

CARACTERIZACIÓN DE CONSUMO DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO
Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO POR *KRIBBELLA SP* NATIVA DEL
PIEDEMONTTE LLANERO



JEIMY GERALDINE VILLALOBOS FLOREZ
GERMÁN ANDRÉS NIÑO CÉSPEDES



UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
VILLAVICENCIO

2020

CARACTERIZACIÓN DE CONSUMO DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO
Y FIJACIÓN DE NITRÓGENO ATMOSFÉRICO POR *KRIBBELLA SP* NATIVA DEL
PIEDEMONTTE LLANERO

JEIMY GERALDINE VILLALOBOS FLÓREZ
GERMÁN ANDRÉS NIÑO CÉSPEDES

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingenieros Ambientales

Asesor

Rodrigo Isaac Velosa Caicedo, Biól. M.Sc.

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
VILLAVICENCIO

2020

Autoridades Académicas

P. JOSÉ GABRIEL MESA ANGULO, O. P.

Rector General

P. EDUARDO GONZÁLEZ GIL, O. P

Vicerrector Académico General

P. JOSÉ ANTONIO BALAGUERA CEPEDA, O.P.

Rector Sede Villavicencio

P. RODRIGO GARCÍA JARA, O.P.

Vicerrector Académico Sede Villavicencio

Mg. JULIETH ANDREA SIERRA TOBÓN

Secretaria de División Sede Villavicencio

YESICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN

Decano Facultad de Ingeniería Ambiental

Nota De Aceptación

YESICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN

Decano de Facultad

RODRIGO ISAAC VELOSA CAICEDO

Director Trabajo de Grado

YURI TATIANA CÁRDENAS

jurado

LUZ ANGELA CUELLAR RODRIGUEZ

jurado

Dedicatoria

*A Dios por la oportunidad de permitirme culminar
mi proceso en la formación como Ingeniero Ambiental, a mi madre inmensamente
por su entrega y dedicación al apoyarme en todos mis proyectos en mi vida.*

Germán Andrés

*Lo dedico principalmente a Dios,
Por darme la vida, voluntad y la fuerza de seguir adelante en mis
Proyectos; igualmente a mis padres que siempre han sido mi ejemplo a seguir
Llenándome de seguridad y han sido pioneros en este recorrido, apoyándome
En el transcurso de mi vida profesional.*

Geraldine

Agradecimientos

Expresamos una gratitud a todos aquellos profesionales, directivos y todo el cuerpo de trabajo de la Universidad Santo Tomás por la experiencia el acompañamiento y conocimiento aportado durante este recorrido universitario. Especialmente destacamos la labor de los docentes Alfonsina Bocanegra por su gran trabajo al inicio de la idea de nuestro proyecto de grado , a María Alexandra Méndez Leal por su dedicación en su profesión, la paciencia y entrega en la orientación que ha tenido durante el presente proyecto, igualmente a nuestro director Rodrigo Isaac Velosa Caicedo por su presta colaboración y disposición frente a todas las inquietudes y observaciones, su valioso conocimiento fue de importancia en la elaboración del documento.

Contenido

	Pág.
Resumen	14
Introducción	16
1. Planteamiento del problema	18
1.1 Formulación entorno al problema	20
2. Objetivos	21
2.1 Objetivo general	21
2.2 Objetivos específicos	21
3. Justificación	22
4. Alcance	24
5. Antecedentes	25
6. Marco de referencias	27
6.1 Marco Teórico	27
6.1.2 Alternativas de manejo biológico a suelos ácidos con microbiota presente	28
7. Marco conceptual	30
7.1 Actinomicetos	30
7.2 Fijación de Nitrógeno	30
7.3 Consumo de hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono	31
6.3 Marco Legal	32
8. Metodología	35
8.1 Selección de Bacterias en medio de cultivo modificado	35
8.1.1 Caracterización macroscópica.	36
8.1.2 Caracterización microscópica.	36
8.2 Recuento de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno en Medio de Cultivo Rennie Modificado -BLFN	36
8.3 Caracterización bioquímica.	36
8.3.1 Prueba de la Oxidasa:	37
8.3.2 Prueba de la Catalasa.	37

8.3.3	Prueba de Citrato de Simmons.	37
8.3.4	Prueba agar triple azúcar hierro (TSI).	37
8.3.5	Prueba de Agar Lisina Hierro (LIA).	38
8.3.6	Prueba de Sulfuro indol y movilidad SIM.	38
8.3.7	Prueba de Tioglicolato.	38
8.4	Identificación molecular de bacterias	38
8.4.1	Potencial bacterias libres fijadoras de nitrógeno (Prueba nitritos y amonio)	39
8.4.2	Diseño experimental y Análisis estadístico	39
9.	Resultados y análisis de resultados	40
9.1	Caracterización fenotípica de las cepas (Kribbella)	40
9.2	Recuento de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno en Medio de Cultivo Rennie Modificado –BLFN	41
9.3	Caracterización bioquímica	44
10.	Discusión de Resultados	48
11.	Conclusiones	50
12.	Recomendaciones	51
13.	Referencias Bibliográficas	52
14.	Apéndices	57

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Normatividad Legal Vigente para el recurso suelo	32
Tabla 2. Descripción Macroscópica y microscópica de las cepas <i>Kribbella sp.</i>	40
Tabla 3. Caracterización bioquímica de las cepas seleccionadas en el estudio	45
Tabla 4. Resultados de análisis de producción de nitritos y amoniaco por el laboratorio Tecno Ambiental	46

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Diagrama Metodológico del estudio experimental de la caracterización de consumo de Hidrocarburos Totales de Petróleo por <i>Kribbella sp</i>	35
Figura 2. Comparativa de densidad microbiana en UFCg-1 entre muestra testigo y concentración de 2500mg kg-1 de diésel y gasolina	42
Figura 3. Comparativa de densidad microbiana en UFCg-1 entre muestra testigo y concentración de 6100mg kg-1 de diésel y gasolina	43
Figura 4. Comparativa de densidad microbiana en UFCg-1 entre muestra testigo y concentración de 9800mg kg-1 de diésel y gasolina	44
Figura 5. Efecto de la densidad de BLFN sobre el Nitrógeno Total a los diferentes Tratamientos durante 1 mes en diésel y gasolina	46

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Ubicación espacial del laboratorio de Microbiología de la Universidad Santo Tomás, sede Villavicencio.	57
Apéndice B. Árbol filogenético de la cepa D_04	58
Apéndice C. Árbol filogenético de la cepa D_05	59
Apéndice D. Árbol filogenético de la cepa D_09	60
Apéndice E. Árbol filogenético de la cepa D_11	61
Apéndice F. Selección de cepas que crecieron para el desarrollo para las concentraciones de los hidrocarburos	62
Apéndice G. Prueba estadística Tukey para diferencias significativas entre tratamientos	63

Glosario

ACTINOMICETO: Grupo heterogéneo de bacterias filamentosas parecidas superficialmente a los hongos. El crecimiento característico es un micelio ramificado que tiende a fragmentarse en elementos bacterianos. Muchos actinomicetos llevan vida libre, particularmente en el suelo.

ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: Son moléculas de naturaleza proteica y estructural que catalizan reacciones químicas, siempre que sean termodinámicamente posibles: una enzima hace que una reacción química transcurre a una mayor velocidad respecto a la ausencia de la enzima.

AISLAMIENTO BACTERIANO: Es la separación de un determinado microorganismo del resto que le acompañan. técnicas usadas en el laboratorio de microbiología para la transferencia de un microorganismo de un ambiente a otro con la finalidad de inducir su crecimiento para su identificación.

BACTERIAS SOLUBILIZADORA DE FOSFATOS: Incluyen algunos géneros de actinomicetos. Las BSF pueden ser de vida libre en el suelo o establecer relaciones simbióticas con algunas plantas, son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de la planta y favorecer su crecimiento o desarrollo por medio de la solubilización de fosfato inorgánico de diferentes compuestos como son el fosfato bicálcico, fosfato tricálcico y rocas fosfóricas

CEPA: Conjunto de bacterias con igualdad en términos de sus características biológicas, es decir, bacterias de la misma especie, se llaman cepas o colonias bacterianas.

CURVAS DE CRECIMIENTO: Resulta de la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación.

ENZIMAS: Son catalizadores eficaces y muy específicos que aceleran notablemente una reacción, aceptan sustratos (moléculas que sufrirán las reacciones) altamente específicos, es decir catalizan una sola reacción o un grupo pequeño de reacciones muy parecidas y permiten que los equilibrios químicos se establezcan muy rápido.

FIJACIÓN DE NITRÓGENO: La fijación de nitrógeno (N₂) es un proceso que llevan a cabo algunos microorganismos procariotes, esta habilidad da la ventaja de no depender de otras especies disponibles de nitrógeno.

HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP): Término utilizado para cualquier mezcla de hidrocarburos que se encuentran en el petróleo crudo. Hay varios cientos de estos compuestos, pero no todos ocurren en una sola muestra.

HIDRÓLISIS: Reacción química entre una molécula de agua y otra de macromolécula, en la cual la molécula de agua se divide y sus átomos pasan a formar unión de otra especie química

MEDIO DE CULTIVO: Son una mezcla equilibrada de nutrientes requeridos a concentraciones que permiten el crecimiento de los microorganismos. Deben contener todos los nutrientes necesarios en cantidades apropiadas a los requerimientos de los microorganismos y en condiciones de pH, presión osmótica, oxígeno disuelto, etc., adecuados para el crecimiento

METABOLISMO BACTERIANO: Se refiere al conjunto de reacciones químicas que se producen en la célula y tiene tres funciones específicas. La primera es obtener energía química del entorno y almacenarla, para luego usarla en diferentes funciones celulares. La segunda es convertir los nutrientes exógenos en unidades precursoras de los componentes macromoleculares de la célula bacteriana. Y la tercera función es formar y degradar moléculas necesarias para cumplir funciones celulares específicas, por ejemplo: movilidad y captación de nutrientes

PIEDEMONTES LLANEROS: Es una subregión de Colombia, que se caracteriza por ser el límite entre las cordilleras y los Llanos Orientales. Se ubica en las estribaciones de la Cordillera Oriental y abarca parte de los departamentos de Arauca, Boyacá, Casanare, Meta y Caquetá.

SUELO INCEPTISOL: Son aquellos suelos que están empezando a mostrar un desarrollo de los horizontes, porque su tiempo de desarrollo es bastante joven. Están más desarrollados que los Entisoles, pero carecen de los rasgos característicos de los otros órdenes del suelo

Resumen

El presente estudio apoyó la fase II del macro-proyecto “*Comportamiento de las características físicas, químicas y microbiológicas en suelos de vocación agrícola artificialmente contaminados con Gasolina y Diésel en el piedemonte llanero del Municipio de Cumaral (Meta)*”, al determinar el consumo de crudo de petróleo como única fuente de carbono, de la cepa de actinomiceto *Kribbella sp*, a la vez, que continúe realizando la fijación de nitrógeno atmosférico, capacidad enzimática demostrada a partir de los aislamientos realizados en la primer fase del proyecto. La correlación de los datos se obtuvo, mediante pruebas en laboratorio, a través del cultivo en medio líquido y sólido, empleando como única fuente de carbono dos combustibles derivados del petróleo, diésel y gasolina a diferentes concentraciones, determinando las curvas de crecimiento con la relación entre la densidad celular versus la presencia de hidrocarburos totales de petróleo – HTP-.

Con el fin de establecer la eficiencia de consumo de productos derivados del petróleo y conservación de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico por parte del actinomiceto nativo del piedemonte llanero.

Palabras Clave: Hidrocarburos Totales de Petróleo, actinomiceto, suelo, piedemonte llanero, cepa.

