

Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a base de bacterias utilizadas como bioproductos¹

Ricardo Abel Vizuite García², Alina Eugenia Pascual Barrera³,
Carlos Wilfrido Taco Taco⁴, María Monserrath Morales Padilla⁵.

Resumen

Introducción. La explotación de petróleo y sus derivados en Ecuador, mantiene un historial negativo en relación con la destrucción de hábitats junto con la formación de pasivos ambientales o piscinas de crudo que han contaminado los suelos y agua de la región. La búsqueda de nuevos tratamientos de biorremediación se ha incrementado en los últimos años por la necesidad de realizar trabajos de limpieza más rápidos y de bajo costo, utilizando de forma estratégica microorganismos, plantas o biocompuestos para disminuir la contaminación por hidrocarburos de petróleo, metales pesados y otros compuestos. **Objetivo.** Determinar la capacidad para biodegradar hidrocarburos a base de bacterias nativas aisladas de suelos contaminados con petróleo. **Materiales y métodos.** Bajo un enfoque cuantitativo, en la

modalidad experimental de tipo exploratoria, se utilizaron 81 bacterias aisladas a partir de suelos contaminados con petróleo. Los parámetros medidos fueron el diámetro de crecimiento de la colonia bacteriana y la formación del halo de degradación. **Resultados.** Las bacterias estudiadas presentaron diversidad fenotípica y metabólica, siendo AX15, AX67 y AX87 las que crecieron de mejor manera, en los medios de cultivo preparados con extractos de suelos con diferentes concentraciones de hidrocarburos. **Conclusiones.** Este estudio demuestra la factibilidad de usar un bioproducto basado en bacterias para la implementación de programas de biorremediación *in situ* o *ex situ* en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Palabras clave: biorremediación, biodegradación, bioproducto, hidrocarburos.

1 Artículo original derivado del proyecto de investigación científica presentado a la empresa de investigación y desarrollo “BH CONSULTORES” (www.bhconsultores.com) con la temática inicial “Remediación socio ambiental y su incidencia en suelos contaminados con hidrocarburos en el Campo Sacha” realizado entre los años 2013 y 2016. La investigación estuvo patrocinada por la empresa consultora y los análisis experimentales se los realizo en los laboratorios de la Universidad Técnica de Ambato. El proyecto tuvo un coste total de USD 3.500 dólares americanos.

2 Máster en Gestión de Proyectos, Ingeniero Bioquímico, Docente de la carrera de Nutrición y Dietética de la Facultad de Ciencias de la Salud en la Universidad Técnica de Ambato. Correo: rabelvizuite@gmail.com ORCID 0000-0003-0622-3806

3 Doctora en Ciencias del Mar. Magister en Ciencias Marinas con Especialidad en Biología Marina. Licenciada Químico Farmacéutico - Biólogo. Profesor Investigador de la Universidad Internacional Iberoamericana (UNINI). Campeche, México. Correo: alina.pascual@unini.edu.mx / ORCID 0000-0003-3096-5826

4 Magister en Gestión de Proyectos socio productivos. Ingeniero en Administración y Producción Agropecuaria. Docente en Facultad de Ciencias Agropecuarias Recursos Naturales y del Ambiente de la Universidad Estatal de Bolívar. Correo: cwtaco@ueb.edu.ec / ORCID 0000-0002-4471-4975

5 Magister en Ciencias e Ingeniería de los Alimentos. Ingeniera en Alimentos. Docente de la carrera de Ingeniería en Alimentos en la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Correo: mmmorales@uteq.edu.ec / ORCID 0000-0001-9048-1538

Autor para correspondencia: Ricardo Abel Vizuite García rabelvizuite@gmail.com

Recibido: 11/03/2019 Aceptado: 21/07/2020

Bioremediation of soils contaminated with hydrocarbons based on bacteria used as bioproducts

Abstract

Introduction. The exploitation of oil and its derivatives in Ecuador, maintains a negative record in relation to the destruction of habitats along with the formation of environmental liabilities or pools of crude oil that have contaminated the soil and water of the region. The search for new bioremediation treatments has increased in recent years due to the need to perform more rapid and low-cost cleaning works, strategically using microorganisms, plants or biocomposites to reduce the contamination by oil, heavy metals and petroleum and other compounds. **Objective.** To determine the capacity to biodegrade hydrocarbons based on native bacteria isolated from soils contaminated with oil. **Materials and methods.** Under a quantitative approach, in the experimental modality of exploratory type, 81 isolated bacteria were used from soils contaminated with petroleum. The parameters measured were the growth diameter of the bacterial colony and the formation of the degradation halo. **Results.** The bacteria studied had phenotypic and metabolic diversity, being AX15, AX67 and AX87 those that grew better, in culture media prepared with soil extracts with different concentrations of hydrocarbons. **Conclusions.** This study demonstrates the feasibility of using a bioproduct based on bacteria for the implementation of in situ or ex situ bioremediation programs in the recovery of soils contaminated with hydrocarbons.

