	10,7	8,3
K cmolc kg ⁻¹	6,9	6,6	0,27	0,28	0,29
Mg cmolc kg ⁻¹	0,28	0,52	0,0	0,28	0,29
CICE	18	18	18,7	18,2	14
P	40	47	25	26	117
S	11	15	5	1	4
Fe	239	265	227	216	180
Mn	28	49	150	98	48
Cu	6	7	4	5	4
Zn	10	10	13	10	7
B	0,39	0,32	0,34	-	-
N-NO ₃	1,5	3	9	5	6
N-NO ₄	7	14	140	27	1620

En la tabla: A%: porcentaje de arena, L%: porcentaje de limo, Ar%: porcentaje de arcilla. Antes y después del derrame (Arrieta et al., 2012).

La prueba de respirometría presenta una visión del comportamiento del microcosmos establecido para los dos tratamientos y el control, por tanto se demuestra que aunque se haya esterilizado el suelo control, este obtuvo una alta actividad microbiana, como se evidencia por la producción de CO₂ y por el porcentaje de remoción del contaminante (58,82%), alcanzado al cabo de 61 días de incubación (Figura 1). También se observó que la degradación del diesel en el tratamiento de atenuación natural es mucho más constante que la observada en el tratamiento de bioestimulación, aunque durante los primeros días de incubación, bioestimulo mostró el doble de actividad, con un 14,7 % frente a un 7,9% obtenido por atenuación natural. Luego de 61 días de experimentación se obtuvo mayor remoción en el tratamiento de bioestimulación con un 98,2%, seguido por el tratamiento atenuación natural que alcanzó a remover el 96,7% de diesel. Este comportamiento se correlacionó con la extracción de hidrocarburos totales que fue observada en las muestras de los diferentes tratamientos, por cromatografía de gas-masa (Figura 2).

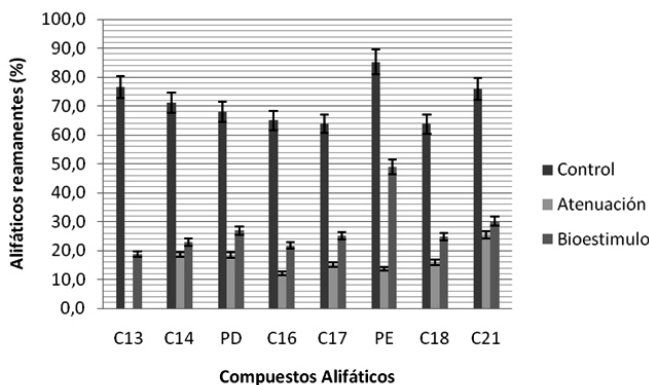
Figura 1. Porcentaje de remoción total de diesel en los diferentes tratamientos.



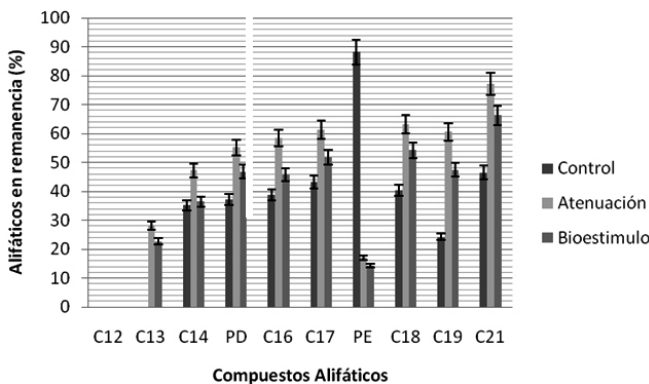
Estos resultados demostraron una actividad aumentada del consorcio bacteriano presente en el tratamiento de bioestimulación, observándose para los compuestos alifáticos, específicamente

