

Biorremediación de un suelo con diesel

Mediante el uso de microorganismos autóctonos

Bioremediation of soil with diesel

Through the use of autochthonous microorganisms.

Recibido para evaluación: 06 de Diciembre de 2010
Aceptación: 27 de Marzo de 2012
Recibido versión final: 17 de Abril de 2012

Olga Maria Arrieta Ramírez¹
Angela Patricia Rivera Rivera²
Lida Arias Marin³
Benjamín Alberto Rojano⁴
Orlando Ruiz⁵
Santiago Alonso Cardona Gallo⁶

Resumen

En este estudio, se aisló y caracterizó bioquímica y molecularmente un consorcio bacteriano capaz de degradar los diferentes hidrocarburos presentes en un combustible diesel, conformado por los siguientes géneros: *Enterobacter sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Sanguibacter soli*, *Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*, a partir de un suelo contaminado con diesel a escala de laboratorio, y tratado mediante 2 tecnologías de biorremediación: atenuación natural y bioestimulación. Se definió como parámetro de control la concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) y para el cual, se obtuvo una reducción en la concentración en un periodo de 4 meses de 36,86% para atenuación natural y 50,99% para bioestimulación. La medición de la eficiencia de remoción de hidrocarburos se cuantificó por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).

Palabras claves: Consorcio bacteriano, Hidrocarburos, Biorremediación, Atenuación Natural, Bioestimulación.

Abstract

In this study was isolated and characterized biochemical and molecular a bacterial consortium able to degrade hydrocarbons several, comprised of the following genres: *Enterobacter sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Sanguibacter soli*, *Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*, from soil contaminated with diesel fuel in a laboratory scale, and treated with two technologies for bioremediation: natural attenuation and biostimulation. We obtained a reduction in the concentration of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) in a period of 4 months was 36,86% for natural attenuation and 50,99% for biostimulation. Measuring the oil removal efficiency was quantified by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

Keywords: Bacterial Consortium, Hydrocarbons, Bioremediation, Natural attenuation, Biostimulation.

1. Magister en Medio Ambiente y Desarrollo, Especialista en Gestión Ambiental, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

2. Ingeniera Biológica, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

3. Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín.

4. Grupo de Investigación en Ciencia de los Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

5. Director Laboratorio de Suelos, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

6. Escuela de Geociencias y Medio Ambiente, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín

1. INTRODUCCIÓN

La generación de impactos ambientales adversos en los diferentes compartimentos ambientales constitutivos de un entorno a causa de aportes intencionales y no intencionales (incidentes y accidentes) con fugas y derrames de hidrocarburos, así como afloramientos naturales, se constituyen en uno de los problemas ambientales más importantes para el recurso suelo (Verma et al., 2006). En la actualidad, de la evaluación de los suelos potencialmente contaminados, los que tienen presencia de hidrocarburos representan cerca del 70% del total de los suelos potencialmente impactados (Cuevas, 2005).

Los hidrocarburos son uno de los grupos de sustancias potencialmente contaminantes más importantes, por su abundancia, por su distribución espacial en entornos urbanos y por su persistencia en distintos sectores ambientales. (Viñas, 2005). Se considera que son los compuestos dominantes del crudo (petróleo) representando entre el 50 y el 98% en peso del contenido total. Estos son mezclas complejas de diferentes moléculas, y pueden agruparse en 4 clases: saturados, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos asfálticos y resinas, en donde cada uno difiere significativamente respecto a su susceptibilidad frente a posibles procesos de biodegradación (Colwell y Walker, 1977; Atlas, 1981). Para su mineralización, estos compuestos requieren la acción de más de una especie microbiana, pues cada microorganismo individualmente tiene una capacidad limitada para degradar las diferentes moléculas que los conforman; por el contrario, los consorcios microbianos, al estar compuestos por varias cepas de diferentes géneros, poseen la capacidad enzimática necesaria para transformar las diferentes moléculas constitutivas de los hidrocarburos, transformando las moléculas con características de peligrosidad (inflamabilidad, toxicidad, ecotoxicidad, volatilidad) en subproductos y metabolitos que pueden ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos naturales, generando un menor impacto al ambiente y a la salud humana (Mohamad F, et al., 2004).

El conocimiento de la diversidad microbiana del suelo es de gran importancia para determinar qué poblaciones pueden estar implicadas en la degradación de hidrocarburos. Actualmente las técnicas moleculares de análisis químico han permitido detectar numerosas bacterias no cultivables, algunas de las cuales constituyen poblaciones dominantes, proporcionando información sobre su función y desempeño en el ambiente; además, la información y los resultados obtenidos permiten reforzar las prácticas de biorremediación basadas en el uso de la microbiota autóctona del suelo (Whyte et al., 1998).

Una alternativa costo/eficiente para restablecer la calidad del ambiente en el recurso suelo es la biorremediación (Agudelo, 2010). El éxito de esta tecnología depende de la existencia, en el lugar contaminado, de microorganismos con la capacidad metabólica apropiada para transformar los compuestos xenobióticos, en compuestos que puedan ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos (Whise, 2000). Por esta razón, es indispensable realizar la caracterización microbiológica en el sitio del derrame (Hernández et al., 2006); ésta debe constar de 2 estudios: la cuantificación de los microorganismos presentes, la cual incluye las pruebas de biofactibilidad; y los estudios de biodegradabilidad en laboratorio; en su conjunto esta información es indispensable para predecir el tiempo que tomará la biodegradación en campo (Finn, 2000).