Key words: bioremediation, biodegradation, bioproducts, hydrocarbons.

Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos a base de bactérias

Resumo

Introdução. A exploração de petróleo e seus derivados no Equador mantém um histórico negativo em relação à destruição do habitat, juntamente com a formação de passivos ou poças de óleo que contaminaram o solo e a água na região ambiental. A busca por novos tratamentos de biorremediação tem aumentado nos últimos anos pela necessidade de realizar um trabalho mais rápido de limpeza e barata, usando estrategicamente microrganismos, plantas ou biocompósitos para reduzir a poluição por hidrocarbonetos de petróleo, metais pesados e outros compostos. **Objetivo.** Determinar a capacidade de biodegradar hidrocarbonetos com base em bactérias nativas isoladas de solos contaminados com óleo. **Materiais e métodos.** Sob abordagem quantitativa, na modalidade experimental do tipo exploratório, foram utilizadas 81 bactérias isoladas de solos contaminados com petróleo. Os parâmetros medidos foram o diâmetro de crescimento da colônia bacteriana e a formação do halo de degradação. **Resultados.** As bactérias estudadas apresentaram diversidade fenotípica e metabólica, sendo as AX15, AX67 e AX87 aquelas que cresceram melhor, em meios de cultura preparados com extratos de solo com diferentes concentrações de hidrocarbonetos. **Conclusões.** Este estudo demonstra a viabilidade da utilização de um bioproduto à base de bactérias para a implementação de programas de biorremediação in situ ou ex situ na recuperação de solos contaminados com hidrocarbonetos.

Palavras-chave: Biorremediação, biodegradação, bioprodutos, hidrocarbonetos.

Introducción

La explotación petrolera en el Ecuador abarca dos épocas importantes, iniciando con el periodo 1911-1960, en donde la zona de exploración y explotación fue la península de Santa Elena, hasta los inicios de 1970, con el descubrimiento del campo Lago Agrio, en la región amazónica del Aguarico. Sin embargo, en ninguna de las dos épocas fueron considerados tanto el impacto social como ambiental, así como tampoco en la concesión otorgada a compañías extranjeras para la explotación y transporte de hidrocarburos.

Los efectos locales de las actividades petroleras durante los últimos treinta años son desastrosos. La explotación petrolera en la Amazonía ecuatoriana es responsable de la deforestación de 2 millones de hectáreas, además del derrame de 650.000 barriles de crudo en bosques, ríos y esteros y de sustancias tóxicas, como los metales pesados que han contaminado las fuentes de agua y suelos de la región (Jochnick, 1994).

Debido a los numerosos derrames de petróleo ocurridos en el país, varias empresas nacionales empezaron a estudiar tecnologías de biorremediación con el fin de realizar, de forma más eficiente, la limpieza de los sitios afectados por los derrames petroleros. Por ejemplo, en la provincia de Orellana, se realizó la limpieza del sector Sacha y de la Laguna de Papallacta, en la provincia de Pichincha, realizados por el Proyecto de Eliminación de Piscinas Contaminadas en el Distrito Amazónico (PEPDA) y Ecuavital (Navas, Hidalgo, Estrella, y Serrano, 2008). Estas tecnologías son reportadas ampliamente en la literatura por Mendoza, Perea, Salvador, Morales, y Pérez (2011), quienes mencionan que su eficacia depende de su utilización, de la forma en que se presenten los contaminantes y de la existencia de un organismo que sea

capaz de transformarlo. Por otro lado, Fabelo (2017) indica que muchas compañías que hacen biorremediación importan microorganismos desde Europa y Estados Unidos sin realizar estudios de impacto ambiental antes de su utilización, limitando el uso de bacterias nativas y con poco conocimiento sobre su capacidad biodegradadora y diversidad de bacterias aisladas de sitios contaminados con hidrocarburos en la Amazonía ecuatoriana.