pentadecano, T (PD) y el pentadecano 2, 6, 10, 14 tetrametil, T (PE), valores menores de remanencia del hidrocarburo en comparación con el tratamiento de atenuación natural. El tratamiento control presenta una disminución en la concentración final del hidrocarburo, lo cual puede atribuirse a varias razones, entre ellas, la acción fúngica oportunista, pues aunque el suelo fue esterilizado al inicio de la experimentación, éste volvió a exponerse al ambiente, con lo cual, los hongos y algunas bacterias ambientales pudieron colonizarlo nuevamente. También es posible que al realizar la esterilización, los microorganismos allí presentes empezaron a formar parte de la materia orgánica del suelo aumentando considerablemente su valor, esto pudo generar un aumento en los sitios de adsorción, disminuyendo con esto la concentración en la fase acuosa y gaseosa del hidrocarburo- diesel-, así mismo su transporte y biodisponibilidad, afectando la migración, retención y transformación de compuestos orgánicos en el suelo. Lo anterior puede incidir en el valor de HTPs remanentes en el tratamiento control.

Teniendo en cuenta que todos los tratamientos tuvieron una etapa de disminución del porcentaje de degradación del hidrocarburo, es posible que exista una complejidad en las fracciones del contaminante que comienzan a degradarse en las diferentes fases de crecimiento; de acuerdo a esto, podría pensarse que existe una etapa inicial en la cual los microorganismos se estimulan por las fuentes de hidrocarburos lábiles (probablemente hidrocarburos lineales y de cadena abierta), lo cual puede inducir un alto porcentaje de degradación, pero con la disminución de las fuentes de carbono lábil, es probable que haya una limitación en los nutrientes que apoyan el crecimiento microbiano (Frankenberger et al., 2005). También es posible que la degradación de hidrocarburos de mayor peso molecular pueda producir subproductos tóxicos que inhiban el crecimiento y desarrollo de microorganismos degradadores del diesel (Frankenberger, 1992).



(a)



(b)

Figura 2. Hidrocarburos remanentes después de (a) 10 y (b) 60 días de tratamiento.

La adición de nutrientes en el tratamiento de bioestimulación produjo la mayor degradación de diesel. Pese a que la atenuación natural es un método que ha probado ser eficiente en la degradación

de compuestos tóxicos, presenta algunas desventajas al requerir mayor tiempo de acción, aumentando con esto los costos de operación. En el experimento se obtuvo porcentajes de degradación similares para las dos tecnologías de biorremediación evaluadas, esto puede explicarse por un posible cambio en el aceptor final de electrones en el tratamiento de bioestimulación, entre los días 10 y 20 de la experimentación, durante este tiempo se presentó un fuerte olor amoniacal, lo cual sugiere un posible estado anóxico al interior del microcosmos, lo cual pudo generar un bajo rendimiento del consorcio bacteriano. Este comportamiento es explicado químicamente por tener al nitrógeno como último aceptor de electrones en vez del oxígeno, y biológicamente, porque en sistemas aeróbicos parte del amoníaco puede ser oxidado a nitrito y nitrato, por bacterias autóctonas (Cookson, 1995). Este razonamiento fue reforzado por los datos obtenidos en el último reporte de análisis de suelo (Tabla 1), que mostró un elevado porcentaje de nitratos en comparación con los otros tratamientos, además de un 26,9% y 49% de remanencia de hidrocarburos, PD y PE (C-15) respectivamente, en bioestimulo, en contraste con un 18,3% y 13,7% en atenuación natural (figura 2b).

En otras investigaciones se ha constatado la importancia que tienen los nutrientes y sus efectos, si el suministro es el óptimo, como Seklemova et al., (2001) encontraron que la adición de nutrientes no tuvo ningún efecto sobre la descontaminación de un suelo forestal contaminado con aceite diesel; mientras que Gallego et al., (2001) al evaluar los procesos de biorremediación in situ demostraron que en condiciones de laboratorio es posible degradar hasta el 90% de diesel utilizando los compuestos inorgánicos N y P. Por su parte Milis et al., (1994) evaluaron el efecto de las fuentes de fósforo sobre la degradación del combustible diesel, e informaron que la degradación depende del fósforo y que la biodisponibilidad de los nutrientes es un factor importante para una estrategia de biorremediación eficiente. La presente investigación constituye una evidencia más de la utilidad que presenta la bioestimulación, como alternativa para la recuperación de sitios contaminados con hidrocarburos.