La tasa de degradación microbiana de hidrocarburos en suelos está condicionada por parámetros fisicoquímicos como: presencia de nutrientes (Nitrógeno, Fósforo), contenido de oxígeno (O_2), presión parcial (Pv) de gases, temperatura (T), pH, contenido de sales, tamaño (Diámetro) y distribución de partículas (Tamices), capacidad reguladora del suelo (Margesin & Schinner, 2001) y por la solubilidad (K_{sp} y %S), concentración, cantidad y biodisponibilidad de los contaminantes (Obuekwe et al., 2005).

Uno de los principales mecanismos para eliminar los hidrocarburos potencialmente contaminantes del suelo es la atenuación natural; con esta tecnología, la biodegradación tiene lugar *in situ*, por medio de procesos fisicoquímicos de interacción entre el contaminante y el suelo. Su principal objetivo es reducir la concentración del contaminante en forma natural gracias a la acción de las poblaciones nativas de microorganismos del suelo (Tempest et al., 1978). Existen, a su vez, otras vías y procesos por los cuales puede disminuirse la concentración del contaminante, entre los que se encuentra la dispersión, la dilución, la volatilización, la adsorción y las reacciones químicas producidas en el suelo. (Lee H et al., 2001).

La bioestimulación es otra alternativa técnica y tecnológica de biorremediación basada en la adición de nutrientes (NO_3^- y PO_4^{3-}), sustratos o aditivos con actividad superficial para estimular el

crecimiento de microorganismos endógenos capaces de biodegradar compuestos contaminantes del ambiente (Núñez, 2003). Esta estrategia se aplica cuando existen poblaciones autóctonas con capacidad degradativa en la zona contaminada.

Este estudio tiene como objetivo aislar y caracterizar un consorcio bacteriano capaz de degradar los hidrocarburos presentes en combustible diesel a partir de un suelo contaminado experimentalmente, y tratado mediante 2 tecnologías de Biorremediación: atenuación natural y bioestimulación, con el fin de emplear la microbiota autóctona del sitio del derrame como instrumento de gestión, definiendo su viabilidad económica y técnica en la recuperación de suelos potencialmente contaminados con hidrocarburos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Caracterización del suelo

El suelo empleado en el experimento fue extraído de los predios de la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía de la Sede Medellín (Colombia) y corresponde al Horizonte A tomando las muestras entre los 0,25 y los 1.00 metros de profundidad como muestra integrada (disturbada). Este suelo se eligió por no haber tenido contaminación previa con hidrocarburos. Para la determinación de la línea base experimental y la cuantificación de la eficiencia del proceso se determinaron las principales características físicas y químicas antes y después del derrame.

Parámetros	Antes del derrame,
Textura	
Arena (% en peso)	28
Limo (% en peso)	28
Arcilla (% en peso)	44
Densidad real (g/cm ³)	2,29
Densidad aparente (g/cm ³)	1,5
Porosidad (%)	44.36
pH (unidades de pH)	5,5
Coductividad Eléctrica, C.E. (dS/m)	18
Materia orgánica (% en peso Base seca)	4,2
Fósforo total (mg/kg Base seca)	40
S (mg/kg Base Seca)	11
Fe (mg/kg Base Seca)	239
Mn (mg/kg Base Seca)	28
Cu (mg/kg Base Seca)	6
Zn (mg/kg Base Seca)	10
B (mg/kg Base Seca)	0,39
N-NO ₃ (mg/kg)	1,53
N-NH ⁴ (mg/kg)	7
UFC/g suelo	1,4x10 ⁵

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas antes del derrame experimental (Physical and chemical properties before experimental spill)

2.2 Pretratamiento del suelo

El suelo empleado para la experimentación fue extraído a una profundidad entre 25 a 100 cm, evitando utilizar parte de la cobertura vegetal.

El suelo se dejó secar durante 4 días; posteriormente se tamizó hasta llevarlo a un tamaño de partícula de aproximadamente 2,3 mm, con el fin de garantizar una distribución homogénea del hidrocarburo en la bandeja de experimentación y disminuir la formación de agregados en el suelo que puedan interferir con el proceso de tratamiento.

2.3. Montaje del experimento

Para realizar el experimento, se llevaron a cabo dos tratamientos de Biorremediación: atenuación natural (A) y bioestimulación (B), y un control (C). Todos los ensayos se realizaron por

triplicado en bandejas de experimentación con 2 kg de suelo base seca. El derrame experimental se realizó con 40.000 ppm de diesel, para el caso de las bandejas de bioestimulación, éstas fueron suplementadas con los siguientes nutrientes: Fosforo como tripósfato de sodio y nitrógeno como urea al 46% grado agroquímico (Cookson 1995). El tratamiento control fue esterilizado antes del derrame a una temperatura de 121°C y 1,3 kg/cm² de presión durante 2 horas, después se adicionó una solución de ácido clorhídrico (HCL) 2 M para bajar el pH a un valor de 3,0, con esto se disminuyó la posibilidad de obtener crecimiento bacteriano, ya que el pH óptimo de crecimiento de las bacterias es cercano a un valor de 7,0. Adicionalmente, se agregó una solución de ciclohexamida para contrarrestar el posible crecimiento de hongos ambientales ocasionado por el bajo valor del pH en el sustrato.

Figura 1. Montaje del experimento a escala de laboratorio, cada uno de los tratamientos se realizó por triplicado, al igual que el control, con dos kg de suelo. Los rectores con dimensiones de 0.30x0.30 metros y 0.10 metros de altura.