Generalmente, las especies utilizadas para la recuperación de suelos utilizan como fuente de carbono al petróleo y sus componentes para llevar a cabo su metabolismo. En un principio, están presentes en el suelo contaminado en cantidad mínima y a través de nutrientes y condiciones físico-químicas propicias los organismos se reproducen en grandes cantidades. Por lo tanto, la recuperación de un ambiente contaminado con hidrocarburos por medio de la biorremediación exige un adecuado estudio y caracterización de los microorganismos presentes (Vizuete, 2011). El resultado final dependerá, en gran medida, de la toxicidad y la concentración inicial de los contaminantes, su biodegradabilidad, las propiedades del suelo contaminado y el sistema de tratamiento seleccionado. Tal es el caso de los estudios realizados con microorganismos autóctonos, como el que realiza Arrieta, Rivera, Arias, Rojano, Ruiz, y Cardona (2012) en un suelo contaminado por un derrame experimental en la Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía de la Sede Medellín, en el cual se caracterizó un consorcio bacteriano capaz de degradar los hidrocarburos presentes en una muestra de diésel integrado por los géneros *Enterobacter sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus aureus*, *Sanguibacter soli*, *Arthrobacter sp* y *Flavobacterium sp*. La reducción en la concentración de los hidrocarburos se desarrolló en un periodo de 4 meses cuantificando la eficiencia de remoción por cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS).

Por otro lado, los contaminantes tratados habitualmente por estos métodos son compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles no halogenados, así como también los derivados del petróleo como gasolina, diesel, etc. Sin embargo, cuando la contaminación incluye altas concentraciones de metales, compuestos orgánicos con alta proporción de cloro o sales inorgánicas, la eficacia del tratamiento se reduce debido a la toxicidad microbiológica de estos compuestos. De esta manera, Covarrubias, García, y Peña (2015), aseguran que los metales pesados no pueden descomponerse por vía biológica, física o química y la remediación de suelos contaminados con estos compuestos se limita a tratamientos que involucran la alteración de la solubilidad del metal, su toxicidad o su movilidad a través de cambios en su estado de valencia. En el caso de la biorremediación biológica, los procesos microbianos utilizados para la recuperación de suelos contaminados por metales incluyen bacterias del género *Rhizopus*, *Penicillium* y *Phanerochaete* (Covarrubias, García, y Peña, 2015).

En cuanto a las bacterias, son más de 100 las especies existentes, distribuidas en 30 géneros microbianos, capaces de usar los hidrocarburos como fuente de carbono para sus funciones metabólicas, siendo los géneros más conocidos, con capacidad biodegradadora: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Candida*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Fusarium*, *Micrococcus*, *Mucor*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio* (Vizúete, 2011).

Estos microorganismos necesitan de medios de cultivo específicos que permitan su aislamiento a partir de muestras contaminadas con hidrocarburos. En Colombia, por ejemplo, las empresas petroleras y multinacionales comercializadoras de hidrocarburos, han

venido implementando la biorremediación con lodos contaminados con hidrocarburos como una alternativa para el manejo de los residuos provenientes de los derrames ocasionados por las actividades de explotación, refinación, transporte y distribución del petróleo (Trujillo, y Ramírez, 2012). Sin embargo, para que la limpieza de los suelos contaminados sea un proceso eficiente, se deben tener condiciones óptimas de biodegradación, considerando variables como la humedad, el pH y el oxígeno en conjunto con la inoculación de la microbiota (Álvaro, Arocena, Martínez y Nudelman, 2017). Asimismo, la necesidad de nutrientes es un factor importante, administrando nitrógeno y fósforo en una proporción 100:10:1 en relación al carbono (C:N:P), mientras que, para favorecer un mayor crecimiento de microorganismos, el pH debe encontrarse en un intervalo de 6-8 y la temperatura de crecimiento en un rango entre los 15 a 40°C. Con temperaturas superiores a los 45°C disminuye la biodegradación debido a la desnaturalización de las enzimas dentro de la célula, y a temperaturas inferiores a 10°C se inhibe la acción de las enzimas al disminuir la velocidad de reacción de las mismas (Vizúete, 2011).

Por otro lado, al aplicar una mayor diversidad de microorganismos el proceso resulta ser más eficiente en la degradación de estos compuestos (Trujillo, y Ramírez, 2012). De esta manera, se determina el uso de otros organismos como hongos, algas, Cianobacterias y Actinomicetos para la degradación de estos compuestos tóxicos en el suelo (Arrieta, Rivera, Arias, Rojano, Ruiz, y Cardona, 2012).