Abstract

This study supported phase II of the macro-project "Behaviour of physical, chemical and microbiological characteristics in agricultural soils artificially contaminated with Gasoline and Diesel in the plain footof of the Municipality of Cumaral (Target)", in determining the consumption of petroleum crude as the only source of carbon, of the *Kribbella sp* actinomycete strain, while continuing to fix atmospheric nitrogen, an enzyme capacity demonstrated from the insulations made in the first phase of the project. The correlation of the data was obtained, through laboratory testing, through the cultivation in liquid and solid medium, using as the only source of carbon two fuels derived from oil, diesel and gasoline at different concentrations, determining the growth curves with the relationship between cell density versus the presence of total hydrocarbons of oil –HTP-.

In order to establish the efficiency of consumption of petroleum products and conservation of the ability to fix atmospheric nitrogen by the native actinomycete of the plain piedemonte.

Key Word: Total Petroleum Hydrocarbons, Actinomycetyte, Soil, Plain Piedemonte, Strain.

Introducción

La contaminación del suelo por hidrocarburos afecta la flora, fauna y microorganismos presentes, la fertilidad, el crecimiento de las plantas, así como la existencia y sobrevivencia de los animales que se alimentan de éstas. Además, también puede haber una afectación en el ámbito social que incluye a los sistemas de producción, la salud, la economía y las formas de vida de las poblaciones, debido a los efectos de estos compuestos los cuales son tóxicos para los humanos (mutagénicos y carcinogénicos) y para los seres vivos en sus diversas formas (micro flora, mesofauna y fauna) (carvazos arroyo , 2014)

El conocimiento de la diversidad microbiana del suelo es de gran importancia para determinar que poblaciones pueden estar implicadas en la degradación de hidrocarburos. El actinomiceto nativo *Kribbella sp.*, previamente aislado de suelo del Piedemonte Llanero (en los predios de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía) y contaminado artificialmente con los combustibles diésel y gasolina en medio selectivo Rennie modificado, ha demostrado la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, función clave en los procesos del suelo, a través de la capacidad de amonificar - fijar N_2 en forma de NH_4^+ , es decir, formar compuestos amoniacales; esta función permite al resto de biota, tomar el nitrógeno para sus funciones vitales, y seguirlo transformando en nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), siendo, esta última la forma en que las plantas toman el nitrógeno del suelo (Iñon, 2018)

Kribbella sp., pertenece a un grupo de actinomicetos que se ha descubierto recientemente y algunos aislamientos se han generado a partir del suelo; en Yunnan, China en 2006, se aisló a *Kribbella yunnanensis sp.* y *Kribbella alba sp.* (Wen, Dong, yu-quin, Li- Hua, & Cheng- Li , 2006); en el mismo año, en la montaña de Groot Swartber en Sudáfrica, se aisló a *Kribbella swartbergensis*, cepa con la capacidad de emplear adenina, caseína, gelatina e hipoxantina ; la especie *Kribbella karoonensis*, fue aislada de suelo recogido de la base del árbol gigante de aljaba (*Aloe pillansii*), que crece en el desierto de Karoo, en el Jardín Botánico Nacional Worcester de la provincia del Cabo Occidental (Bronwyn , Le Rouse, & Meyers, 2006).

La habilidad de las poblaciones nativas de bacterias para degradar hidrocarburos constituye uno de los mecanismos principales con el que cuentan determinados ambientes para mitigar el impacto causado por la presencia del petróleo crudo y sus derivados; dependiendo de sus capacidades estos microorganismos son seleccionados para diferentes funciones y aplicarlos en ambientes para restauración.

En el presente estudio se evaluó, en reactores *in vitro*, el consumo de diferentes concentraciones de diésel y gasolina - informándolo en Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) por parte de la bacteria nativa *Kribbella sp*;; a la vez se registró la biomasa producida mediante curvas de crecimiento, y el mantenimiento de la capacidad de fijar N₂ en el suelo.

1. Planteamiento del problema

Los derrames de crudo en Colombia han ocasionado miles de hectáreas de suelo afectadas, con la consecuente contaminación de kilómetros de ríos y quebradas. Estas afectaciones son de diferente naturaleza, ya sea como resultado de vertimientos a partir de las actividades de procesamiento del crudo de petróleo, por fugas desde vehículos de carga pesada, por transporte de mercancías o familiares, por actos terroristas sobre la infraestructura petrolera y como resultado de los procesos de laboreo de la tierra por parte de la maquinaria empleada (Ibarra, 2018). Aunque se han aplicado diversas metodologías para su recuperación, los procesos de descontaminación no alcanzan a cubrir todas las áreas afectadas y se realizan mucho tiempo después de que el crudo o sus derivados han penetrado en el ecosistema (torres delgado & zuluaga montoya , 2009)

“Los efectos producidos por la contaminación del suelo provocada por Gasolina y Diésel son negativos, ya que los compuestos químicos que los conforman son tóxicos y ocasionan cambios en las propiedades físicas, químicas del suelo y su microbiota” (Páez y Bautista, 2012).”La microbiota del suelo ha demostrado ser esencial para el mantenimiento de los procesos ecosistémicos y es la base del equilibrio de los procesos” (Bartha, 1986), “por lo que la contaminación con hidrocarburos conlleva graves consecuencias en la salud humana y del medio Ambiente” (Benavides, 2006).

Los suelos de piedemonte llanero son degradados en su mayoría por actividades agropecuarias y petroleras; éstos últimos pueden ocasionar efectos negativos, ya que los compuestos químicos que los conforman son tóxicos y ocasionan cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. (Leal, 2017) “Aunque los suelos del piedemonte llanero son altamente susceptibles a la degradación, los estudios de su comportamiento y recuperación ante eventos de contaminación por crudo de petróleo o sus derivados son escasos” (Leal, 2017). Así mismo, debe tenerse en cuenta la presión ejercida sobre este recurso en el Piedemonte, ya que se ha destinado en gran parte a la actividad agropecuaria, siendo una de las más importantes actividades económicas del departamento; los principales cultivos son arroz, palma africana, plátano, maíz, cacao, cítricos y otros frutales (IGAC, 2017) .

En los suelos, los microorganismos como bacterias y hongos, debido a sus diversas propiedades metabólicas, son los encargados de realizar la recuperación final. En este contexto, en la fase I del macro-proyecto de investigación del Grupo GAUV titulado “*Comportamiento de las características físicas, químicas y microbiológicas en suelos de vocación agrícola artificialmente contaminados con Gasolina y Diésel en el piedemonte llanero del Municipio de Cumaral (Meta)*”, se determinó las diferentes capacidades de degradación por parte de la microbiota endémica en un suelo del tipo inceptisol, reconocido como un suelo de desarrollo joven, el cual empieza a mostrar formación de los horizontes, y es altamente susceptible de ser afectado por la erosión, deposición y movimiento en masa; este tipo de suelo generalmente se aprovecha para uso forestal, para habilitación de pasturas y para la agricultura, no obstante su tendencia a ser ácidos que condiciona la necesidad de ser encalados y fertilizados. En dicho macroproyecto el suelo fue contaminado artificialmente en condiciones *ex situ* con gasolina y diésel, logrando el aislamiento de actinobacterias y hongos con diferentes capacidades metabólicas y de hidrólisis de la celulosa, importante para la biodisponibilidad del carbono, la formación del suelo, la fijación de nitrógeno atmosférico y la solubilización de fosfatos, función clave para la conservación de la fertilidad como promotora del crecimiento vegetal (Salinas Vera, 2019)

En el presente estudio se evaluó el consumo de Hidrocarburos Totales de Petróleo –HTP–, empleados como única fuente de carbono por el actinomiceto *Kribbella sp* (*RNAr 16S*), y de su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico; este microorganismo fue aislado del suelo de piedemonte llanero, específicamente del predio dedicado al cultivo agrícola en la Institución Educativa Agrícola de Guacavía, de Cumaral –Meta.

1.1 Formulación entorno al problema

Es de suponer que la capacidad de degradación de diésel y gasolina por el microorganismo varíe en función de la concentración de estos compuestos en el suelo. Por consiguiente, se planteó la siguiente pregunta: ¿Cuál será el consumo de Hidrocarburos Totales de Petróleo y fijación de nitrógeno atmosférico por medio del actinomiceto *Kribbella sp* nativo del piedemonte llanero, en medio líquido, variando las concentraciones de diésel y gasolina durante un periodo de cuatro meses en la Institución Agrícola de Guacavía, Cumaral, M.?

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Caracterizar el comportamiento de consumo de Hidrocarburos Totales de Petróleo –HTP- y de fijación de nitrógeno atmosférico por *Kribbella sp*, especie nativa del piedemonte llanero

2.2 Objetivos específicos

- Evaluar el crecimiento de la cepa de *Kribbella sp* variando la cantidad de diésel y gasolina en concentraciones de (2500, 6100 y 9800 mg kg⁻¹) experimentales.
- Determinar el consumo de HTP y el mantenimiento de la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, por la cepa de *Kribbella sp*.
- Correlacionar la densidad celular versus la presencia de HTP, a partir de cada una de las diferentes concentraciones de diésel y gasolina experimentales.

3. Justificación

En las últimas décadas los hidrocarburos han dado lugar a una amplia liberación de contaminantes en el medio ambiente; reportan la afectación que los hidrocarburos generan a la fertilidad a través de mecanismos como la toxicidad directa en los organismos en el suelo, reducción en la retención de humedad y/o nutrientes, compactación, cambios en pH y salinidad. La toxicidad de los hidrocarburos de petróleo, tanto alifático como aromático, es variable, pero, en general, aquellos de menor peso molecular son más tóxicos (Arias, 2005)

Los estudios o información disponible acerca del comportamiento de los suelos del Piedemonte Llanero en el departamento del Meta son escasos, este tipo de estudios son de importancia si se tienen en cuenta:

- “El Piedemonte llanero hace parte del 21,9% de suelos con capacidad agropecuaria, destacándose como una de las principales actividades económicas del departamento; los principales cultivos son el arroz, palma africana, plátano, maíz, cacao, cítricos y otros frutales” (IGAC, SUELOS DE PIEDEMONTE LLANERO, 2016).
- Las proyecciones del censo realizado por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística, DANE (2013), en el cual se calcula que actualmente, la población del departamento del Meta, está alrededor de los 992.162 habitantes, distribuidos en 29 municipios, en donde la mayor densidad poblacional se encuentra a lo largo del piedemonte llanero.
- Esta zona pertenece a una de las tres vías importantes para el desarrollo turístico del departamento, denominada la “Ruta Piedemonte Llanero” así destacada en el eje 3 de Sustentabilidad Económica y del Territorio, del Plan de Desarrollo Económico y Social del Departamento del Meta para el periodo 2016-2019 (Gobernación del Meta, 2016).
- “De acuerdo con el listado de Estaciones de servicio automotriz certificadas publicado el 21 de septiembre del 2015 por el Ministerio de Minas y Energía, en el departamento hay 182 estaciones, de las cuales 125 se ubican en las ciudades del piedemonte llanero” (Minas, 2015).

El presente estudio apoya la fase II del macro-proyecto “Comportamiento de las características físicas, químicas y microbiológicas en suelos de vocación agrícola artificialmente contaminados con Gasolina y Diésel en el piedemonte llanero del Municipio de Cumaral (Meta)”. Con el fin de experimentar a diferentes concentraciones de diésel y gasolina la asimilación de hidrocarburo por parte de *Kribbella sp.* realizando fijación de nitrógeno para la recuperación de suelos de Piedemonte Llanero en un periodo de 4 meses.