Figura 2. Dosificación de nutrientes en las bandejas de bioestimulación.



Tabla 2. Propiedades físicas y químicas del suelo después del derrame experimental (Physical and chemical properties after experimental spill)

Parámetros	Después del derrame
Densidad aparente (g/cm ³)	2,29
Densidad Real (g/cm ³)	1,15
Porosidad (%en peso)	44,36
pH (Unidades de pH)	5,6
C.E. (dS/m)	-
Materia Orgánica (%)	10,7
Fosforo total (mg/kg)	47
S (mg/kg Base Seca)	15
Fe (mg/kg Base Seca)	265
Mn (mg/kg Base Seca)	49
Cu (mg/kg Base Seca)	7
Zn (mg/kg Base Seca)	10
B (mg/kg Base Seca)	0,32
N-NO ₃ (mg/kg)	3
N-NH ⁴ (mg/kg)	14

2.4. Medios de cultivo

El medio de cultivo empleado para la siembra de los microorganismos heterótrofo fue el medio Luria Bertani (Difco TM), al cual se le adicionó 1% V/V de diesel. Para el aislamiento de los microorganismos hidrocbonoclastas se utilizó el medio mínimo Bushnell Hass con la siguiente composición: 1 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 1 g/l de KNO_3 , 1 g/l de KH_2PO_4 , 0.2 g/l de MgSO_4 , 0.02 g/l de CaCl_2 , 0.05 g/l de FeCl_3 y 15 g de agar nutritivo, igualmente el medio de cultivo fue suplementado con el 1% V/V de diesel con el fin de aislar los microorganismos que utilizan el diesel como única fuente de carbono y energía.

2.5. Siembra y Recuento de microorganismos

Se realizaron diluciones seriadas en tubos de vidrio que contenía 9 ml de solución amortiguadora, para realizar la dilución 10^{-1} se tomó 1 gr de suelo y se adicionó al primer tubo, se lleva a agitación en vórtex durante 1 min, a partir de ésta solución se toma 1 ml y se dispensó en otro tubo con solución tampón. Este procedimiento se repite varias veces hasta llevar la muestra a la dilución 10^{-9} , las muestras sembradas correspondían a las 3 últimas diluciones consecutivas. Las cajas se dejaron en incubación a temperatura ambiente (20°C) durante 7 días y a partir del crecimiento obtenido en cada una de las siembras se realizó coloración de gram y pruebas de catalasa y oxidasa para realizar identificación bioquímica de las colonias obtenidas. Adicionalmente se realizaron aislamientos para identificación molecular. El recuento de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco se calculó por medio de la siguiente fórmula:

$$\text{UFC/g Base seca: } (\text{NC} \cdot 1 / \text{FD} \cdot 1 / \text{V}) / \text{P} \cdot \text{FH}$$

Donde:

NC: Número de colonias en la placa

FD: Factor de dilución

V: Volumen inoculado

FH: Factor de corrección de humedad ($1 - (\% \text{Humedad} / 100)$)

2.6. Extracción de hidrocarburos

La recuperación de los hidrocarburos del suelo se realizó con el método de agitación-centrifugación utilizando viales de polipropileno para centrifuga de 50 ml, para lo cual se colocó 1 g de suelo seco, al cual se le adicionaron 2.5 g de Na_2SO_4 anhidro (Panreac). Luego se le agregó a cada vial 5 ml de diclorometano (Chemi, grado analítico) y se llevó al vortex por 60 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 de aproximadamente 15 ml de sobrenadante. Se empleó un rotoevaporador Heidolph (Laborota 4003-control) operando a una temperatura de 40°C y una presión de 740 mmHg para separar el extracto orgánico del solvente y el extracto se resuspendió en 1.5 ml de diclorometano. Las muestras fueron almacenadas a 5°C para su análisis posterior.

2.7. Análisis de los hidrocarburos.

La cuantificación de los hidrocarburos se hizo por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (CG/EM), en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. El equipo empleado es de marca Agilent serie 6890N con detector selectivo de masas Agilent 5973 Network y un inyector Agilent 7683. Se empleo una columna: DB-TPH 123-1632 Agilent Technologies de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro y una película de empaque de $0,25 \mu\text{m}$.

Las muestras fueron corridas bajo las siguientes condiciones: temperatura inicial de 60°C por dos minutos, posteriormente la temperatura se mantuvo con un gradiente 8°C por minuto hasta alcanzar 300°C por 8 minutos, la temperatura del inyector se mantuvo a 250°C y la temperatura del detector a 340°C , el gas de arrastre utilizado fue hidrógeno, trabajando a un flujo constante de 2ml por minuto. El estándar empleado para identificar y cuantificar la concentración del hidrocarburo en las muestras, contenía una mezcla de hidrocarburos alifáticos de C8-C40, con un total de 35 analitos resuspendidos en disulfuro de carbono (CS_2)- diclorometano (CH_2Cl_2) (3: 1).

2.8. Análisis Estadístico

La consideración de normalidad y homogeneidad para la concentración remanente de los HTP al final de los tratamientos reportados en la Tabla 4 se confirmó con las pruebas de Cramer-Von Mises

y de Bartlett; respectivamente. Se realizó el análisis de varianza de los datos y la prueba de mínima significancia ($P < 0,05$). Los tratamientos se consideraron diferentes cuando $P < 0,05$.

2.9. Análisis molecular.

• Amplificación y Secuenciación de la subunidad 16S rRNA

La metodología molecular empleada en este experimento se encuentra en forma detallada en (Dunbar et al., 1999; Rivera et al., 2010 este último pendiente por publicar).