Otro de los países dedicado a la producción y extracción de petróleo es México, en donde también se emplea la biorremediación con resultados regulares debido a problemas en la estimulación de las bacterias y del monitoreo continuo de los sitios (Ortínez, Ize y Gavilán,

2003). Un estudio realizado por Martínez, Pérez, Pinto, Gurrola y Osorio (2011) en la unidad minera San Antonio, perteneciente al grupo Goldcorp México, ubicada en el municipio de San Dimas, en Tayoltita, Durango, utiliza lodos residuales (biosólidos) provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas como una fuente alterna de macro y micronutrientes (C:N = 10:1) para lograr la estimulación bacteriana. En el estudio se evalúa el efecto de la adición de nutrientes, la densidad del material a remediar y la influencia del tamaño de la partícula en el proceso de degradación, demostrando que los lodos residuales propician la estimulación de los microorganismos nativos del suelo para degradar los hidrocarburos. El suelo sometido a remediación aeróbica alcanzó el límite máximo permisible (LMP) establecido en la normatividad mexicana vigente (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003) y se propone como alternativa para que la empresa minera cumpla con el programa Industria Limpia, al que está adscrita de manera voluntaria.

Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, se presenta este trabajo enfocado a dar una alternativa para la recuperación de ambientes contaminados, reduciendo eficientemente la toxicidad producida por el petróleo y sus derivados presentes en suelos, mediante la identificación de bacterias altamente eficientes para la transformación de hidrocarburos en compuestos menos tóxicos.

Materiales y métodos

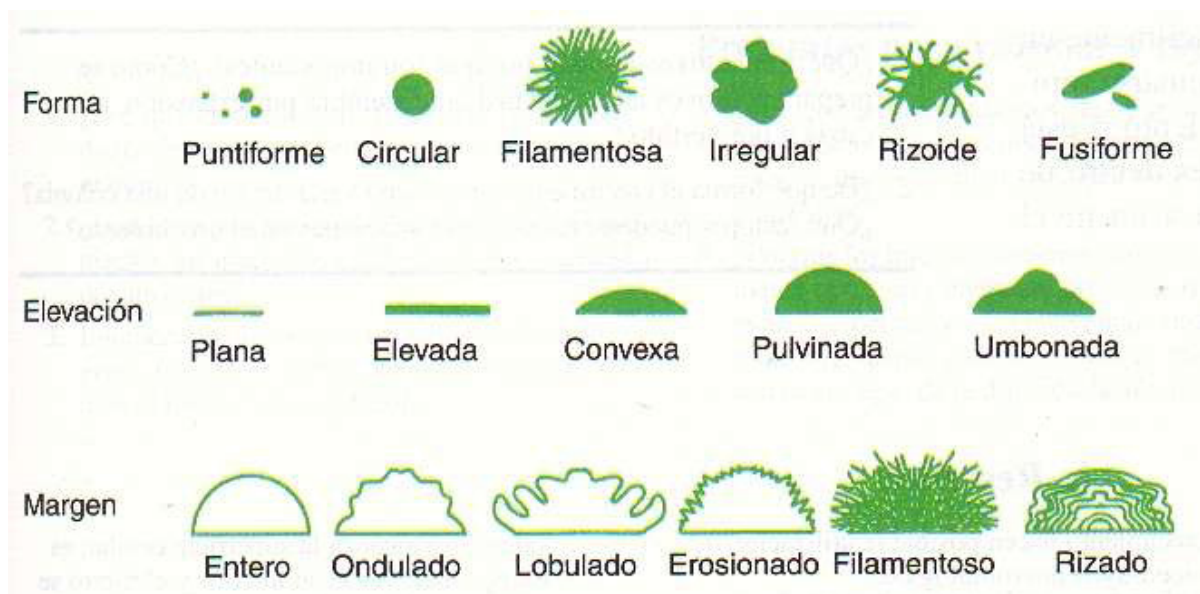
El trabajo se desarrolló bajo un enfoque cuantitativo, en la modalidad experimental de tipo exploratoria. Se utilizaron 81 bacterias aisladas a partir de suelos contaminados con petróleo. Los cultivos fueron recibidos en forma de suspensiones de células en glicerol al 20% (w/v) de la Colección de Cultivos del Departamento de Ciencias Biológicas de la

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH).

Estas suspensiones de células fueron preparadas en un medio de cultivo basal compuesto por glucosa (4 g/l), solución de sales traza (100 mg/ml), fosfato ácido de potasio (K_2HPO_4 , 4 g/l), agar (15 g/l) y nitrato de potasio (KNO_3 , 2 g/l), incubados a una temperatura de 28°C durante 5 días. Posteriormente, se observó la presencia de crecimiento evaluado a través de un código binario, estableciendo como uno (1) a la presencia de crecimiento y como cero (0) a la ausencia de crecimiento. El objetivo fue comprobar si las bacterias usaron el nitrógeno del nitrato de potasio (KNO_3) para su crecimiento como única fuente de nitrógeno, mientras que, las bacterias que no crecieron, fueron excluidas de las pruebas de degradación con hidrocarburos y extractos de suelos contaminados. Vizuet (2011), muestra una explicación más detallada de las técnicas empleadas para la conservación de las bacterias y la preparación de los medios de cultivo.