4. Alcance

El presente proyecto se encuentra en el marco del macro-proyecto “Comportamiento de las características físicas, químicas y microbiológicas en suelos de vocación agrícola artificialmente contaminados con Gasolina y Diésel en el piedemonte llanero del Municipio de Cumaral (Meta)”.

El alcance de este proyecto de investigación fue evaluar el potencial de crecimiento de las bacterias libres fijadoras de nitrógeno en un suelo de área agrícola contaminado mediante un vertimiento artificial con diferentes volúmenes de diésel y gasolina. Para esto, se realizaron recuentos bacterianos una vez al mes en los laboratorios de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio. El tiempo de ejecución total de 8 meses, el trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de microbiología de la Universidad Santo Tomás campus Aguas Claras de Villavicencio (Apéndice A), ésta zona se encuentra en área urbana.

Las muestras en base del proyecto se encuentran ubicados en las coordenadas elipsoidales latitud 4° 6'43.41" N y longitud 73°39'31.31"O sobre el municipio de Cumaral (Meta). De este, se destacan dos regiones con diferentes características geomorfológicas, una montañosa al Occidente y Noroccidente, formada por el sistema montañoso de la Cordillera Oriental y la otra, una planicie inclinada ligeramente hacia el Oriente y el Nororiente (Acuerdo No. 287 de 2015). “El clima del municipio se encuentra bajo la influencia de vientos alisios y desplazamientos de la Zona de Confluencia Intertropical (ZCIT), los cuales determinan un clima de tipo estacional Monomodal, dando como resultado un clima cálido y uno muy húmedo” (IGAC, 2004). El proyecto busca la caracterización de consumo de Hidrocarburos Totales de Petróleo y fijación de nitrógeno atmosférico por *Kribbella sp* nativa del piedemonte llanero, que se llevará a cabo en el laboratorio para continuar con el proceso, seguimiento y análisis de la muestra descrita en el cuerpo del trabajo, al cabo de un tiempo estimado de 4 meses para el desarrollo de las cepas.

5. Antecedentes

En 1989, la Sociedad Americana de Microbiología evaluó la supervivencia y rendimiento de un *Mycobacterium sp* degradante de un hidrocarburo aromático poli cíclico(HAP), demostrando la versatilidad y ampliando la aplicación potencial, debido a la capacidad de degradar los (HAP) de dos, tres, cuatro y cinco anillos en sedimentos, confirmada mediante pireno, ya que sobrevivió durante 6 semanas en microcosmos, con dosis múltiples mineralizadas (Heitkamp MA, 1989)

En 1992, Holanda dejó claro cuáles fueron las experiencias que se obtuvieron de la biorremediación del derrame del Exxon Valdez en Alaska, incentivando a la Biorremediación como tecnología de recuperación en suelos con derrames de petróleo, planteándolo como tecnología de limpieza y que en el caso de este derrame, fue acelerada al aplicarle fertilizantes o bioestimular (BE) en la arena de las playas, haciendo evidente la recuperación. Este logro evidenció la relación entre los compuestos químicos y la microbiota presente en el suelo, empleándolos como fuente de nutrientes para sus procesos bioquímicos (P.H. Pritchard, 1992)

En 2001, la universidad de Barcelona realizó la identificación de los metabolitos que se acumulan durante el crecimiento de *Mycobacterium sp*, sugiriendo que inicia su ataque a pireno por mono-oxigenación o dioxigenación en sus posiciones C-4, C-5 para dar transorcis-4,5-dihidroxi-4,5-dihidropireno, respectivamente. En este proceso las células cultivadas con pireno como única fuente de energía, oxidaron los grupos metilénicos de fluoreno y acenofeno y catalizaron la dihidroxilación y la escisión enqueueda de uno de los anillos de naftaleno y fenantreno para dar ácidos 2-carboxicinámicos y difénicos, respectivamente. (Joaquim Vila, 2001)

En 2011, en Brasil, se comparó las técnicas de bioestímulo (BE) y bioaumentación (BA) o la adición de microorganismos, en el tratamiento ex situ de suelo artificialmente contaminado con 5% de diésel. Diferentes autores realizaron ensayos en microcosmos de bancada simulando biopilas, que fueron periódicamente aireadas por giro mecánico manual. Luego de 126 días, se verificó una degradación de los n-alcenos del 90,9% para la técnica de bioestímulo y el 87,9% para la técnica de bioaumentación. Se demostró que esta técnica de re-inoculación es bastante prometedora para usarse en casos de derrames de hidrocarburos (Lívia Braga & Machado Corrêa, 2011)

En 2012, nuevamente en Brasil, se identificó que el 94,5% de los actinomicetos obtenidos de un suelo contaminado por hidrocarburos pertenecían al género *Streptomyces*; posteriormente estos se seleccionaron, a partir de su capacidad de degradar diésel y biodiesel, con el propósito de producir lipasas necesarias para degradar el contaminante y comparar su potencial de degradación. (Mariana, 2012)

En Portugal (2017) se agregaron enmiendas orgánicas y consorcios microbianos compuestos por *Pseudomonas sp* y actinomicetos, consiguiendo generar estabilidad del nitrógeno del suelo y biorremediar suelos contaminados por hidrocarburos poli aromáticos (Sergio, 2011).

En 2018, en Brasil, se evaluó el potencial microbiano, empleando hongos y levaduras en biopilas para la biorremediación de suelos contaminados con diésel; se encontró reducción en las concentraciones de hidrocarburo total de petróleo del 92% y compuestos de benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos –BTEX- del 10% (Beltran, 2013)

En 2018 La Fundación Universitaria de América en la Facultad de Educación permanente y avanzada de Gestión Ambiental, en Bogotá D.C realiza un estudio avanzado con Ingenieros químicos y ambientales con fines de usar la técnica de biodegradación con selección de una gran variedad de microorganismos (bacterias, algas, hongos, cianobacterias y actinomicetos) que se encargan única y exclusivamente de degradar el hidrocarburo derramado convirtiéndolo en energía alimenticia para el manejo de su metabolismo, lo que finalmente convertirán en dióxido de carbono, es un proceso que toma un periodo de tiempo más prolongado que los métodos convencionales (térmico y fisicoquímicos) pero que en muchas ocasiones han mostrado una gran mejoría en el aspecto de la zona afectada, este teniendo en cuenta que los gastos son mucho más bajos debido a que estas bacterias se obtienen por lo general de la misma zona impactada con el fin de que no modifique los procesos biológicos del ecosistema (Piza, 2018).

En 2019 La Universidad Santo Tomás sede Villavicencio en la Facultad de Ingeniería ambiental realiza un proyecto de investigación tuvo como objetivo, evaluar el potencial de crecimiento de las bacterias libres fijadoras de nitrógeno (BLFN), en un suelo de piedemonte llanero extraído de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía (IEAG) en el municipio de Cumaral (Meta), contaminado artificialmente con diésel. (Mora Alonso & Gonzales Martinez , 2019)

6. Marco de referencias

6.1 Marco Teórico

Los HTP (Hidrocarburos Totales de Petróleo) o TPH (Total Petroleum Hydrocarbons) son una mezcla de productos químicos compuestos principalmente de hidrógeno y carbono, llamados hidrocarburos, la medición de los HTP, indicadora del grado de contaminación de suelos que hayan sido afectados de alguna manera por fugas o derrames de productos derivados del petróleo. La contaminación por hidrocarburos de petróleo ejerce efectos adversos sobre las plantas indirectamente, generando minerales tóxicos en el suelo disponible para ser absorbidos, además, conduce a un deterioro de la estructura del suelo; pérdida del contenido de materia orgánica; y pérdida de nutrientes minerales del suelo, tales como potasio, sodio, sulfato, fosfato, y nitrato” de igual forma, el suelo se expone a la lixiviación y erosión. La presencia de estos contaminantes, ha dado lugar a la pérdida de la fertilidad del suelo, bajo rendimiento de cosechas, y posibles consecuencias perjudiciales para los seres humanos y el ecosistema entero (Arias, 2005)

Es por esto que se plantean alternativas y estrategias de remediación para los suelos, implementando agentes microbianos capaces de interactuar con derivados de petróleo y gasolina presentes (Correa, 2008). Siendo los actinomicetos, presentes de forma abundante en suelo los llamados a realizar éstas acciones de recuperación, este grupo de microorganismos se encuentran incluidos en el dominio bacteria, son sensibles a los antimicrobianos, pero presentan resistencia a los anti fúngicos, algunos producen naturalmente estos productos, además participan en el ciclaje de nutrientes. (Arias, 2015)

Estas bacterias son aerobias y algunas anaerobias pudiéndose encontrar en animales o en el hombre, son heterótrofas, por lo cual pueden utilizar fuentes de carbono simples, complejas y compuestos moleculares orgánicos tales como ácidos, azúcares, polisacáridos, lípidos, proteínas e hidrocarburos alifáticos. “Utilizan como fuentes de nitrógeno amonio, nitratos, aminoácidos, peptonas y un gran número de proteínas”. (Correa, 2008) Éste tipo de bacteria es incluida como hidrocarbonoclasta por sus características anteriormente descritas, cabe destacar que los microorganismos no comen petróleo, sólo degradan los hidrocarburos para los cuales existe una

ruta metabólica, es decir, para los cuales existen las enzimas necesarias para las reacciones de degradación (Instituto de Ingeniería UNAM, 2005)

Existen varios reportes de las bacterias que participan en la degradación del petróleo en el caso del Golfo de México, se ha encontrado una gran diversidad microbiana, como se ha observado en estudios llevados a cabo en zonas de las costas de Florida, Campeche, Veracruz y en el delta del río Mississippi que han sido afectadas por derrames de petróleo. En estos sitios se han detectado alrededor de 24 especies de bacterias distribuidas en 14 géneros. Entre los que se encontraron: Gammaprotobacteria, Marinobacter, Pseudomonas y Acinetobacter, así como algunos géneros de bacterias hidrocarbonoclastas como Alcanivorax, Marinobacter, Thalassolituus, Cycloclasticus y Oleispira (García Cruz & Aguirre Macedo, 2014)

Según la revista peruana de Biología en su artículo, Petroleum hydrocarbon degradation by isolated mangrove bacteria, el uso de los microorganismos en la microbiota de manglares, como agentes degradadores de diversas fuentes de carbono, es poco explotado en procesos de remediación ambiental. Así, que se evaluó in vitro el potencial degradador de bacterias aisladas de sedimento de manglar en la degradación de hidrocarburos. El análisis genético usando el marcador 16S rRNA reveló secuencias íntimamente relacionadas (99%) con Proteobacterium, Pseudomonas y Exiguobacterium. Los resultados mostraron el crecimiento de bacterias en medio salino mineral (MSM) conteniendo petróleo o diésel al 1%, como fuentes de carbono (Lopez & Santos Freire, 2018)

6.1.2 Alternativas de manejo biológico a suelos ácidos con microbiota presente

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (**pgpm**, por la sigla en inglés de plant growthpromoting microorganismo) son heterogéneos en su naturaleza, comprenden bacterias, hongos y actinomicetos que sobreviven en y alrededor de la rizosfera y mejoran el crecimiento de la planta y el rendimiento, ya sea directa o indirectamente. Un **pgpm** eficaz, además de ser competente en la rizosfera, debe ser capaz de hacer frente al estrés biótico y abiótico y de desarrollar múltiples funciones. La promoción directa del crecimiento de las plantas implica la solubilización o movilización de nutrientes importantes (fósforo, potasio, zinc, azufre y hierro) o

la fijación de nitrógeno atmosférico para la absorción de las plantas. También se sabe que estos producen varias fitohormonas que promueven el crecimiento de las plantas, como el ácido indolacético, el ácido giberélico, las citoquininas y el etileno y reducen el efecto deletéreo de los fitopatógenos. (cotes, Mosher, Barrera , Kobayashi, & Elad, 2015)