Los productos de amplificación PCR se purificaron y secuenciaron directamente en MacroGen (Korea). El proceso de secuenciación se realizó con los mismos oligonucleótidos utilizados en la amplificación. *Primers* Universales utilizando PA y PCB5.

• Análisis de las secuencias obtenidas.

Las secuencias fueron comparadas con las secuencias conocidas disponibles en la base de datos del GenBank por medio del servicio BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), la cual se hizo vía Internet por la dirección <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast>.

Las secuencias obtenidas son compatibles con los siguientes géneros bacterianos:

Enterobacter sp, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus sp*, *Sanguibacter soli*, *Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*

3. Resultados y discusión

3.1 Recuento de Bacterias e Identificación del Consorcio Bacteriano

El experimento tuvo una duración de 4 meses, en este tiempo se hicieron 7 siembras en medios de cultivo suplementados con combustible diesel como única fuente de carbono y energía. Las muestras fueron tomadas a partir de cada uno de los dos tratamientos, y del control, se hizo seguimiento a los microorganismos autóctonos del suelo capaces de utilizar el hidrocarburo como única fuente de carbono y energía. Las siembras fueron realizadas los días 13, 33, 43, 49, 65, 79 y 111 del experimento.

A partir de los crecimientos obtenidos en las siembras realizadas, se hicieron aislamientos con el fin de realizar una caracterización bioquímica de los microorganismos, esto permitió determinar las poblaciones microbianas presentes en el suelo potencialmente contaminado experimentalmente, cada uno de estos aislamientos se repico en caldo LB y se guardó a -20°C para realizar la identificación molecular.

Después de realizar la última siembra, se procedió a realizar la identificación molecular en el laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, (Medellín–Colombia). Allí se realizó la extracción de ADN a partir de los microorganismos previamente aislados. Además se realizó la amplificación y purificación de las secuencias obtenidas, posteriormente se realizó la secuenciación en MacroGen-Korea. Las secuencias obtenidas permitieron establecer un consorcio bacteriano, conformado por los siguientes géneros:

Enterobacter sp, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Sanguibacter soli*, *Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*.

	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
Gram	+	+	+	-	V*	+	-
Morfología	Bacilo	Coco	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo	Bacilo
Catalasa	+	+	+	+	-	+	-
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 3. Resultados de la identificación bioquímica del consorcio bacteriano aislado (Results of the biochemical identification of isolated bacterial consortium)

Los géneros aislados han mostrado tener la capacidad metabólica de transformar los hidrocarburos, contenidos en el combustible diesel, transformando las moléculas con características de peligrosidad en subproductos y metabolitos, convirtiendo los elementos tóxicos y mutagénicos en productos que pueden ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos naturales.

3.2. Caracterización fisicoquímica del suelo después de los tratamientos.

La adición de HCL al tratamiento control hizo descender el pH a 3,0 al inicio del experimento y finalizó con un valor de pH de 4,3, por la literatura se sabe que pH inferiores a 5,0 liberan el aluminio contenido en la arcilla, esta situación genera toxicidad para las plantas, principalmente inhibiendo el crecimiento y el desarrollo de las raíces, esta situación podría tener incidencia en el crecimiento de los microorganismos autóctonos del suelo. El tratamiento control, al registrar pH bajo reportó presencia de aluminio en la caracterización final, pasando de valores indetectables al inicio del experimento, a 1,1 cmolc/kg al finalizar el experimento.

La cantidad de materia orgánica en los dos tratamientos y en el control aumentó, a causa de la adición de los hidrocarburos, la concentración de materia orgánica en el suelo antes del derrame experimental se encontraba en 4,2 % en peso, después del derrame alcanzó el valor de 10,7% en peso, y al finalizar el experimento se observó un descenso hasta 7,5% en peso aproximadamente.

El pH es uno de los parámetros más importante que debe controlarse en el suelo para la degradación de hidrocarburos y en este caso presentó modificaciones a lo largo de la experimentación. Al inicio se midió un valor de pH de 5,5 unidades y para el tratamiento de Atenuación natural se mantuvo estable en el tiempo, debido a que no se adicionaron nutrientes, sólo se presentó la adición del hidrocarburo, el cual no incidió en el valor del pH. Por otro lado el tratamiento de bioestimulación alcanzó valores de pH de 8,3, este aumento se dio en forma gradual durante la experimentación, en el control se presentó un descenso del valor del pH a causa de la adición de HCL, necesario para inhibir el crecimiento de bacterias que pudieran iniciar procesos de degradación de los hidrocarburos.

Parámetro Base seca	Control	Atenuación Natural	Bioestimulación
pH	4.3	5.4	7.7
Materia Orgánica (%)	7.4	7.9	7.3
Al (cmolc/kg)	1.1	0.5	-
Ca	10.7	10.7	8.3
Mg	6.6	6.7	5.4
K	0.27	0.28	0.29
CICE (meq/100 g)	18.7	18.2	14
P	25	26	117
S	5	1	4
Fe	227	216	180
Mn	150	98	46
Cu	4	5	4
Zn	13	10	7
B	0.34	-	-
N-NO ₃	9	5	6
N-NH ₄ ⁺	140	27	1620

Tabla 4. Propiedades físicas y químicas del suelo después de los tratamientos (Physical and chemical properties of soil after treatment). CICE: Capacidad de Intercambio catódico

3.3. Análisis de la degradación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo,TPHs

En la Tabla 4 se muestran los resultados de los HTPs en el transcurso del experimento, allí se puede observar que las concentraciones de cada uno de los componentes mostró una reducción significativa al final del experimento, el tratamiento de bioestimulación presentó un porcentaje de remoción total de 50,99%, mientras que el tratamiento de atenuación natural alcanzó un porcentaje de remoción de 36,86% respecto a la concentración inicial.