3.3. Microorganismos aislados

A partir de las siembras realizadas durante la experimentación, lograron aislarse 7 cepas bacterianas capaces de utilizar el diesel como fuente de carbono y energía.

3.3.1. Caracterización fenotípica de los microorganismos aislados

Los resultados de la caracterización fenotípica se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Resultados de morfología, tinción de Gram, catalasa, oxidasa y coagulasa de los siete morfotipos aislados.
N/A: No Aplica

Códigos	Coloración Gram	Catalasa	Oxidasa	Coagulasa
B1	Bacilo Gram negativo	positiva	negativa	N/A
B2	Bacilo Gram positivo	positiva	negativa	N/A
B3	Coco Gram positivo	positiva	negativa	positiva
B4	Bacilo Gram positivo	positiva	negativa	N/A
B5	Bacilo Gram positivo	positiva	negativa	N/A
B6	Bacilo Gram negativo	positiva	positiva	N/A
B7	Bacilo Gram positivo	positiva	negativa	N/A

3.3.2. Caracterización molecular y diferenciación genética de los microorganismos aislados

Se obtuvo amplificación de una banda de ~1500 pb correspondiente al gen 16S del RNA ribosomal en los siete aislamientos obtenidos a partir de cultivo. El análisis de secuencias mostró similitud del gen 16S con las clases Bacilli, Actinobacteria, Gammaproteobacteria y Flavobacteria. La Tabla 3 presenta la identificación molecular y la clasificación por clase de las cepas aisladas.

Tabla 3. Identificación molecular y clasificación por clase de las cepas aisladas.

Clase	Código	Identificación
<i>Bacilli</i>	B2	<i>Bacillus</i> sp
	B3	<i>Staphylococcus aureus</i>
	B5	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Actinobacteria</i>	B4	<i>Arthrobacter</i> sp
	B7	<i>Sanguibacter soli</i>
<i>Gammaproteobacteria</i>	B1	<i>Enterobacter</i> sp
<i>Flavobacteria</i>	B6	<i>Flavobacterium</i> sp