Los cultivos puros obtenidos se agruparon de acuerdo con la coloración y morfología de las colonias. Para la determinación del color de la colonia se utilizó una tabla estándar de colores del British Standard Specification for Colours for Identification Coding and Special Purposes (BS 381C SET:1996 [R2002]). Las características generales fueron descritas de acuerdo con la Figura 1, relacionadas a la forma, elevación y margen de las colonias que presentaron las bacterias.

Figura 1. Descripción morfológica de colonias bacterianas de acuerdo a la forma, elevación y margen



Fuente: Mc Graw-Hill Companies Inc., 2013.

Igualmente, se realizó la caracterización microscópica a través de un frotis y una tinción con violeta de cristal para identificar las células Gram positivas (teñidas de morado) y las Gram negativas (teñidas de rojo). La presencia de endosporas se determinó al notar esporas en el centro de la célula bacteriana o en partes cercanas al extremo de la misma.

Para la determinación de la capacidad degradadora se preparó un medio de cultivo enriquecido con petróleo, gasolina, y diésel. Adicionalmente se usaron dos medios cuya composición fue solamente extracto de suelo, sales traza y agar. Los suelos usados para la preparación del extracto contenían diferentes valores de hidrocarburos, determinados por el laboratorio de suelos, aguas y plantas, Coca-Orellana-Ecuador (LABSU), los cuales fueron de 31000 ppm de hidrocarburos para suelo arcilloso y 46000 ppm para suelo arenoso. Se inocularon las suspensiones de células e incubaron a 28°C durante un mes, con revisiones periódicas cada cinco días. La presencia de

crecimiento fue evaluada mediante código binario, midiendo también el diámetro polar y ecuatorial de la colonia (mm) y el diámetro de degradación (mm).

Finalmente, para la realización de las pruebas fisiológicas de crecimiento, en relación a diferentes tipos de agar con hidrocarburos y agar con suelo contaminado, se determinaron las condiciones de pH y temperatura, seleccionando al azar 24 cultivos bacterianos. Estos cultivos fueron escogidos para el rango de crecimiento en función de la temperatura; las cajas de petri se incubaron a 50, 7 y 4°C durante 2, 4 y 7 días, respectivamente. En función del pH, las suspensiones de células previamente preparadas sobre la superficie de agar nutritivo, fueron sometidas a pH 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, y 9.5, ajustados con la ayuda de búferes para evitar cambios debido al metabolismo de los microorganismos. Las cajas de petri se incubaron a 28°C durante 7 días y transcurrido el tiempo de incubación se observó el crecimiento, evaluándose mediante código binario.

Se realizó un diseño experimental AxB con dos repeticiones. El factor A estuvo relacionado a las diferentes cepas bacterianas aisladas de suelos contaminados con petróleo, el factor B constituyó los diferentes hidrocarburos usados en los medios de cultivo (petróleo, gasolina, diésel) y los medios de cultivo con dos extractos de suelo (arenoso y arcilloso). El número final de tratamientos se determinó solamente con aquellas bacterias que crecieron sobre los diferentes medios. Los parámetros evaluados fueron la presencia de crecimiento, el diámetro de la colonia y el diámetro del halo de utilización.

Los datos fueron analizados con el programa estadístico Design, Management, and Statistical Research Tool (MSTATC) en el cual se determinó el análisis de varianza y en los casos en que el análisis de varianza mostró diferencias significativas, se realizó la separación de medias mediante la prueba de Tukey al 5% de significancia.

Con los resultados de las pruebas fenotípicas relacionadas a las características macroscópicas y microscópicas, el crecimiento en diferentes valores de pH y temperatura y los valores obtenidos luego de realizar la prueba de Tukey con las medias del crecimiento bacteriano a los 30 días, se observa que, de los 24 cultivos bacterianos escogidos al azar, se construyó una base de datos, en código binario, con el número de pruebas o características estudiadas. La información fue procesada con el software estadístico NTSys, en el que se calcularon los porcentajes de similaridad entre las bacterias estudiadas, usando el coeficiente de simple coincidencia (SSM). Finalmente, los porcentajes fueron utilizados para construir un dendrograma mediante el uso del algoritmo Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means (UPGMA) del mismo programa. Una vez obtenido éste gráfico, se identificaron los grupos especie basados en un coeficiente de similaridad mayor al 85%.