Para el análisis de los hidrocarburos alifáticos se tuvieron en cuenta 32 compuestos que iban desde el Decano hasta el Octadecano, al momento de realizar la lectura de las muestras después de la contaminación inicial, se reportó la presencia de 21 compuestos que van desde el Decano hasta el Hexacosano, al final del experimento los compuestos reportados van desde el Tridecano hasta el Hexacosano, para un total de 18 compuestos, es decir al final de la experimentación hubo compuestos que no pudieron ser detectados en la cromatografía de gases – espectrometría de masas, posiblemente porque concentraciones estaban por debajo de los niveles de detección del equipo y de la técnica analítica o porque habían sido transformados en su totalidad en el proceso de degradación.

En los dos tratamientos se reportó la degradación de más de la mitad de la concentración inicial para cada uno de los compuestos al finalizar los 4 meses. El tratamiento de bioestimulación presentó los mejores niveles de degradación. Pese a que el tratamiento control había sido suplementado con una solución de HCL y de ciclohexamida para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos que pudieran incidir en la degradación de los hidrocarburos, éste mostró altas tasas de degradación, lo cual muestra la importancia de esclarecer por medio de que otro mecanismo puede estarse dando la degradación del hidrocarburo.

A continuación se muestran los cromatogramas de las bandejas del control en la Figura 1, así mismo los tratamientos de atenuación natural en la Figura 2 y bioestimulación Figura 3, además el suelo inicial antes del derrame experimental en la Figura 4.

Figura 3. Cromatograma por GC/MS Inicial vs Final de las bandejas Control (GC/MS chromatograms Initial and Final Control Trays)

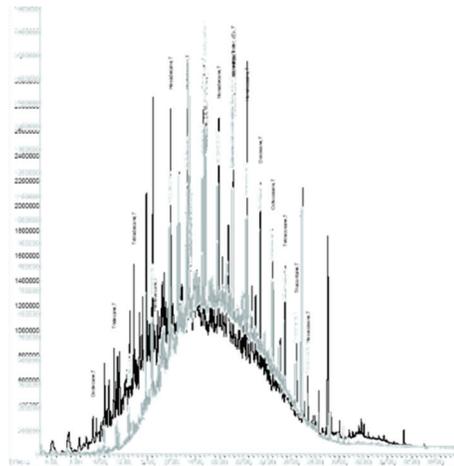


Figura 4. Cromatograma por GC/MS Inicial vs Final en el tratamiento atenuación natural (GC/MS chromatograms Initial and Final in the natural attenuation treatment)

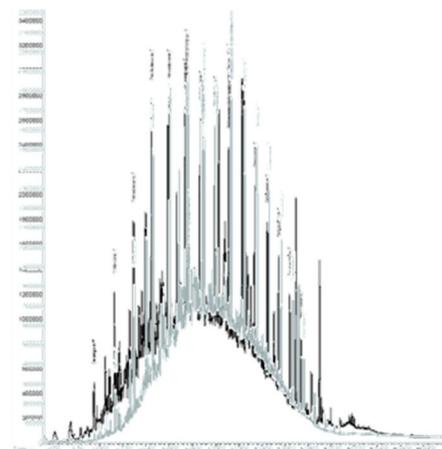
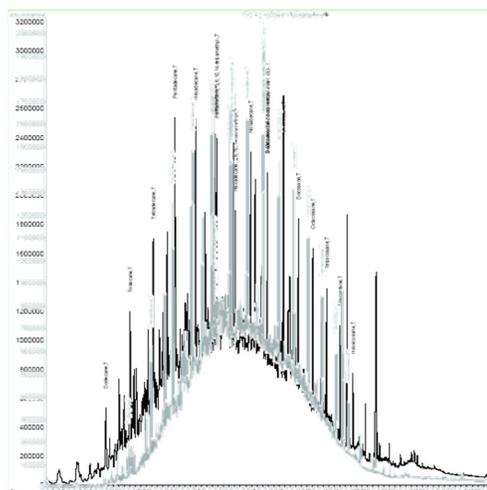


Figura 5. Cromatograma por GC/MS Inicial vs Final del tratamiento de Bioestimulo (GC/MS chromatograms Initial and Final in the Biostimulation treatment)



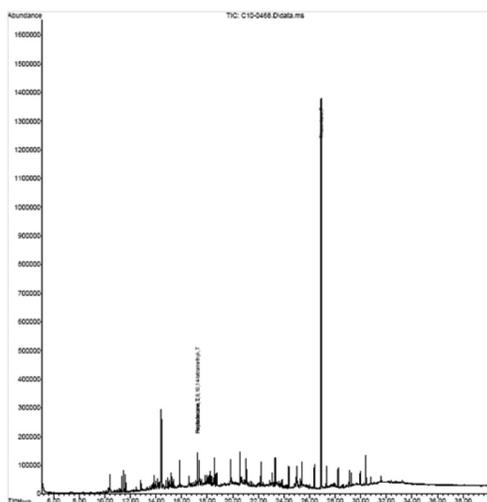


Figura 6. Cromatograma por GC/MS del suelo inicial antes del derrame experimental (GC/MS chromatograms Initial soil before experimental stroke)