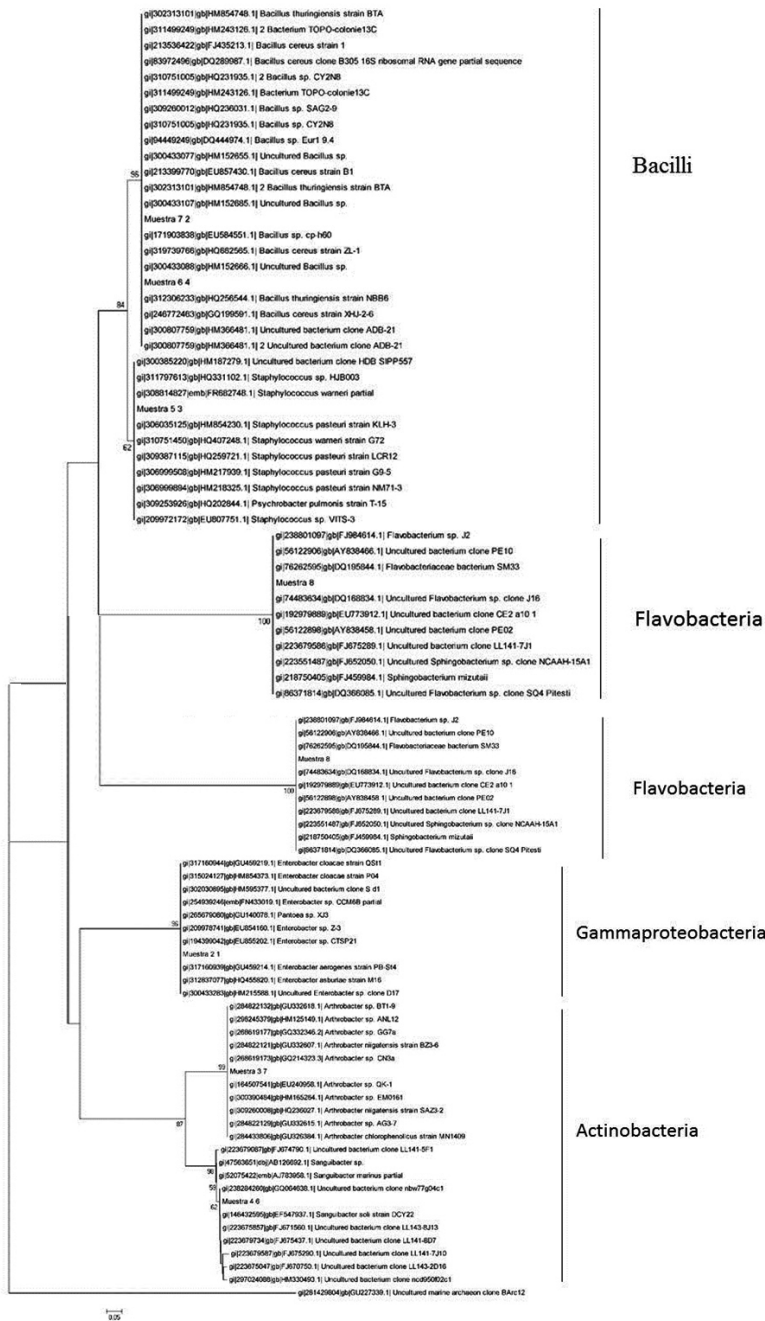


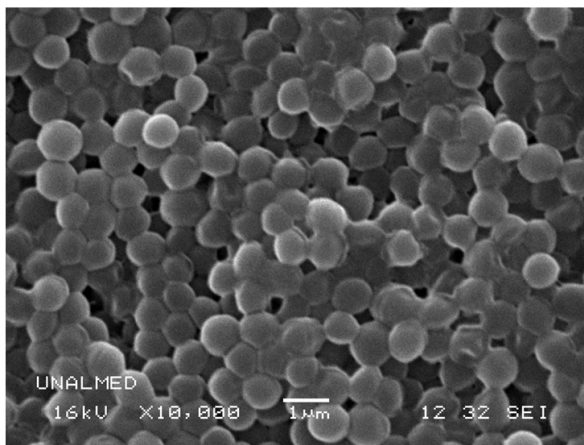
Figura 3. Relación genética entre las secuencias inferida utilizando el método Neighbor-Joining.

El porcentaje de árboles replicados en los que las secuencias agrupan juntas en la prueba de bootstrap (1000 repeticiones) se muestra en cada rama. La distancia evolucionaria fue computada utilizando la opción Maximun Composite Likelihood. El análisis se realizó con 78 secuencias. Todas las posiciones que contenían gaps fueron eliminadas.

3.3.3. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) de los microorganismos aislados

Por medio de un microscopio electrónico de barrido lograron captarse algunas imágenes de la morfología y agrupación de las cepas aisladas en el experimento.

Figura 4. Microscopia Electrónica Secuencial de Barrido del aislamiento B3. Estructura de *Staphylococcus*



4. CONCLUSIONES

La caracterización físico- química y biológica del suelo fue muy importante para determinar los parámetros de los dos tratamientos aplicados y realizar el seguimiento de la descontaminación del suelo por la acción de las bacterias. A partir de allí se encontró que el tratamiento bioestimulación obtuvo un mayor porcentaje de remoción de hidrocarburos seguido de la atenuación natural. El control del pH, la aireación, y la cantidad de nutrientes, fueron parámetros determinantes para el éxito del sistema de biorremediación.

Se aislaron 7 cepas bacterianas pertenecientes a las clases Bacilli, Actinobacteria, Gammaproteobacteria y Flavobacteria. Estos aislamientos fueron capaces utilizar el diesel como fuente de carbono y energía, a partir de un suelo contaminado artificialmente que no había tenido exposición previa a contaminación por hidrocarburos. Esto sugiere que las bacterias autóctonas de los sitios de derrame podrían tener la capacidad de adaptarse y utilizar otras fuentes de energía para su crecimiento, por lo que se propone que aislamientos de géneros que aun no han sido muy estudiados, como es el caso de *Sanguibacter* spp, deben ser evaluados con mayor detalle para conocer su potencial real y así poder ser empleados en procesos de biorremediación.

5. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto se realizó con financiación de la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín (DIME, proyecto 20201008203). Agradecemos a: Edison Alexander Agudelo por su amable disposición en asesoría del presente trabajo. A Nancy Vanegas por su constante apoyo y permitir el uso del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Nacional Sede Medellín. A Wilmar Castrillón funcionario del Laboratorio de Química de Suelos por su apoyo en el proceso de preparación del suelo y a todas las personas que con su apoyo y colaboración participaron en la culminación de la investigación. Al ingeniero Medardo Antonio Pérez del laboratorio de Microscopia Avanzada de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. A los profesores Benjamín Rojano y Orlando Ruiz de la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

REFERENCIAS

- Alexander, M. (1999). Biodegradation and Bioremediation, Academic Press, San Diego, CA, USA.
- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal Mol Biol.
- Amann, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. (2001) Phylogenetic Identification and In Situ Detection of

Individual Microbial Cells without Cultivation. Microbiology.

- Arenas, S. (1999). Aislamiento y caracterización de bacterias de ambientes contaminados por petróleo en la refinería "La Pampilla". UNMSM. Lima. (Tesis para optar al título de biólogo).
- Arrieta, O., Rivera, A., Arias, L., Rojano, Ruiz, O., y Cardona, S. (2012). Biorremediación de un suelo con diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Revista Gestión y Ambiente*.
- Ausubel, F.M.; Brent, R.; Kingston, R.E.; Moore, D.D.; Seidman, J.A.; Smith, J.G. (1997). *Current protocols in molecular biology*, unit. 24. New York: John Wiley and Sons.
- Rittmann, B.E.; McCarty, P.L. (2001). *Environmental Biotechnology: Principles and Application*, McGraw-Hill, New York, USA.
- Barathi, S.; Vasudevan, N. (2001). Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* fluorescence isolated from a petroleum-contaminated soil. *Environ Int.*
- Benson, D.A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D.J.; Ostell, J.; Wheeler, D.L. (2008). GenBank. *Nucleic Acids Res.*
- Bracho R.; Dina P. (2007). Degradación de p- nitrofenol por bacterias en los ríos añasco y guanajibo y la quebrada de oro (Puerto Rico). Universidad de Puerto Rico.
- Bushnell, L.D.; Haas, H.F. (1941). The Utilization of Certain Hydrocarbons by Microorganisms. *Journal Bacteriology*.
- Cookson, J. (1995). *Bioremediation Engineering*. Edi. Mc Graw Hill. U.S.A.
- Dunbar, J.; Takala, S.; Barns, S.M.; Davis, J.A.; Kuske, C.R. (1999). Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiology*.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE. A multiple sequence alignment method with time and space complexity. *BMC Bioinformatics*.
- Farinazleen, G.; Raja, R.; Bakar, A.; Mahiran, S. (2004). Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation*.
- Ferrera R.; Rojas, N.; Poggi, H.M.; Alarcón, A.; Cañizares, R.O. (2006). Processes of bioremediation of soil and water which were contaminated by oil hydrocarbons and other organic substances. *Rev Latinoamericana Microbiology*.
- Flores P.G. (2002). Biodegradación de asfaltenos por un consorcio microbiano aislado de petróleo crudo "MAYA". *Int. Contam. Ambient.*
- Frankenberger W.T. (1992). The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In: Calabrese, E.J., Kosteci, P.T. (Eds.), *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater*. Lewis, Boca Raton, FL.
- Frankenberger, W.T.; Bento, F.; Camargo, F.; Okeke, B. (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*.
- Gallego, J.R.; Loredó, J.; Llamas, J.F.; Vázquez, F.; Sánchez, J. (2001). Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*
- Hill, G.T.; Mitkowskia, N.A.; Wolfe, A.L.; Emele, R.; Jurkonie, D.D.; Ficke, A.; Maldonado, S.; Lynch, S.T.; Nelson, E.B. (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities *Applied Soil Ecology*.
- Ijah, U.J.; Antai, S.P. (2003). Removal of Nigerian light crude oil in soil over a 12-month period. *International Biodeterioration & Biodegradation*.
- Jaramillo, D.F. (1998). *Introducción a la ciencia del suelo*. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Juhasz, A.; Stanley, G.A.; Britz, M.L. (2000). Degradation of high molecular weight PAHs in contaminated soil by a bacterial consortium: effects on Microtox and mutagenicity bioassays. *Bioremed. J.*