Resultados

De los 90 cultivos recibidos, solamente 81 bacterias fueron recuperadas, purificadas y almacenadas, excluyendo del estudio 9 cepas porque no se lograron recuperar desde los stocks recibidos. De estas 81 bacterias del stock inicial 10 no presentaron crecimiento y fueron descartadas, por lo tanto, 71 bacterias fueron las que finalmente presentaron resultados positivos para ser sometidas tanto a pruebas de caracterización fenotípica como a pruebas de degradación. El crecimiento fue evaluado mediante código binario.

En la caracterización macroscópica de las 71 bacterias se obtuvieron tres colores diferentes en las colonias formadas, el color crema (deep cream 353) fue el predominante con 42 bacterias, 20 bacterias color amarillo (golden yellow 356) y 9 bacterias color blanco (white). En cuanto a la descripción morfológica de las colonias bacterianas, según su forma, se obtuvieron 56 bacterias con forma circular de la colonia y 15 bacterias con forma irregular. De acuerdo con la elevación de la colonia se registraron 42 bacterias con elevación plana y 29 bacterias con elevación convexa. Según el margen de la colonia se encontraron 51 bacterias con margen entero, 6 bacterias con margen lobado y 14 bacterias con margen ondulado.

Respecto a la caracterización microscópica se obtuvieron 69 bacterias en forma de bacilos y 2 bacterias en forma de cocos observadas bajo el microscopio. En el caso de las tinciones, 5 bacterias resultaron Gram positivas, 66 bacterias fueron Gram negativas, 19 bacterias con presencia de capsula y 52 bacterias con ausencia de capsula. Las bacterias con resultado positivo en la tinción de Gram (Código AX: 03 – 64 – 65 -80–86) fueron sometidas a tinción de endosporas sin lograr resultados positivos. El resultado positivo o negativo de estas pruebas fue evaluado mediante código binario.

Los resultados del crecimiento en función de la temperatura se determinaron en 24 bacterias de los 71 microorganismos utilizados en el estudio, presentando un mejor crecimiento y halos de degradación a 37°C. Entre 12 y 15 bacterias lo hicieron a 50°C y 12 crecieron a 4°C de temperatura.

Cabe mencionar que la temperatura a 37°C si bien no fue seleccionada inicialmente, fue definida debido a que corresponde a la temperatura promedio en la zona donde existe la mayor parte de producción de petróleo.

En los rangos de pH, las 24 bacterias presentaron un rango para su crecimiento

entre 5,5–6,5 hasta 7,5. Solamente 4 bacterias no crecieron a rangos de pH 4,5, 3,5 – 8,5 y 9,5, debido a que los suelos destinados a biorremediación no se encuentran a rangos de pH muy ácidos y básicos.

Por otro lado, el dendrograma basado en la similaridad entre los microorganismos se muestra en la Figura 2. Las 24 bacterias estudiadas formaron 18 grupos especie, de los cuales, 4 presentaron más de un miembro, el grupo 15 presentó 4 miembros mientras que el resto de los grupos están formados por un solo miembro. Es importante notar que lo grupos 8, 9, 10, 11, 12, 17 y 18 representan a las bacterias con los mejores diámetros de crecimiento a los 30 días.