Analitos	Concentración inicial (mg/l)	Concentraciones encontradas cuatro meses después de los tratamientos								
		C1	C2	C3	A1	A2	A3	B1	B2	B3
Decano	5.178	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Decano	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Undecano	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dodecano	32.306	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tridecano	59.583	ND	ND	ND	21,12	21,62	21,57	19,29	-	17,47
Tetradecano	81.076	13,98	16,17	14,98	37,49	41,62	44,19	33,63	21,19	32,3
Pentadecano	88.998	31,13	28,27	23	59,41	65,97	66,59	52,21	37,46	52,51
Hexadecano	109.892	30,79	29,43	20,52	60,51	71,34	70,4	52,61	41,37	51,85
Heptadecano	113.392	38,55	37,23	25,93	64,65	74,04	75	58,34	46,87	58,55
Pentadecano 2, 6, 10, 14...	82.397	16,19	14,73	60,64	14,31	16,42	16,93	63,89	52,33	14,07
Octadecano	319.734	107,59	100,89	69,88	188,13	214,18	216,67	169,92	138,16	171,86
Hexadecano	59.544	49,69	45,31	42,79	44,17	51,06	54,58	41,04	36,67	43,66
Nonadecano	216.389	35,21	38,35	17,69	119,15	143,74	140,3	103,93	78,82	101,15
Dodecano 2,6, 11- trime...	193.056	75,04	76,32	59,42	129,08	141,99	144,08	115,67	97,32	113,88
Ácido 9-Octadecenoico	193.430	-	83,02	-	126,82	139,38	136,86	117,12	99,13	113,82
Heneicosano	216.717	96,46	83,57	63,58	152,65	171,77	181	144,16	118,88	140,71
Docosano	56.630	19,71	19,11	13,13	34,62	41,62	41,96	31,53	24,69	31,41
Octacosano	76.111	3,42	0,52	-	35,23	48,68	49,69	27,63	12,93	27,35
Tetracosano	48.958	5,36	4,49	-	23,75	32,66	33,51	19,7	10,69	19,5
Triacotano	38.836	17,57	16,15	13,91	24,05	28,83	30,5	22,03	17,94	22,66
Hexacosano	32.246	16,36	15,68		20,69	23,37	26,46	19,32	17,18	20,08
HTP (mg/l)	2.024.47	557.05	609.24	411.56	1155.83	1328.29	1350.29	1092.02	851.63	1032.83

Tabla 5. Concentración (mg/l) residual de los hidrocarburos alifáticos en el suelo contaminado después de los tratamientos (Residual concentration (mg/l) of aliphatic hydrocarbons in the contaminated soil after the treatments).

4. DISCUSIÓN

A lo largo del experimento se realizaron 7 siembras a partir del suelo potencialmente contaminado experimentalmente con combustible diesel, los días 13, 33, 43, 49, 65, 79 y 111, respectivamente; estas siembras se hicieron en medios de cultivo selectivos, con el fin de aislar un consorcio bacteriano capaz de utilizar los hidrocarburos contenidos en el diesel como fuente de carbono y energía. El estudio mostró que el crecimiento bacteriano se obtenía con más abundancia y en menor tiempo en el medio LB, en comparación con el crecimiento y abundancia obtenidos en el medio HB, pese a haber tenido condiciones de siembra e incubación idénticas; un factor que pudo incidir en este comportamiento es la composición de los medios de cultivo, el medio HB es un medio

mínimo de sales, el cual es bastante restrictivo en los elementos que aporta a los microorganismos para su crecimiento y desarrollo.

Pese a ello, lograron aislarse a partir del suelo 7 cepas bacterianas correspondientes a los siguientes géneros *Enterobacter sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Sanguibacter soli*, *Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*, éstas mostraron la capacidad de adaptarse a las nuevas condiciones del medio, pues el suelo empleado para el estudio, era un suelo de pastoreo que no había tenido contaminación previa con hidrocarburos, como se evidenció en la Figura 6.

En el seguimiento realizado al experimento, se pudo evidenciar una condición de anoxia, aproximadamente en los días 10 a 20, lo cual se manifestó con olor amoniacal en los microcosmos correspondientes al tratamiento de bioestimulación, en este mismo tiempo el rendimiento en la degradación para este tratamiento presentó una disminución; la falta de oxigenación en el medio, hizo que el aceptor final de electrones en el sistema fuera el nitrógeno; **biológicamente** en sistemas aeróbicos parte del amoníaco puede ser oxidado a nitrito y nitrato por bacterias autóctonas (Cookson. 1995).

Otro factor determinante para el crecimiento y desarrollo óptimo de las bacterias hidrocarbonoclastas es el tiempo de incubación, las cajas después de la siembra fueron incubadas a temperatura ambiente durante 7 días, se hicieron ensayos en los cuales algunas de las cajas se dejaron el doble del tiempo, obteniéndose un crecimiento mayor.

Pudo determinarse, de acuerdo al porcentaje de degradación de diesel, que el tratamiento de bioestimulación es más eficiente en la remoción de hidrocarburos a partir de suelos contaminados. La atenuación natural, presentó buenos resultados pero es una técnica poco recomendable para tratar derrames de hidrocarburos, pues los tiempos necesarios para el restablecimiento o la recuperación del ecosistema suelen ser tan largos, que permiten que el contaminante se mueva y genere impactos negativos no solo en el sitio del derrame sino también en ecosistemas adyacentes. Claro está que un suelo con baja porosidad y arcilloso el movimiento de los contaminantes puede ser mínimo.