- Korda, A.; Santas, P.; Tenente, A.; Santas, R. (1997). Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl. Microbiology Biotechnology*.
- Lin, T.C.; Young, M.J.; Ho, M.S.; Yeh, C.L.; Chou, Y.H.; Chang, J. S. (2005). Characterization of Floating Activity of Indigenous Diesel-Assimilating Bacterial Isolates," *J. Biosci. Bioeng.*
- López J.B.; Quintero, G.; Guevara, A.L.; Jaimes, D.C.; Gutiérrez, S.M.; García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Nova.
- Madigan M.; Martinko, J.; Parker, J. (1999). *Biología de los Microorganismos*, Brock. Pearson- perlice Hill. Decima edición.
- Seidu, M.; Michael, B.; Mallavarapu, M.; Ravi, N. (2008). The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water. Review article. *Environmental International*.
- Maroto, M.E., Rogel, J.M. (2002). Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y Aguas contaminadas por hidrocarburos. *MMWR* URL disponible [En línea] En: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdflib15/028.pdf>, [Consulta: 03 de septiembre de 2010].
- Merino, F. (1998). Estudio de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo. UNMSM. Lima-Perú.
- Mills, S.A.; Frankenberger Jr., W.T., (1994). Evaluation of phosphorus sources promoting bioremediation of diesel fuel in soil. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*
- Lin, T.C.; C. C. Young, M. J. Ho, M. S. Yeh, C. L. Chou, Y. H. Wei, and J. S. Chang. (2005). Characterization of Floating Activity of Indigenous Diesel-Assimilating Bacterial Isolates. *J. Biosci. Bioeng.*
- Ortiz, E., Nuñez, R., Fonseca, E., Oramas, J., Almazán, V., Cabranes, Y., Miranda, A., Barbán, O., Martínez, C., Díaz, Y., Borges, G. (2005). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Contribución a la educación y protección del medio ambiente.
- Rossello-Mora R, Amann R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.*
- Richard, J.Y., Vogel, T.M. (1999). Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *Int. Biodet. Biod.*
- Salinas A., Santos M., Soto O., Delgado E., Pérez H., Aguad L. y Medrano H. (2007). Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. *Journal of Environmental Management* 88, 115-119.
- Seklemova, E., Pavlova, A., Kovacheva, K. (2001). Biostimulationbased bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*.
- Seklemova, E., Pavlova, A., Kovacheva, K. (2001). Biostimulationbased bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*.
- Silva R, Miladis C, Gómez J, Rodríguez Arelis, Viñas M. y Cantero D. (2008). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*.
- Schwab A., Su J., Wetzel S., Pekarek S., y Banks M. (1999). Extraction of petroluem hidrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environ. Sci. Technol.*
- Thompson, I.P., Van Der Gast, C., Ciric, L. Y Singer, A.C. (2005) Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental microbiology*.
- Viñas M. (2005). Biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos: caracterización química, microbiológica y ecotoxicológica. *Facultat de Biologia, Departamento de Microbiologia, Universidad de Barcelona-Espana*.
- Ying Huang, Xin Dai, Liang Éi, Wang Ya Nan-, Bao-Jun Wang, Zhiheng Liuy Liu Shuang Jiang. (2005). *Sanguibacter marinus* sp., aisladas de sedimentos costeros. *Unión Internacional de Sociedades de Microbiología*.