Además de su capacidad biodegradadora derivada de sus actividades enzimáticas, de tipo quitinasa, β -1, 3-glucanasa y celulasa; pectinasas, proteasas y amilasas estas bacterias han demostrado capacidad para reducir factores de estrés abiótico como la salinidad o la sequía o para biorremediar los suelos y el agua. Los microorganismos son mucho más sensibles al estrés causado por metales pesados que los animales del suelo o que las plantas que crecen en los mismos suelos, por lo tanto, estos metales producen cambios en la función microbiana y, en consecuencia, en la biodiversidad dentro de las poblaciones y en las comunidades microbianas. (Heitkamp MA, 1989)

“Las técnicas de aislamiento de microorganismos han permitido obtener suficiente diversidad biológica, tanto que podría durar, aparentemente, toda la vida si se tiene en cuenta que varios tipos de suelos tienen poblaciones bacterianas del orden de 10^6 a 10^9 células por gramo” (Whitman, Coleman, & Wiebe, 1998). “Las tendencias recientes han mostrado que muchos laboratorios académicos, gubernamentales e industriales se han enfocado en la identificación de diversas actividades microbianas para usos agrícolas”. (cotes, Mosher, Barrera , Kobayashi, & Elad, 2015)

7. Marco conceptual

7.1 Actinomicetos

Los actinomicetos son bacterias responsables del característico olor mohoso rancio del suelo y el composte. Al igual que los hongos, forman hifas. Descomponen una amplia variedad de substratos orgánicos, pero, más importante aún, es que a altos niveles de pH descomponen los compuestos más complejos como la quitina (presente en el exoesqueleto de los artrópodos) y la celulosa. Los hongos degradan estos elementos a bajos niveles de pH. Además, al descomponer la materia orgánica, algunos actinomicetos como los del género *Streptomyces* producen varios antibióticos. (UCM , 2010)

Los actinomicetos desempeñan un papel fundamental en la descomposición de compuestos orgánicos y contaminantes activos en el ambiente. Estas son un grupo de bacterias Gram positivas con un alto porcentaje de guanina y citosina, el cual puede exceder el 70% de nucleótidos. Poseen genomas que tienen más de 3300 genes, en su mayoría son capaces de codificar proteínas durante la compleja morfología y biosíntesis de metabólicos secundarios.

Su diversidad morfológica estaba basada principalmente en las estrategias reproductivas, lo que genera una amplia variedad de estructuras de esporulación, la mayoría de los actinomicetos crecen con una estructura filamentosa y ramificada, que puede presentar crecimiento de micelio sobre el sustrato y micelio aéreo cuando han crecido en medio sólido. (Mariana, 2012)

7.2 Fijación de Nitrógeno

La fijación del nitrógeno se define como la oxidación o reducción del nitrógeno para dar amonio u óxidos. Consiste en la conversión del nitrógeno atmosférico a formas metabolizables, que puedan ser incorporadas por los seres vivos por Actinomicetos (bacterias Gram positivas) que nodulan raíces de muchos árboles y arbustos. (Sergio, 2011)

Son aquellas bacterias filamentosas que viven en simbiosis con plantas actinorricas (angiospermas capaces de formar nódulos) y son pertenecientes al género *Frankia*. No forma micelio aéreo y sus esporas son inmóviles. No dula los géneros *Alnus*, *Myrca*, *Casuarina*, etc. Esta

nodulación es de gran importancia para plantas leñosas perennes, porque aporta nitrógeno al suelo en zonas pobres o repobladas. (Sergio, 2011)

La fijación biológica del nitrógeno se realiza en los nódulos radiculares, los nódulos son el resultado de una perfecta relación de simbiosis entre la planta y las bacterias. Cuando ambos entran en contacto se produce un cambio de diferenciación en la bacteria, ésta se modifica dando lugar a un bacteroide; el bacteroide con posterioridad expresa su actividad nitrogenasa y gracias al complejo enzima nitrogenasa va a ser capaz de fijar el nitrógeno. Un proceso en principio invasivo por parte de la bacteria, se transforma en un proceso beneficioso para ambos simbioses. (Sergio, 2011)

7.3 Consumo de hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono

Estos microorganismos tienen tolerancia a los hidrocarburos o que sean capaces de utilizarlos como fuente de carbono, así han sido identificados en diferentes tipos de suelos contaminados. Los actinomicetos son los microorganismos designados para realizar la biorremediación, ya que cuentan con la presencia de genes específicos que codifican enzimas para la degradación de hidrocarburos, además estos pueden adaptarse a los ambientes más extremos. (Mariana, 2012)

Los factores importantes que determinan a las poblaciones microbianas durante la degradación del petróleo son los factores abióticos de la zona (pH, temperatura, salinidad, oxido-redox, etc.), así como las propiedades físico-químicas del petróleo (ligero o pesado). La combinación de ambos factores pueden favorecer o afectar la diversidad bacteriana (garcia & Macedo Aguirre , 2014)

En suelos contaminados con hidrocarburo, se ha demostrado que este tipo de microorganismo tienen la capacidad de degradar hasta 90% de estos hidrocarburos en un periodo de cuatro meses.

6.3 Marco Legal

En la Tabla 1 se pueden apreciar algunos apartados asociados a la conservación y uso del suelo que son tenidos en cuenta en lo que respecta a todas las actividades en las que se vea involucrado el recurso.

Tabla 1. *Normatividad vigente relacionada al estudio.*

	Normativa	Descripción
Normas Internacionales	Declaración de Río de Janeiro sobre el medio ambiente y el desarrollo de 1992	Regida a nivel mundial dónde se formularon 27 principios básicos sobre el desarrollo sostenible, la dignidad humana, el medio ambiente y las obligaciones de los Estados en materia de preservación de la conservación de un medio ambiente digno para la vida de los seres humanos
	Protocolo de Lousiana 29B	Presenta los límites permisibles para parámetros fisicoquímicos referentes a la calidad del suelo.
	Carta Europea de Suelos de 1972	El suelo es considerado por primera vez activo limitado, fácilmente destruible por la erosión, contaminación y demás actividades que causen daño.
	Convenio sobre diversidad Biológica en 1992	La preocupación de que la diversidad biológica se reduce significativamente por la actividad humana, incluida la gestión del suelo y de la tierra.
	Convención Marco sobre Cambio Climático(CCC)	Reconoce que los problemas de degradación del suelo y los cambios en el uso del mismo pueden agravar la emisión de gases a la atmósfera.
	Convención de las Naciones Unidas 1994	Lucha contra la desertificación y fija como objetivo evitar y reducir la degradación del suelo, rehabilitar terrenos parcialmente degradados y recuperar tierras desertificadas.
	Comisión de las comunidades Europeas en el 2001	Advirtió que la erosión y el declive de la fertilidad del suelo representan una amenaza de primer orden para el desarrollo sostenible.
Normas Nacion	Constitución Política Nacional de 1991	Cuenta con 17 artículos específicos relacionados con la protección, conservación, control y mejoramiento de los recursos naturales: 8, 63, 79, 80, 332, 334, etc.

Tabla 1. (Continuación)

	Ley 23 de 1973	Prevención y control de la contaminación del medio ambiente, mejoramiento, conservación y restauración de los recursos naturales renovables. Art. 3. Se consideran bienes contaminables el aire, el agua y el suelo. Art. 17. Sanción por contaminación Art. 13. Exceder los niveles máximos permisibles de contaminación causa intervención del estado. Art. 14. Destinación de recursos a recuperar el ambiente.
	Ley 9 de 1979 Código Sanitario Nacional	Entre sus disposiciones se prohíbe descargar, sin autorización, los residuos, basuras, desperdicios y en general, de desechos que deterioren los suelos o causen daño o molestia individuos o núcleos humanos. Art. 130 sustancias peligrosas.
	Ley 99 de 1993 Se crea el Ministerio de medio ambiente y el Sistema nacional ambiental (SINA).	Artículo 5. Zonificación de uso adecuado del territorio y sobre el uso del suelo Artículo 31. Funciones de las CAR, evaluación, control y seguimiento ambiental de los usos del suelo.
	Ley 491 de 1999	Se crearon los seguros ecológicos para permitir cubrir los perjuicios económicos cuantificables a determinadas personas como parte o consecuencia de daños ambientales y los recursos naturales, también se hace una reforma en lo relativo a los delitos ambientales.
	Decreto 2811 de 1974	Artículo 39: Las instalaciones que deban construirse, en las explotaciones de hidrocarburos y gases naturales, y las precauciones para que los derrames de petróleo y escapes gaseosos no dañen los contornos terrestres o acuáticos. Artículo 180: Las personas que realizan actividades agrícolas, pecuarias, forestales o de infraestructura, que afecten o puedan afectar los suelos, están Obligados a llevar a cabo prácticas de conservación y recuperación de los suelos. Artículo 182: Estarán sujetos a adecuación y restauración de los suelos que se encuentren sujetos a limitaciones fisicoquímicas o biológicas que afecten la productividad del suelo
	Decreto 050 de 2018	Artículo 2.2.3.3.4.14. Todos los usuarios que exploren, explote, manufacturen, refinan, transporten, procesen o que almacenen hidrocarburos o sustancias que sean nocivas para la salud, deberán tener un plan de contingencia para el manejo de derrames.
	Decreto 2655 de 1988	Código de Minas
	Resolución N. 0007/2018	Para la solicitud de acceso a recursos genéticos y producto derivado para bacterias productoras de solventes provenientes de fuentes colombianas,

Tabla 1. (Continuación)

		taxonomía, biología molecular, implicaciones taxonómicas y condiciones de producción de solventes.
Resolución 2017 /2017	N.	Por el cual se acepta una solicitud de acceso a recursos genéticos y producto derivado para desarrollo de biopesticidas y biofertilizantes con base en bacterias aisladas de <i>Musa sp.</i>
Resolución 0858/2018	N.	Por el cual se acepta una solicitud de acceso a recursos genéticos y producto derivado para el proyecto estudio taxonómico del cepario de bacterias acumuladoras de polihidroxialcanoatos del Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
Resolución 1427/ 2017	N.	Por el cual se acepta una solicitud de acceso a recursos genéticos y producto derivado para el proyecto Implementación de estrategias basadas en la conformación y evaluación de un banco de extractos de origen bacteriano como alternativa ecológica para el manejo de plagas de importancia agrícola
NTC 4709/1999		Extracción de muestras de residuos sólidos para análisis químico mediante extracción SOXHLET

Nota: Normatividad Legal vigente Internacionales y Nacionales para el recurso suelo, su interacción con hidrocarburos y relacionados. Por: Villalobos J, Niño G, 2020.

8. Metodología

Para la ejecución de la investigación, cabe destacar que se contaba con una cepa de bacteria *Kribbella sp.* ya aislada con la cual se realizaron 15 medios de cultivo de rennie modificado, posteriormente se realizaron pruebas bioquímicas mencionadas más adelante con las cepas seleccionadas para el estudio, que durante un periodo de 4 meses fueron experimentadas a distintas concentraciones de diésel y gasolina para ver el crecimiento y comportamiento frente a los derivados del hidrocarburo, para luego ser analizadas.