Es importante dilucidar que otros procesos pueden intervenir en la degradación de HTPs. En el caso del tratamiento control, es posible que se estén dando procesos abióticos, como transformaciones químicas y en menor medida volatilización o fotólisis, debe tenerse en cuenta que a pesar de haber controlado el pH para inhibir el crecimiento bacteriano y de haber aplicado un antimicótico ambiental, existe la posibilidad que hayan microorganismos, tanto hongos como bacterias, metabólicamente activos, capaces de adaptarse a estas nuevas condiciones y llevar a cabo el proceso de degradación.

Queda para futuras investigaciones, establecer la posibilidad de definir cuál es el rol que cumple cada una de las especies microbianas al interior del consorcio, pues se sabe que cada una de las especies involucradas cumple un determinado papel en el proceso de biodegradación. Sorkhoh y Col (1995) sugieren que cada cepa o género tiene un papel específico en los procesos de transformación de los hidrocarburos, pues observaron un cambio en la composición de las poblaciones bacterianas a través del tiempo.

4. CONCLUSIONES

La presente investigación permitió aislar un consorcio microbiano a partir de un suelo agrícola que no había presentado contaminación previa con hidrocarburos, verificado con los análisis realizados por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas los cuales evidencian esta condición, aún así se logró aislar un consorcio capaz de crecer en presencia de diesel, conformado por los siguientes géneros: *Enterobacter sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Sanguibacter soli*, *Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*, todos ellos reportados en la literatura por tener la capacidad metabólica necesaria para transformar los hidrocarburos, y convertir sus moléculas con características de peligrosidad en componentes que pueden ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos naturales.

La biorremediación ha mostrado ser una alternativa eficiente, fácil de aplicar y de bajo costo para la recuperación de sitios potencialmente contaminados con hidrocarburos, el conocimiento de la microbiota autóctona y de las sucesiones biológicas que existen en el sitio del derrame, son herramientas invaluableles en el reestablecimiento de los ecosistemas alterados. Así mismo, es necesario

para llevar a cabo un proceso óptimo de degradación, controlar otras variables, como son: cantidad de nutrientes, viabilidad, temperatura, pH y oxígeno, este último considerado uno de los factores más limitantes en los procesos de biodegradación de hidrocarburos, su disminución o baja disponibilidad puede conducir a la formación de metabolitos tóxicos que finalmente inhiben el crecimiento bacteriano (Sudarat et al., 2000).

El uso de inóculos microbianos exógenos especializados en la descontaminación ha tenido éxitos y fracasos (Alexander, 1999). En casos de suelos potencialmente contaminados por hidrocarburos con exposiciones largas o recurrentes, la población autóctona habitualmente responde eficientemente a estrategias de bioestimulación incrementando su población y consiguiendo una biodegradación significativa de los contaminantes (Alexander, 1999). De hecho, se han descrito resultados favorables en procesos de bioestimulación en suelos contaminados con distintas familias de hidrocarburos; con aceites minerales pesados (Sabaté *et al.*, 2004), en suelos contaminados por Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) (Samanta et al., 2002; Atagana, 2004), en enclaves contaminados con crudo de petróleo (Macnaughton *et al.*, 1999; Van Hamme *et al.*, 2003; Kaplan y Kitts, 2004), con Bifenilos Policlorados (PCBs) (Nogales *et al.*, 2001) y con herbicidas (Singh *et al.*, 2003).

En las situaciones en que la población nativa degradadora de hidrocarburos es inexistente o muy baja, debido características de peligrosidad intrínseca de la matriz contaminante o por ser un sitio contaminado recientemente, el uso de inóculos exógenos puede ser beneficioso (Vogel, 1996; Alexander, 1999). Se han descrito numerosas situaciones en las que el bioaumento ha funcionado, en suelos, lodos y aguas subterráneas contaminadas. Sin embargo, es necesario en cada caso particular estudiar la necesidad o no de aplicar inóculos exógenos, así como sus condiciones óptimas de aplicación (Vogel, 1996).

5. AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, y en especial a la Vicerrectoría de Investigación por la financiación de este proyecto. Además a los siguientes investigadores y colaboradores que, con su aporte valioso y desinteresado, hicieron posible el presente trabajo: MARGARITA CORREA OCHOA, Coordinadora del Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia; ASTRID VANESSA CIENFUEGOS GALLET, Docente de la Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia; NANCY VANEGAS BLANDÓN, Técnica Operativa del Laboratorio de Productos Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; WILMAR CARTRILLÓN, estudiante de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; EDISON ALEXANDER AGUDELO, Ingeniero Químico, Magister en Medio Ambiente y Desarrollo; ANGELA PATRICIA RIVERA RIVERA, Ingeniera Biológica, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín; CRISTINA CALLE HENAO, Microbióloga Industrial y Ambiental, Universidad de Antioquia.

REFERENCIAS

- Agudelo, E., 2010. Un método de gestión ambiental adecuado para el tratamiento y la disposición final de un residuo peligroso. Caso: Tierra Fuller contaminada con aceite dieléctrico. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- Alexander, M., 1999. Biodegradation and Bioremediation. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego.
- Atagana, H. I., 2004. Bioremediation of creosote- contaminated soil in South Africa by landfarming. *Journal of Applied Microbiology*. 96: 510- 520.
- Atlas, R., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons, an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45, pp. 180- 209.
- Cookson, J., 1995. Bioremediation Engineering. Edi. Mc Graw Hill. U.S.A.
- Colwell, R. And Walker. J., 1977. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Crit. Rev. Microbiol.* 5: 423- 445.