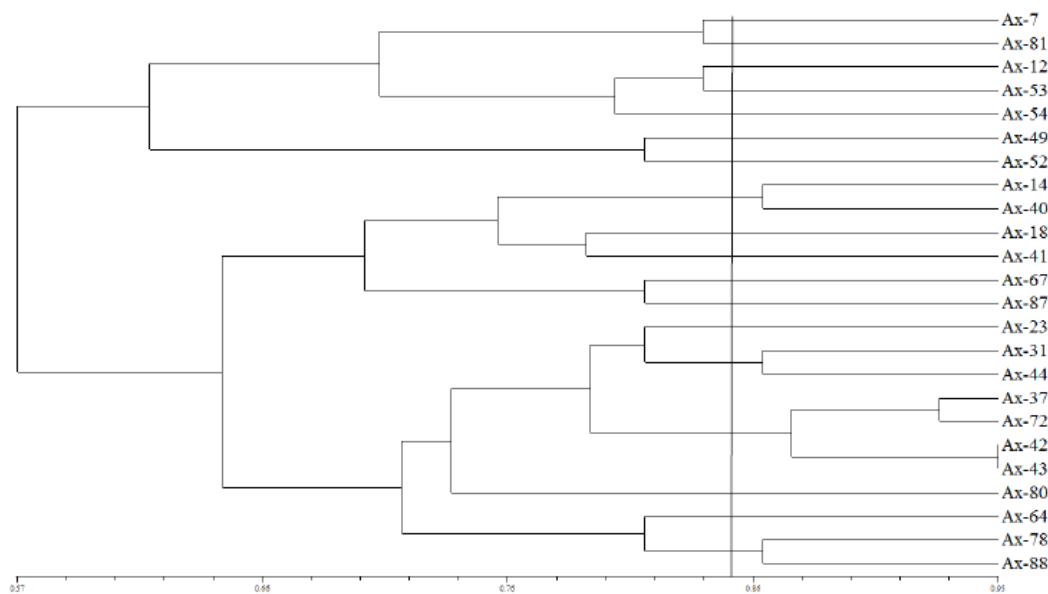


Figura 2. Dendrograma basado en la similaridad entre los microorganismos (Vizuete, 2011).

Todas las 71 bacterias mostraron crecimiento en los diferentes medios de cultivo enriquecidos con hidrocarburos como petróleo, gasolina, diesel, de igual manera en los medios con extracto de suelos contaminados, siendo que 13 bacterias formaron halos de degradación.

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas entre los tratamientos A (bacterias) y B (medios de cultivo), así

como para la interacción AB. A los 5 días de incubación se presentaron los crecimientos más deficientes tanto en el factor A (AX 48 con 3.75 mm), el factor B (tratamiento 1 con petróleo con 3.38 mm) y la interacción AB (AX 85 con gasolina con 2 mm). Los mayores crecimientos se determinaron a 25 días de incubación para el factor A (AX 67 con 11.75 mm) y a 30 días de incubación para el factor B (tratamiento 4 agar extracto de suelo

arenoso) y la interacción AB (AX 18 diésel con 21.75 mm). Particularmente, la cepa AX 67 presentó un crecimiento significativo en los cinco medios de cultivo empleados. Vizquete (2011), señala una descripción más completa de estos procedimientos.

Discusión

En la determinación del uso de KNO_3 como única fuente de nitrógeno, la mayoría de las bacterias dieron un resultado positivo. Se reporta que las bacterias asimilan estos elementos en forma inorgánica y oxidada pues el nitrógeno es un elemento fundamental en el metabolismo de los microorganismos que es incorporado en las células bacterianas para producir aminoácidos y proteínas.

Igualmente, se demuestra que la mayoría de las bacterias, según su morfología y caracterización microscópica, pertenecen al mismo grupo de microorganismos, mientras que aquellos organismos diferentes fueron minoría. La gran mayoría de las bacterias son Gram negativas, lo que podría indicar que están adaptadas de mejor manera a sitios en donde han ocurrido derrames y están contaminados con residuos de petróleo. Así mismo, los resultados obtenidos en las pruebas fisiológicas relacionadas a temperatura son un indicativo de las características del lugar de donde provienen las bacterias. Por ello, fue posible encontrar bacterias que soportaron temperaturas de 37°C e incluso algunas con características termofílicas, que soportaron temperaturas de 50°C por siete días. Estas bacterias podrían ser usadas en otros lugares en donde existen sitios para biorremediación en la región amazónica. Pero un resultado de mayor significancia es el que presentaron doce (12) bacterias, al crecer en temperatura de 4°C , factor que las hace importantes cuando ocurran derrames de petróleo a bajas temperaturas. Así mismo, el

rango de crecimiento de pH de la gran mayoría de bacterias se encontró desde ácidos a neutros, lo que permitiría que estos microorganismos sean usados dentro de estos rangos, que son los más comunes en donde existen sitios para biorremediación.

Por otro lado, las bacterias empleadas en este trabajo son altamente eficientes para utilizar como fuente de carbono los hidrocarburos, el diésel, la gasolina y el petróleo, y que además crecen bien en suelos con altos niveles de contaminación. Todos los 71 cultivos bacterianos crecieron en los cinco medios de cultivo estudiados. Esto es un indicativo de la gran importancia que tiene aislar microbios de sitios contaminados con petróleo, para luego usarlos en biorremediación.

También es muy importante notar que los mejores resultados se obtuvieron con los medios de cultivo que se prepararon con extracto de suelo, ya sea arcilloso o arenoso, debido a que el extracto no solamente contiene los contaminantes, sino que también otro tipo de nutrientes que son extraídos y forman parte del medio. De esta manera, cabe la posibilidad de haber encontrado bacterias que ya se encuentran adaptadas a estos suelos contaminados, facilitando el proceso de utilización de las mismas en biorremediación. Por otro lado, hay cepas como la AX 67, que presentó un diámetro de crecimiento en los cinco medios de cultivo. La literatura reporta que estas técnicas de descontaminación se basan en la digestión de las sustancias orgánicas por los microorganismos, de la cual obtienen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas que necesitan sus células para su crecimiento.