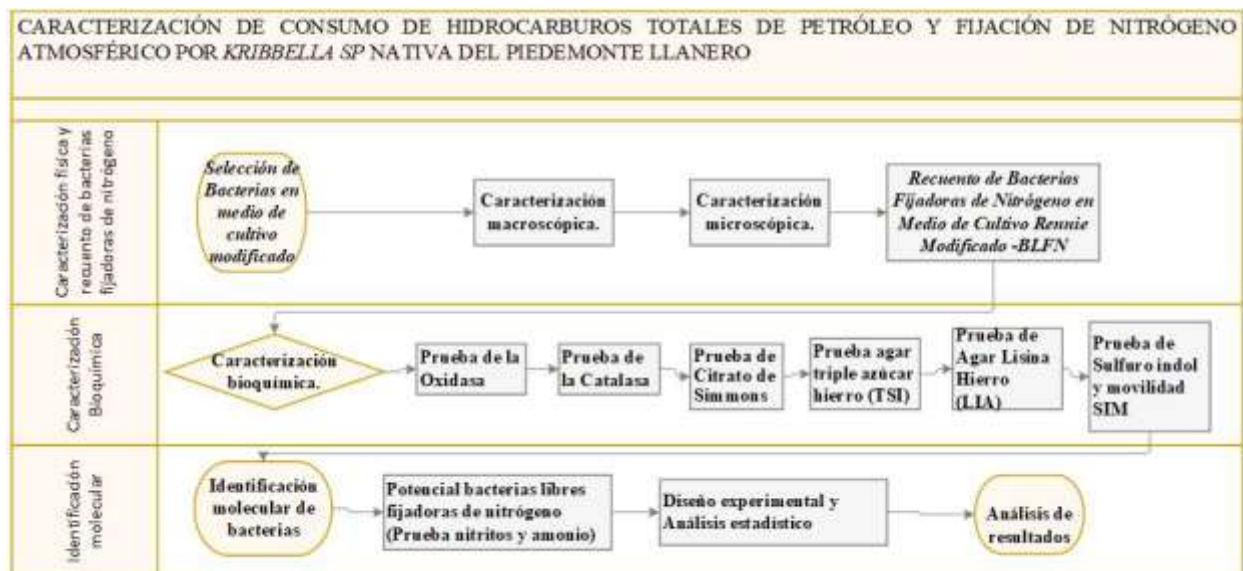


Figura 1. Diagrama metodológico del estudio experimental de la caracterización de consumo de Hidrocarburos totales de Petróleo por *Kribbella sp.* Por: Villalobos J, Niño G, 2020.

8.1 Selección de Bacterias en medio de cultivo modificado

Para el desarrollo del estudio experimental se realizaron la siembra de 15 cepas en medio de cultivo rennie modificado, ya que habría la posibilidad de que algunas de ellas no crecieran con las características que buscábamos para el estudio, por tal motivo después de su crecimiento de esas 15 se escogieron las cepas D_04, D_05, D_09, D_11 y D_15 las cuales fueron seleccionadas para las caracterizaciones y pruebas a lo largo del estudio.

8.1.1 Caracterización macroscópica.

Se describen las características macroscópicas de las colonias aisladas en el medio de cultivo Rennie modificado, mediante el estereoscopio Leica EZ4 tales como: Color, forma, textura y adherencia al medio.

8.1.2 Caracterización microscópica.

Se utilizó el método de Tinción de Gram para identificar por medio del microscopio Leica Dm750 la morfología de cada una de las colonias, también permitió determinar la pureza de la cepa.

8.2 Recuento de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno en Medio de Cultivo Rennie Modificado –BLFN

El recuento de las bacterias BLFN se llevó a cabo utilizando la técnica de recuento en placa en superficie, informando en UFC g⁻¹ de suelo, utilizando el medio de cultivo sólido libre de nitrógeno, Rennie modificado. Se evaluó las poblaciones de bacterias BLFN con diferentes concentraciones de diésel y gasolina o tratamientos (Tratamiento 1-testigo: 0 mg kg⁻¹, Tratamiento 2: 2500 mg kg⁻¹, Tratamiento 3: 6100 mg kg⁻¹ y Tratamiento 4: 9800 mg kg⁻¹) durante un periodo de cuatro (4) meses.

8.3 Caracterización bioquímica.

Según MacFaddin, (2000) menciona en el libro *Biochemical Test for identificación of medical bacteria*, que los ensayos bioquímicos son pruebas empleadas para identificar de forma clara y precisa, la presencia o ausencia de una enzima, de grupos enzimáticos o vías metabólicas en los microorganismos. A partir de la aplicación de estas pruebas, se logra la identificación o determinación taxonómica de géneros o especies de un microorganismo.

Para este caso específico las pruebas bioquímicas fueron empleadas en la caracterización de cada una de las cepas aisladas.

8.3.1 Prueba de la Oxidasa:

Esta prueba determina si hay presencia de enzimas oxidadas. Se impregnó una tira de papel filtro con una masa de colonias bacterianas y añadió reactivo de Kovacs (este se oxida por la citocromo-oxidasa). “Si la zona impregnada se torna color azul-violeta es oxidasa positiva, si hay ausencia de color es oxidasa negativa” (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014)

8.3.2 Prueba de la Catalasa.

Los microorganismos poseen mecanismos de defensa enzimáticos para protegerse de especies tóxicas del oxígeno como el peróxido de hidrógeno. Las enzimas son la peroxidasa, catalasa y su peróxido dimutasa, que degradan el peróxido de hidrógeno para obtener agua y oxígeno. La prueba catalasa determina la presencia de esta enzima, se colocó una gota de peróxido de hidrógeno en una lámina limpia, se tomó una colonia aislada y se puso en la gota, confirmando la presencia

8.3.3 Prueba de Citrato de Simmons.

Determina si el microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, provocando su alcalinidad, se toma una colonia aislada en el medio y se inocula en estría sobre la superficie en pico de flauta, se incuba durante 48 horas, si el medio se torna color azul es positivo y si se mantiene de color verde es negativo (VILLANUEVA, 2016)

8.3.4 Prueba agar triple azúcar hierro (TSI).

Aunque es un medio para enterobacterias, es una prueba que se usa comúnmente para la fermentación de la glucosa, lactosa, sacarosa y la producción de H₂S. La siembra se realizó en un medio sólido en pico de flauta haciendo una inoculación por picadura y estría, se incubó durante 24 horas, si el medio es totalmente rojo no hay fermentación de glucosa, pico rojo/fondo amarillo el microorganismo solo fermenta glucosa, pico amarillo/fondo amarillo el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa, la presencia de burbujas indica que el microorganismo produce gas y por último el ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce H₂S. (garcía s. c., 2011)

8.3.5 Prueba de Agar Lisina Hierro (LIA).

Determina la capacidad enzimática de un organismo para la descarboxilación de un aminoácido (lisina y arginina) para formar una amina. La siembra se realizó en medio sólido en pico de flauta haciendo una inoculación por picadura y estría, se incubó 24 horas, si el pico del medio es violeta y el fondo también hay descarboxilación de la lisina, si el pico es rojizo y el fondo amarillo hay desaminación de la lisina y por último si hay ennegrecimiento del medio hay producción de H₂S (garcía s. c., 2011)

8.3.6 Prueba de Sulfuro indol y movilidad SIM.

Permite determinar si un organismo tiene movilidad, libera ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre y posee la capacidad de desdoblar el indol de la molécula triptófano. Mediante la inoculación por punción recta central, la movilidad es positiva si se observa turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra, H₂S positivo si hay ennegrecimiento del medio y por último se añade 3 gotas de reactivo de ovacs si el medio se torna rojo en la superficie es indol positivo (Elianeth Romero, 2003)

8.3.7 Prueba de Tioglicolato.

Esta prueba favorece el crecimiento de gran variedad de microorganismos, incluidos los nutricionalmente exigentes. El escaso contenido de agar le permite ser un medio semi-sólido y que retarda la dispersión de CO₂ y O₂, por lo que se desarrollan microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y estrictos. Se toma el inóculo se suspende en solución salina estéril al 0,85%, posteriormente se transfieren 2 gotas al medio de cultivo y se incuba durante 24 horas. Los microorganismos aerobios crecen en la superficie del medio, los anaerobios facultativos crecen en todo el medio y por último los anaerobios estrictos crecen en las profundidades del medio de cultivo (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014).

8.4 Identificación molecular de bacterias

Las identificaciones moleculares de bacterias fueron procesadas en los laboratorios de la Corporación CorpoGen en Bogotá, solicitándoles el servicio de identificación molecular de

bacterias y hongos, enviada en medio de cultivo en caja Petri , aplicando el protocolo de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa –PCR-, de la región genética que codifica para la subunidad 16s del RNA ribosomal de procariotas, que permitió la determinación de la secuencia consenso (Orden calculado más frecuente, ya sea de nucleótidos o aminoácidos, encontrado en cada posición en una alineación de secuencia)

8.4.1 *Potencial bacterias libres fijadoras de nitrógeno (Prueba nitritos y amonio)*

Las pruebas de producción de nitritos y amonio fueron procesadas en los laboratorios de TECNO Ambiental S.A.S. en el municipio de Villavicencio empleando las siguientes metodologías: Amoniaco (SM 4500-NH₃ B C) y Nitritos (SM 4500 NO-2 B).

Se sembraron las cepas puras en frascos de vidrio con capacidad de 500ml, los cuales contenían 150 ml de medio de cultivo Rennie Modificado (en estado líquido) y 2 ml Diésel, así mismo con 2ml de gasolina como fuentes de carbono, se tuvo en cuenta el 0.5 de McFarland y se llevó a incubación durante 8 días, seguidamente la muestra se diluyó con agua destilada hasta llegar a 1500 ml de muestra.

8.4.2 *Diseño experimental y Análisis estadístico*

El diseño experimental de la investigación se compone de tres muestreos a cada tratamiento de las pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa, Simmons, TSI, LIA, SIM y Tioglicolato) mencionados anteriormente, durante el experimento para evaluar la densidad microbiana a 1, 2, 3 y 4 meses después de la contaminación en diésel y gasolina.

Se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para el potencial de fijación de nitrógeno y la densidad microbiana con los datos obtenidos de los 4 meses, se usó el programa anova para la variación en los tratamientos, se manejaron curvas de crecimiento de la cepa *Kribbella* variando por la cantidad de diésel y gasolina durante meses, por último, los datos fueron procesados mediante la herramienta Microsoft office Excel.

9. Resultados y análisis de resultados

9.1 Caracterización fenotípica de las cepas (*Kribbella*)

A partir de los recuentos en placa en el medio de cultivo Rennie modificado (medio de cultivo libre de Nitrógeno que permite el aislamiento de microorganismos con capacidad de fijar nitrógeno de la atmósfera) para los tratamientos evaluados, se aislaron un total de 15 cepas, de las cuales se seleccionaron 5. Estos aislamientos fueron realizados utilizando el método de siembra por agotamiento hasta obtener cepas puras, a las que luego se les realizó una caracterización macroscópica (descripción de la colonia) y microscópica (tinción de Gram) como se observa en la Tabla 2.

En la Tabla 2 se ilustra la caracterización macroscópica (descripción de la colonia) y microscópica (tinción de Gram) de 15 cepas de *Kribbella sp* aislados en cultivo.

Tabla 2. Descripción macroscópica y microscópica de las cepas *Kribbella sp*, en cultivo Rennie modificado (se indica las cepas seleccionadas).