- Cuevas, B., 2008. Remoción de hidrocarburos policíclicos aromáticos utilizando reactores de suelos activados inoculados biológicamente. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Ingeniería y Arquitectura. México D.F.
- Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A. y Kuske, C. R., 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1662- 1669.
- Ferrari, M., Neirotti, E., Albornoz, C., Mostazo, M. R., Cozzo, M., 1996. Biotreatment of hydrocarbons from petroleum tank bottom sludge in soil slurries. *Biotechnol. Lett.* 18, pp. 1241- 1246.
- Finn, J., 2000. Technology design/evaluation. Performance and potential application. In: S. Fiorenza, C. L. Oubre y C. H. Ward (Eds.). *Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soil*. Lewis Publishers. Part II. pp. 125- 134. Boca Raton, FL, USA.
- Hernández, A., Gutiérrez, M. C., Rubiños, J., Alvarado, J., 2006. Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *TERRA Latinoamericana*, Vol. 24, N° 4, octubre-diciembre, pp. 463- 470. Universidad Autónoma Chapingo Chapingo, México.
- Kaplan, C. W. y Kitts, C. L., 2004. Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1777- 1786.
- kastner, M., Breuer, M., Mahro, B., 1998. Impact of inoculation protocols, salinity and pH on the degradation of polycyclic Aromatic Hydrocarbons and survival of PAH- degrading bacteria introduced into soil. *Applied an Environmental Microbiology*, 64 (1): 359- 362.
- Korda, A., Santas, P., Tenente, A., Santas, R., 1997. Petroleum hydrocarbon remediation: sampling and analytical techniques, in situ trataments and comercial microorganism currently used. *Appl Microbiol Biotechnol* 48: 677- 686.
- Leahy, J., Colwell, R. Microbial Degradation Hydrocarbons on the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 305-315. 2000.
- Lee, H., Lee, J., Cheon, J., Lee K., 2001. Attenuation of petroleum Hydrocarbons in Smear Zones: A case of study. *Journal of Environmental Engineering*; 127 (7): 639- 647.
- Lin, T. C. Et al. 2005. Characterization of Floating Activity of Indigenou diesel- assimilating bacterial isolates," *J. Biosci. Bioeng.*, 99, 466
- Macnaughton, S. J., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y. J. y White, D. C., 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3566- 3574.
- Margesi, R., Schinner, F., 2001. Bioremediation (Natural attenuation and biostimulation) of Diesel- Oil- Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 3127– 3133.
- Mohamad, F., Bakar, A., Basri, M., 2004. Biodegradation of hydrocarbons in soil by consortium. *International Biodeterioration and biodegradation*, p, 61- 67.
- Nogales, B., E., Moore, E., Llobet- Brossa, E., Rossello, R., Amann, R., Timmis, K., 2001. Combined use of 16S ribosomal DNA and 16S rRNA to study the bacterial community of polychlorinated biphenyl- polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1874- 1884.
- Núñez, R., 2003. Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la biorremediación de derrames de hidrocarburos. Tesis doctoral. Universidad de la Habana.
- Obuekwe, C. O., Badrudeen, A.M., Al- Saleh, E. & Mulder, J. L., 2005. Growth and hydrocarbon degradation by three desert fungi under conditions of simultaneous temperature and salt stress. *Internat. Biodet. Biodeg.* 56: 197- 205.
- Prince, C., 1993. Petroleum spill bioremediation in marine environments. *Crit. Rev. Microbiol.* p, 217- 242.
- Restrepo, R., 2002. Derrame de hidrocarburos, impacto en los ecosistemas tropicales. *ECOPETROL*, Instituto Colombiano de Petróleo.

- Sabaté, J., Viñas, M., Solanas, A., 2004. Laboratory -scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *Int. Biodet. Biodegrad.* 54: 19- 25.
- Samanta, S., Singh, K., Jain, R., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends Biotechnol.* 20: 243- 247.
- Singh, B., Walker, K., Morgan, J., Wright, D., 2003. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos- degrading bacterium *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5198- 5206.
- Sorkhoh, N. A., Al- Hasan, R. H., Khanafer, M., Radwan, S. S., 1995. Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil. *Journal of Applied Bacteriology* 78, 194– 199.
- Sudarat, B., Britz, M., Grant, S., 2000. Degradation and mineralization of high- molecular- weight polycyclic aromatics hydrocarbons by defined fungal- bacterial cocultures. *Applied and Environmental Microbiology.* 1007- 1019.
- Sutherland, J. B., Rafii, A. A. Khan y Cerniglia, C. E., 1995. Mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation. En L. Y. Young y C. E. Cerniglia (Eds), *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals.* Wiley-Liss. New York. pp. 69- 306.
- Tempest, D. W., 1978. The biochemical significance of microbial growth yields: an assessment. *Trends. Biochem. Sci.* 3: 180- 184.
- Van Hamme, J., Singh, D., Ward, O., 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 503- 549.
- Verma, S; Bhargava, R. & Pruthi, V., 2006. Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India. *Internat. Biodet. Biodeg.* 57: 207- 213.
- Viñas, M., 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona.
- Vogel, T. M., 1996. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7: 311- 316.
- Whise, D. L., 2000. *Bioremediation of contaminated soils.* Marcel Decker. New York.
- Whyte, L. G., Hawari, J., Zhou, E., Innis, W. E., 1998. Biodegradation of variable- chain- length alkanes at low temperatures by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology.* 2578- 2584.