Los 18 grupos formados a partir de las 24 bacterias seleccionadas al azar, demuestran que existe una diversidad fenotípica muy grande,

siendo que varios de estos grupos de especie corresponden a nuevas especies de bacterias biodegradadoras. Esto provee una plataforma sólida para continuar con estudios que demuestren la factibilidad de usar un bioproducto basado con las bacterias antes mencionadas, primero en condiciones de microcosmos en el laboratorio, y luego en pruebas a campo abierto mediante la implementación de programas de biorremediación in situ o ex situ.

Conclusiones

Solamente 71 bacterias del stock inicial mostraron crecimiento en el medio de cultivo con KNO_3 , las cuales fueron usadas en la determinación de la capacidad biodegradadora. La gran mayoría de las bacterias presenta características mesofílicas, de acuerdo con los requerimientos de temperatura, así como también, un rango de crecimiento en relación al pH entre 5.5 hasta 7.5. Todas son bacilos Gram negativos, sin cápsulas y el mejor crecimiento se obtuvo en los medios preparados con extracto de suelo contaminados con diferentes niveles de hidrocarburos. Igualmente, las 71 bacterias utilizan como fuente de carbono para su metabolismo al diésel, la gasolina y el petróleo. Se identificaron 18 grupos especie usando la taxonomía numérica de datos fenotípicos. Cuatro están constituidos por más de un miembro, mientras que los grupos restantes constan de un solo miembro.

Agradecimientos

A la Universidad Técnica de Ambato, en la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos carrera de Ingeniería Bioquímica por todas las prestaciones dadas para la realización del trabajo.

Referencias

- Álvaro, C.S., Arocena, L.A., Martínez, M.A. y Nudelman, N.E.S. (2017). Biodegradación aerobia de fracciones de hidrocarburos provenientes de la actividad petrolera en un suelo de la región patagonia norte, Argentina. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 33 (2) 247-257. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.02.06.
- Arrieta Ramírez, O., Rivera Rivera, A., Arias Marin, L., Rojano, B., Ruiz, O. & Cardona Gallo, S. (2012). Biorremediación de un suelo con diésel Mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente*, 15 (1), 27-39.
- Covarrubias, S., García Berumen, J. & Peña Cabriales, J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, 25 (3), 40-45. ISSN: 0188-6266.
- Fabelo Falcón, J.A. (2017). Propuesta de metodología para la recuperación de suelos contaminados. *Centro Azúcar Vol. 44*, No. 1, pp. 53-60.
- Jochnick, C., (1994) Violaciones de derechos en la Amazonía Ecuatoriana. Las consecuencias humanas del Desarrollo Petrolero. CERS., Quito 56-58.
- Martínez-Prado I, A., Pérez-López, M.E., Pinto-Espinoza, J., Gurrola-Nevárez, B.A., Osorio-Rodríguez, A.I. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. *Rev. Int. Cont. Amb.* 27(3) 241-252.
- Mc Graw-Hill Companies Inc., 2013.

Mendoza, J.C., Perea, Y.S., Salvador, J.A., Morales, J.A. y Pérez, G. (2011). Biodegradación bacteriana de plaguicidas permetrina y cipermetrina en cultivo lote., ACI, Vol. 2, No. 3, pp. 45-55.

Navas, S. Hidalgo, D.; Estrella, B. y Serrano, P., (2008) Tratamiento biológico de suelos contaminados con del campo Sacha mediante el empleo de cepas bacterianas nativas. III Congreso de Ciencia y Tecnología ESPE. Laboratorio de Ciencias Biotecnológicas (LACIB), Proyecto Eliminación de Piscinas y limpieza de derrames en el Distrito Amazónico (PEPDA) de PETROPRODUCCIÓN, Joya de los Sachas, Orellana, 32-40.

Trujillo Toro, M.A. y Ramírez Quirama, J.F. (2012). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. Revista de Investigación Agraria y Ambiental, Volumen 3 Número 2. ISSN 2145-6097.

Vizquete, R. (2011). Determinación de la capacidad biodegradadora de hidrocarburos de bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo. Proyecto de Trabajo de Graduación, modalidad Trabajo Estructurado de Manera Independiente, presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico, por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Ambato, Ecuador, 192 pp.