Nº	Código de cepa	Macroscópica	Microscópica	Selección
1	D_01	Color opaco, forma redonda, colonia seca	Cocos Gram +	NO
2	D_02	Color transparente, forma puntilliforme, colonia cremosa	Cocos Gram +	NO
3	D_03	Colonia cremosa, color blanco, forma irregular.	levadura	NO
4	D_04	Colonia seca, color blanco y centro amarillo claro, forma redonda y con filamentos, olor a tierra húmeda.	Bacilos Gram +	SI
5	D_05	Colonia cremosa, color transparente, forma redondeada.	Bacilos Gram +	SI
6	D_06	Colonia cremosa, color rojo opaco, forma redondeada.	Cocos Gram +	NO

Tabla 2. (Continuación)

7	D_07	Colonia cremosa, color azulado con transparencia, forma redonda, tamaño puntilliforme	Cocos Gram +	NO
8	D_08	Colonia seca, adherida al agar, color blanco, forma irregular y con filamentos, olor a tierra húmeda.	Cocos Gram +	NO
9	D_09	Colonia seca, adherida al agar, color blanco, forma irregular y con filamentos, olor a tierra húmeda.	Bacilos Gram +	SI
10	D_10	Colonia cremosa, color transparente, forma redondeada.	levadura	NO
11	D_11	Colonia cremosa, color blanco, forma redonda, adherida al agar.	Bacilos Gram +	SI
12	D_12	Colonia seca, adherida al medio, color blanco, forma irregular y centro elevado	levadura	NO
13	D_13	Colonia cremosa, color blanco, forma irregular.	Cocos Gram +	NO
14	D_14	Colonia seca, color blanco y centro amarillo claro, forma redonda y con filamentos, olor a tierra húmeda.	levadura	NO
15	D_15	Colonia cremosa, color transparente, forma redondeada.	Bacilos Gram +	SI

Nota: Se presentan una serie de descripciones características de las cepas, que fueron observadas por resultado del estereoscopio Leica z4. Por: Villalobos J, Niño G, 2020.

9.2 Recuento de Bacterias Fijadoras de Nitrógeno en Medio de Cultivo Rennie Modificado –BLFN

Como se mencionó en el apartado metodológico, el recuento de las BLFN se llevó a cabo utilizando la técnica de recuento en placa en superficie, informando en UFC g-1 de suelo, utilizando el medio de cultivo sólido libre de nitrógeno, Rennie modificado. Se evaluó las

poblaciones de BLFN en un suelo proveniente del piedemonte del municipio de Cumaral-Meta contaminado con diferentes concentraciones de diésel (0, 2500, 6100 y 9800 mg kg⁻¹) durante un periodo de (4) tres meses.

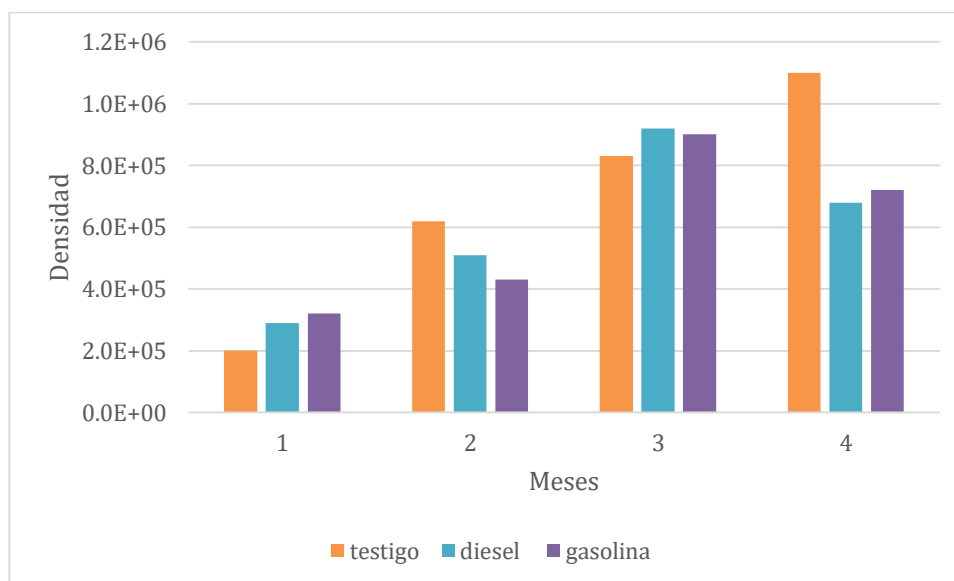


Figura 2. Comparación de la densidad microbiana en UFC g-1 entre la muestra testigo y concentración de 2500 mg kg-1 de diésel y gasolina durante un periodo de 4 meses.

Por: Villalobos J, Niño G, 2020.

En la Figura 2 se puede evidenciar que el crecimiento de las BFLN fue muy variado a lo largo de los 4 meses, ya que en el mes 1 la densidad microbiana estuvo exponencial por la gasolina con respecto al diesel y la muestra testigo, en el 2 y 3 mes la densidad en concentración del diesel sobrepasó a la de gasolina, y en el último mes las BFLN estuvieron en crecimiento en presencia de gasolina sobrepasando en diesel, esto se debe a las diferentes capacidades que tienen los microorganismos de adaptación en el ambiente y su manera de consumo de HTP como comportamiento de su fuente de carbono, aunque en el análisis de varianza no mostró diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre la concentración 2500 mg kg⁻¹ y la muestra testigo (Figura2)

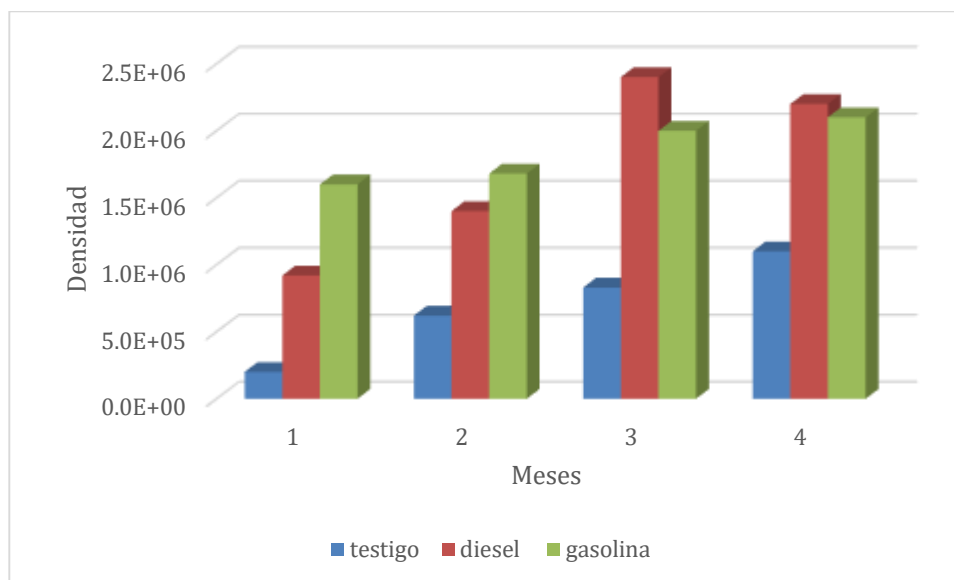


Figura 3. Comparación de la densidad microbiana en UFC gr-1 entre la muestra testigo y la concentración de 6100 mg kg-1 de diésel y gasolina durante un periodo de 4 meses.

Por: Villalobos J, Niño G, 2020.

El comportamiento en la densidad poblacional de las BLFN durante el tratamiento con 6100 mg kg-1 de diésel y gasolina con respecto al testigo fue directamente proporcional, esto quiere decir que en el periodo de los 4 meses la presencia de hidrocarburo no afecta drásticamente el crecimiento y la función fijadora de nitrógeno de las BLFN y puede variar. Aunque se debe destacar que la densidad microbiana en presencia de la gasolina se mantuvo en un rango de crecimiento de 0.5 E+06 como se muestra en la figura durante los 4 meses.

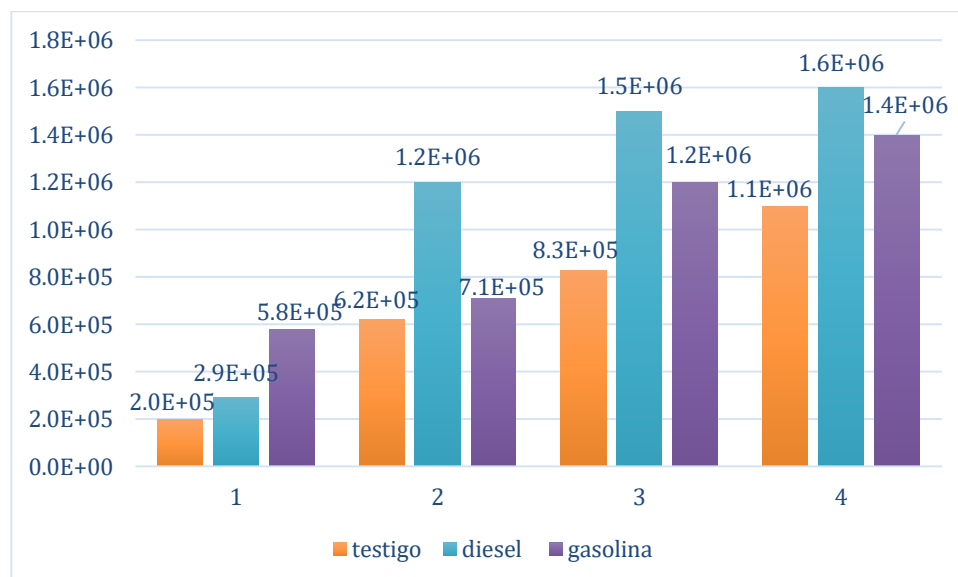


Figura 4. Comparativa densidad microbiana en UFC gr-1 entre muestra testigo y concentración de 9800 mg kg-1 de diésel y gasolina. Por: Villalobos J, Niño G, 2020.

Por último, la Figura 4. muestra el comparativo efectuado para la concentración 9800 mg kg-1 donde se observa un aumento en densidad microbiana significativo para los últimos 3 meses en presencia de diésel con un rango de 0.4 E+05 de crecimiento de diferencia entre los últimos 3 meses, en comparación con la concentración de gasolina donde su densidad fluctuó con una densidad de diferencia de 6.4 E + 05 a lo largo de los 4 meses. Sin embargo, según el análisis de varianza efectuado la diferencia entre estas no es significativa, la concentración de 9800 tiene un valor de 1,7213E+11 (Tukey, $P \leq 0.05$).

9.3 Caracterización bioquímica

De los 15 aislamientos, se seleccionaron 5 cepas (D_04, D_05, D_09, D_11, D_15) por demostrar mejor capacidad de crecimiento y formación en medio Rennie modificado. A estas cepas, se les realizó la caracterización bioquímica cuyos resultados se ilustran en la Tabla 3.

Tabla 3. Caracterización bioquímica de 5 cepas seleccionadas de *Kribbella sp*

	P.B	Oxidasa	Catalasa	simmons	Tsi	Lia	indol	sulfuro	movilidad	tioglicolato
Cepas	D_04	+	+	+	C/C	N/N	-	+	-	ANAF
	D_05	-	+	-	C/C	N/N	-	+	-	AE
	D_09	+	+	+	C/C	N/N	-	-	-	ANAF
	D_11	-	+	-	C/C	N/N	-	+	-	AE
	D_15	-	+	-	C/C	N/N	-	+	-	AE

Nota: Se describe las siguientes siglas y resultados generados por las pruebas bioquímicas describiéndose como: (Positivo: +, Negativo -, C/C Consumo de glucosa, lactosa, sacarosa, N/N no desanimación de Lisina, AE aerobio, ANAF anaerobio facultativo. Por: Villalobos J, Niño G 2020.

Las cepas D_04 y D_09 son un bacilo Gram positivo anaerobio inmóvil, con catalasa y oxidasa positiva, capaz de usar el diésel y gasolina como fuente de carbono, con energía de citrato, consumo de glucosa, lactosa y sacarosa; la cepa D_04 si produce sulfuro de hidrógeno, la cepa D_09 no, pero las dos no generan desanimación de lisina y no producen indol. Las cepas D_05, D_11 y D_15 son bacilos Gram positivos aerobios inmóviles con oxidasa negativa, pero catalasa positiva; no usan citrato como fuente de carbono, fermentan glucosa, sacarosa y lactosa, presentan positivo en ácido sulfhídrico y producción negativa de indol y lisina decarboxilasa.

9.4 Potencial de bacterias libres fijadoras de nitrógeno (Prueba nitritos y amonio)

Las pruebas de producción de nitritos y amonio dieron como resultado para todos los ensayos fuera de los límites de detección (Tabla 4), esto debido posiblemente a la dilución practicada en la muestra para el análisis de laboratorio, ya que inicialmente esta contenía 150 ml y el requerimiento mínimo era de 1500 ml, así que significó diluir 9 veces la concentración inicial para poder cumplir con el requerimiento del laboratorio.

Tabla 4. Resultados de los análisis de producción de nitritos y amoniaco reportados por el laboratorio TECNO Ambiental s.a.s para las BLFN con potencial hidrocarbonoclasta

Cepa	Código cepa	Amoniaco	Nitritos
04	D_04	<1,1	<0,07
05	D_05	<1,1	<0,07
11	D_11	<1,1	<0,07
15	D_15	<1,1	<0,07

Nota: Los resultados indicados como < (menor que) corresponden a los límites de detección de los métodos de ensayo Por: Villalobos J, Niño G, 2020.

Según los estudios de determinación de nitratos y amonio en muestras de suelo mediante el uso de electrodos selectivos de la Universidad Nacional de Colombia en la facultad de ciencias, para un suelo como se presenta en este estudio con un pH de 5,2 los límites de detección deben estar en un rango de Nitratos (N-NO_3^-) de 5 – 77 mg l^{-1} y de amonio ($\text{N-NH}_4^{+(1)}$) de 5- 19 mg l^{-1} esto quiere decir que nuestros valores estuvieron por debajo de los límites de detección.

Se realizó un comparativo entre el nitrógeno total del suelo, con respecto a la densidad microbiana obtenida en los diferentes tratamientos durante el mes 1 de diésel y gasolina, teniendo en cuenta el coeficiente de correlación de Pearson.

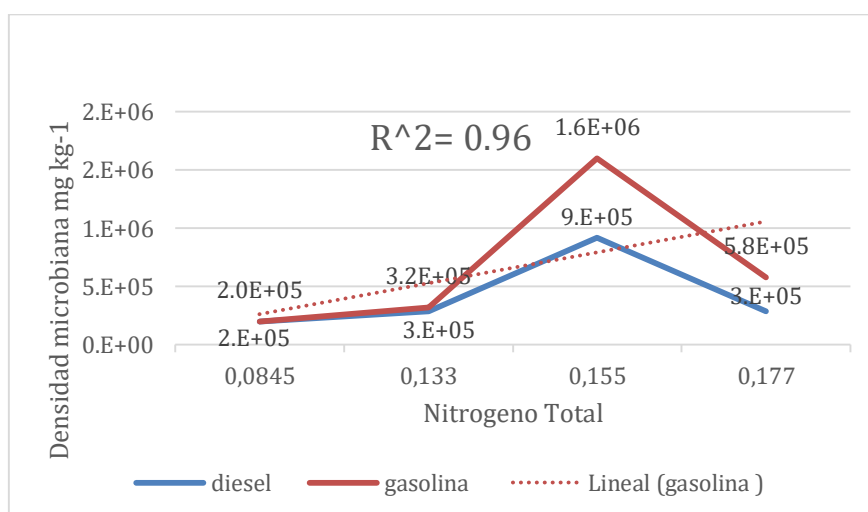


Figura 5. Efecto de la densidad de BLFN sobre el nitrógeno total en los diferentes tratamientos durante el mes 1 en diésel y gasolina. Por: Villalobos J, Niño G, 2020.

En la figura 5, se observa que las rectas de diésel y gasolina se presentan de manera ascendente en casi la totalidad de su recorrido, por lo que según la naturaleza de los datos es apta la aplicación de este coeficiente lineal. El grosor de la dispersión de los datos es estrecho lo que implica una mayor correlación entre el nitrógeno total y densidad microbiana del diésel y gasolina, por lo tanto, menor es el margen de variación en Y para los valores en X, presentándose una correlación directa alta y diferencias no significativas según el valor entre grupos de ANOVA 0.700 ($P \leq 0.05$) entre el nitrógeno total del suelo y la población de BLFN.

Las variables aumentan una dependiendo directamente de la otra; la muestra testigo presenta la menor densidad microbiana ($2,9 \times 10^{-5}$ UFC g⁻¹) y el menor contenido de Nitrógeno (0,0845%), mientras que el mayor aumento de nitrógeno (0,177%) se evidenció en el tratamiento 2 que corresponde a la concentración de 6100 mg kg⁻¹ de diésel y gasolina, donde la densidad microbiana fue de $5,8 \times 10^5$ UFC g⁻¹, interpretándose así, que la densidad microbiana es responsable del 65% de la variabilidad del Nitrógeno total en el suelo de los diferentes tratamientos.

La densidad microbiana y el Nitrógeno total tienen una correlación positiva, dado que, a mayor población de bacterias fijadoras de nitrógeno, mayor es el contenido de Nitrógeno total, de manera que, al disminuir el contenido de Nitrógeno total también disminuye la densidad de bacterias fijadoras de nitrógeno.

10. Discusión de Resultados

El potencial de crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno en un suelo del piedemonte llanero, contaminado con diésel a concentraciones de 2500 mg kg⁻¹, 6100 mg kg⁻¹ y 9800 mg kg⁻¹, posee una variación exponencial positiva, estimulando un aumento en la densidad microbiana para las muestras que recibieron el tratamiento con respecto al control, llegando a presentarse un incremento de hasta 8.26 veces, siendo este el mayor registro durante el periodo de muestreo. Lo que coincide con lo reportado por Vázquez-Luna et al. (2011), que evaluaron el impacto del petróleo crudo en suelo sobre este tipo de bacterias y reportaron incrementos entre 2 a 3,5 veces respecto al testigo, con concentraciones de hasta 40000 mg kg⁻¹. Asimismo, la mayor densidad poblacional se presentó a una concentración de 6100 mg kg⁻¹ de diésel y gasolina durante los 4 meses, mientras que la población con menor concentración se presentó en la muestra de concentración con 2500mg kg⁻¹ de diésel y gasolina en el transcurrir de los meses, evidenciado en la figura 2.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en suelos contaminados con hidrocarburos, proveen considerables cantidades de Nitrógeno a suelos que carecen de este nutriente, aumentando las poblaciones de microorganismos biodegradadores (Arias, 2005), asimismo, las bacterias fijadoras de nitrógeno hidrocarbonoclastas, tienen una alta tasa de crecimiento en suelos contaminados con hidrocarburo haciendo grandes aportes de Nitrógeno a las plantas (Bronwyn , Le Rouse, & Meyers, 2006)

Entre tanto, Castro et al. (2013) afirma en su investigación que un balance entre carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P) en el suelo favorece el aprovechamiento de hidrocarburos por diferentes poblaciones microbianas, entre ellas las BLFN, los resultados obtenidos muestran que el suelo con concentración de 6100mg kg⁻¹ en los dos primeros meses la gasolina tuvo una presencia del 42 % aproximadamente mayor que la del diésel, y en los dos últimos meses diésel aumento su población en un 26 % mayor a la gasolina

El comportamiento en la variación de disminución e incremento de poblaciones microbianas en la figura 2, 3 y 4 está asociado a lo expresado por investigadores como Frois-Duarte et al., (2001) que indican que las poblaciones microbianas responden ante la contaminación con

hidrocarburos, cambiando su estructura a una que le permita a los organismos sobrevivir bajo estas nuevas condiciones del suelo a expensas de otros microorganismos (Camila Lizarazo, 2014)

En la región de piedemonte llanero no se encuentran estudios similares, aunque Vanegas (2012) reportó poblaciones promedio de $1,2 \times 10^7$ UFC g⁻¹ de bacterias fijadoras de nitrógeno en diferentes zonas del departamento del Meta dedicadas a los cultivos de arroz seco y de $2,2 \times 10^7$ UFC g⁻¹ para cultivos de arroz inundados, que son significativamente superiores a los obtenidos en la muestra sin contaminante de este estudio, donde la población máxima fluctuó en $11,1 \times 10^6$ UFCg⁻¹. Se infiere que la diferencia en los recuentos bacterianos es debido a que los cultivos requieren de ciertas cantidades de nutrientes y como menciona Castro et al. (2013) “la adición de fertilizantes químicos aumenta la densidad poblacional de microorganismos presentes en el suelo”. (Correa, 2008)

Al respecto Bossert y Bartha (1984) mencionan que, las bacterias fijadoras de nitrógeno presentes en suelos contaminados con hidrocarburos, proveen considerables cantidades de Nitrógeno a suelos que carecen de este nutriente, aumentando las poblaciones de microorganismos biodegradadores (Hernández et al., 2003), asimismo, Mergesin et al. (2000) afirma que las bacterias fijadoras de nitrógeno hidrocarbonoclastas, tienen una alta tasa de crecimiento en suelos contaminados con hidrocarburo haciendo grandes aportes de Nitrógeno a las plantas (Hernández et al., 2006).

11. Conclusiones

Cabe destacar que la bacteria *Kribbella sp.* se encontraba previamente aislada, así mismo algunas de las características químicas y físicas del suelo donde se obtuvo la muestra, se evidencia que las cepas D_04, D_05, D_09, D_11 y D_15 presentan el potencial fijación de nitrógeno al desarrollar crecimiento de la masa bacteriana en el medio selectivo Rennie modificado libre de nitrógeno, lo que indica que poseen actividades metabólicas que permiten hacer uso del nitrógeno atmosférico para suplir esta necesidad. Se genera una correlación directa entre la densidad microbiana y el nitrógeno total en las diferentes concentraciones de diésel y gasolina, mostrándose con mayor efectividad en la concentración de 6100 mg kg⁻¹ Figura 3, para los dos compuestos, permitiendo ser usados como tratamientos del suelo agrícola de piedemonte llanero en presencia de hidrocarburos.

Las cepas aisladas fueron capaces de crecer sobre los compuestos de diésel y gasolina como fuente de carbono y energía, siendo *Kribbella sp.* quien mostró el crecimiento sobre los compuestos logrando llevar a cabo su biodegradación evidenciado en la figura 2, 3 y 4 creciendo exponencialmente a lo largo del tiempo en un periodo corto de 4 meses.

12. Recomendaciones

Se recomienda mantener extremo cuidado con las propiedades físicas y químicas del suelo (humedad, temperatura, pH), para la supervivencia de las bacterias cultivadas y una correcta degradación de los hidrocarburos. El crecimiento exponencial de diferentes microorganismos como las cepas aisladas de actinomicetos se da ante las nuevas condiciones generadas por los tratamientos, pues a mayor concentración de diésel, mayor fue el porcentaje de materia orgánica presente en el suelo, factor que figura como importante para la estimulación del crecimiento, al ser un aspecto que controla la densidad de este tipo de microorganismos (Arias, Contamination of soil and water by hydrocarbons in Colombia. Analysis of phytoremediation as a biotechnology strategy for recovery, 2005). “La materia orgánica de un suelo contaminado se compone de la materia biogénica y petrogénica, esta última aportada por el diésel y la gasolina, ante la presencia de hidrocarburos aromáticos” (Camila Lizarazo, 2014)

Los actinomicetos poseen la capacidad de desarrollarse bajo ambientes contaminados por este tipo de hidrocarburos, pues degradan alcanos, (hidrocarburos alifáticos) y naftaleno (hidrocarburos aromáticos), presentes en un 64% y 25% del diésel. A través de la presencia de genes catabólicos como el catecol 1,2dioxigenasa implicada en la ruptura del anillo aromático y por tanto en la biodegradación de compuestos tóxicos como el naftaleno, detectado en géneros de este grupo del reporte de la capacidad de fijar nitrógeno, ya que cuentan con un complejo enzimático de nitrogenasa alternativo (Correa, 2008).

13. Referencias Bibliográficas

- Cruz Casallas, P. E., Arias Castellanos, J. A., Eslava Mocha, P. R., & Vasquez Torres, W. (2002). *Cultivo de la cachama y del yamú en los llanos orientales de Colombia*. Villavicencio Retrieved from. <http://repositorio.colciencias.gov.co/handle/11146/2187>
- Andrade Rodrigues, D., Livia Braga, M., Maciel Monticeli, F., Machado Corrêa, S., & Endereço. (2011). *VI-181 - Biorremediação De Solo Contaminado Com Diesel B5 Empregando Bioestímulo E Bioaumentação*. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/329659025_
- IGAC. (2003). Mapa de suelos de Colombia. Escala 1:500000. Memoria explicativa. Colombia.<<Para la determinacion de características del suelo de Piedemonte Llanero>>
- Abril Gomez, J. R. (2010). *Sistemas Agroforestales Como Alternativa De Manejo Sostenible En La Actividad Ganadera De La Orinoquia Colombiana*. Villavicencio. Retrieved from <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/4119>
- Albarracín Garzón, V. (2000). *La Producción Porcina En El Desarrollo Agropecuario Del Piedemonte Llanero, Corpoica*. Villavicencio. Retrieved from <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/32731>
- Arias, J. A. (2005). Contamination of soil and water by hydrocarbons in Colombia. Analysis of phytoremediation as a biotechnology strategy for recovery. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 3. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/inco/v16n1/v16n1a12.pdf>
- Arias, J. A. (2015). Para las características del suelo de la región Orinoquia del repositorio *hemeroteca.unad.edu.co*. Obtenido de <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1846/2065>
- Banco de Occidente. (2005). *La Orinoquia De Colombia y sus características de suelo imeditores*. Retrieved from <https://www.imeditores.com/banocc/orinoquia/>
- Beltrán, R. M. (2013). Guía De Métodos De Biorremediación Para La Recuperación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos *Repositry unilibre*. Obtenido de <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/10607/trabajo%20final%20cd.pdf?sequence=1>
- Bronwyn, K., Le Rouse, M., & Meyers, P. (1 de mayo de 2006). *MICROBIOLOGY SOCIETY*. Obtenido de <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijms.0.63951-0;jsessionid=ga8iFcoLPIx5FYNIQQRfwaTt.mbslive-10-240-10-23>

- Camila Lizarazo, J. R. (2014). *Biología De Suelos* . Obtenido de [biologiadesuelos2014.wordpress.com:https://biologiadesuelos2014.wordpress.com/clarificacion/pag.23-30](https://biologiadesuelos2014.wordpress.com/clarificacion/pag.23-30)
- Carvazos arroyo , j., perez armendariz , B., & Mauricio Gutierrez , A. (2014). *Colpos*. Obtenido De Afectaciones Y Consecuencias De Los Derrames De Hidrocarburos En Suelos Agrícolas De Acatzingo,Puebla, México:Retrieved from <https://www.colpos.mx/asyd/volumen11/numero4/asd-14-001.pdf>
- Cormacarena. (2014). Sobre La Implementacion De La Guia Ambiental Para El Subsector Avicola En El Departamento Del Meta . *Cartilla Tecnica* ,pag. 60.
- Correa, M. F. (2008). *evaluacion de caracteres PGRP en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas*. Granada: Universidad de Granada. Retrieved from <https://hera.ugr.es/tesisugr/17716093.pdf>. Pág.15
- Cotes, A. M., Mosher, S., Barrera , G. P., Kobayashi, S., & Elad, Y. (2015). Novel strategies for plant pathogens biological control. En AGROSAVIA, *Novel strategies for plant pathogens biological control* (pág. 44).
- Elianeth Romero, K. P. (2003). *Pruebas Bioquimicas* . sucre.Retrieved from <https://www.aam.org.ar/descarga-archivos/Parte21Enterobacterias.pdf>
- Ferrari, D. N. (2017). *Assessment Of Compost For Bioremediation Of Polyaromatic Hydrocarbon (Pah) And Petroleum Hydrocarbon Soils*. Retrieved from <https://sapientia.ualg.pt/handle/10400.1/10159>
- Garcia Cruz , U., & Aguirre Macedo , L. (2014). *Biodegradacion de petróleo por bacterias: Algunos casos de estudio en el Golfo de México* . Golfo de México Retrieved from https://scholar.google.com/citations?user=OPuC3_QAAAAJ&hl=en.
- Garcia Duran , O. (2005). <http://observatorio.unillanos.edu.co/>. Obtenido de Las ciencias agrarias y el desarrollo regional . El caso del Meta Colombia : <http://observatorio.unillanos.edu.co/observatorio/archivos/DocumentosDeAnalisis/las%20ciencias%20agrarias%20y%20el%20desarrollo%20regional.pdf>
- Garcia, s. c. (2011). Comportamiento de Bacterias Fijadoras de Nitrogeno en el suelo. *dialnet*. Obtenido de [file:///C:/Users/personal/Downloads/Dialnet-BacteriasSimbioticasFijadorasDeNitrogeno-3761553%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/personal/Downloads/Dialnet-BacteriasSimbioticasFijadorasDeNitrogeno-3761553%20(1).pdf)
- Garcia, u. c., & Macedo Aguirre , L. (2014). Estrategias para la biodegradacion de Hidrocarburos. Obtenido de [biodegradacion de petroleo : https://www.researchgate.net/publication/273002971_Biodegradacion_de_petroleo_por_bacterias_algunos_casos_de_estudio_en_el_Golfo_de_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/273002971_Biodegradacion_de_petroleo_por_bacterias_algunos_casos_de_estudio_en_el_Golfo_de_Mexico)
- Gisbert Blanquer, J., Ibáñez Asensio, S., & Moreno Ramón , H. (2006).Estudio de factibilidad para la recuperacion de suelos . Obtenido de Universidad Politecnica de Valencia : <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/12884/inceptisoles.pdf>

- Heitkamp MA 1 , Cerniglia CE. (1989). *Degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por un Mycobacterium sp. en microcosmos que contienen sedimentos y agua de un ecosistema prístino.* Retrieved from <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v82n2/a07v82n2.pdf>
- Ibarra, T. P. (2018). Reportes en Colombia del impacto por Hidrocarburo. Artículo de revista. *EL TIEMPO*, 2. Retrieved from <https://www.eltiempo.com/noticias/hidrocarburos>
- IDEAM . (2007). *Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales* . Obtenido de <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Hidrocarburos+en+agua+por+extracci%C3%B3n.pdf/14b3ae83-4c72-446c-ab33-a91978c04f5a>
- IGAC. (2016). *Suelos De Piedemonte Llanero.* Obtenido de https://www.igac.gov.co/sites/igac.gov.co/files/informe_de_gestion_vigencia_2017.pdf
- IGAC. (2017). *Informe De Gestión Vigencia 2017 - Instituto Geográfico Agustín Codazzi.* Retrieved from https://www.igac.gov.co/sites/igac.gov.co/files/informe_de_gestion_vigencia_2017.pdf
- Instituto de Ingeniería UNAM. (2005). Estudios en suelos con Hidrocarburos Totales de Petróleo en con suelos de Ph ácido del Cauca. Obtenido de <http://www.iingen.unam.mx/Pages/PageNotFound.aspx?requestUrl=http://www.iingen.unam.mx/es-mx/BancoDeInformacion/MemoriasdeEventos/SolucionesContaminacionSuelo/SusanaSavalBohorquez.pdf>
- Iñon, N. (2018). Biotecnología aplicada en suelos ácidos. Obtenido de <http://www.iib.unsam.edu.ar/archivos/docencia/licenciatura/biotecnologia/2018/QuimicaBiol/1528215167.pdf>
- Joaquim Vila, Z. L. (2001). *Identificación de un nuevo metabolito en la degradación del pireno por Mycobacterium sp. Cepa API: acciones del aislado en hidrocarburos aromáticos policíclicos de dos y tres anillos.* Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/863/86329278009.pdf>
- Leal, M. A. (2017). *Los derrames de combustibles derivados de hidrocarburos del petróleo sobre el suelo. villavicencio* . Retrieved from <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/22447?show=full>
- Lustosa, Mayara ; Lopez , Jorge ; Santos Freire, Karla ; Cabrera Padilla , Rebeca;. (2018). Petroleum hydrocarbon degradation by isolated mangrove bacteria. *Revista virtual Peruana de Biología* , 4. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/329850382_Petroleum_hydrocarbon_degradation_by_isolated_mangrove_bacteria
- Manuel Alvarez ; Franz Tuca; Evelyn Quispe; Victor Meza. (2018). *Incidencia de la inoculación de microorganismos benéficos en el cultivo de fresa (Fragaria sp.).* Lima. Retrieved from <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop/article/view/1731>

- Mariana, W. D. (Abril De 2012). Evaluación de cepas bacterianas en suelo impregnado por hidrocarburos *Lume Repositorio Digital* . Obtenido De Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul : <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/62116>
- Mesa Hídrica . (2016). *Hidrocarburos piedemonte llanero* . Villavicencio Retrieved from https://conflictos-ambientales.net/oca_bd/actors/view/212.
- Minas, M. d. (2015). *Informe de gestión de planes estadísticos en el suelo de Orinoquia* . bogota. Obtenido de <https://www.minenergia.gov.co/informes-de-gestion-planes->
- Mora Alonso, N. X., & Gonzales Martinez , C. C. (2019). Estudio de bacterias hidrocarbonoclastas en suelos contaminados por diesel, cumaral- Meta *repository.usta.edu.co*. Obtenido de <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/16541?show=full>
- Mora, N. V. (4 de junio de 2000). Piedemonte, Un Refugio De Vida. *El Tiempo* .Retrieved from <https://www.eltiempo.com/archivo/documento/MAM-901604>
- Narvaez florez , s., Gomez , m., & Martinez , m. (2008). *scielo* Selección De Bacterias Con Capacidad Degradadora De Hidrocarburos :Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0122-97612008000100004&script=sci_abstract&tlng=es
- Orduz R., J. O., & Rangel M, J. A. (2002). *Frutales tropicales potenciales para el Piedemonte Llanero, Corpoica* . Villavicencio: Produmedios . Retrieved from <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/13427>
- P.H. Pritchard, I. J. (1992). *Oil spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska* . Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/225985161_Oil_spill_bioremediation_experiences_lessons_and_results_from_the_Exxon_Valdez_oil_spill_in_Alaska
- Piza, D. A. (2018). Evaluación de pruebas Bioquímicas en los suelos *edrepositary.uamericau.co*. Obtenido de edrepositary.uamericau.co/bitstream/20.500.11839/7130/1/392273-2018-IGA.pdf
- Ramiro Pereira Bisognin, Diosnel Antonio Rodríguez López, Maria Viviane Gomes Muller, & Alexandre Rieger. (2017). *Analysis of microbial potential of a biopile in soil bioremediation contaminated by petroleum hydrocarbons*.Retrieved from https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522018000300517
- Rodríguez, D. T. (2003). *El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos*. Maracay .Retrieved from <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/350>
- Saavedra, L. (2006). Orinoquía. Colombia.Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0123-93922011000300002

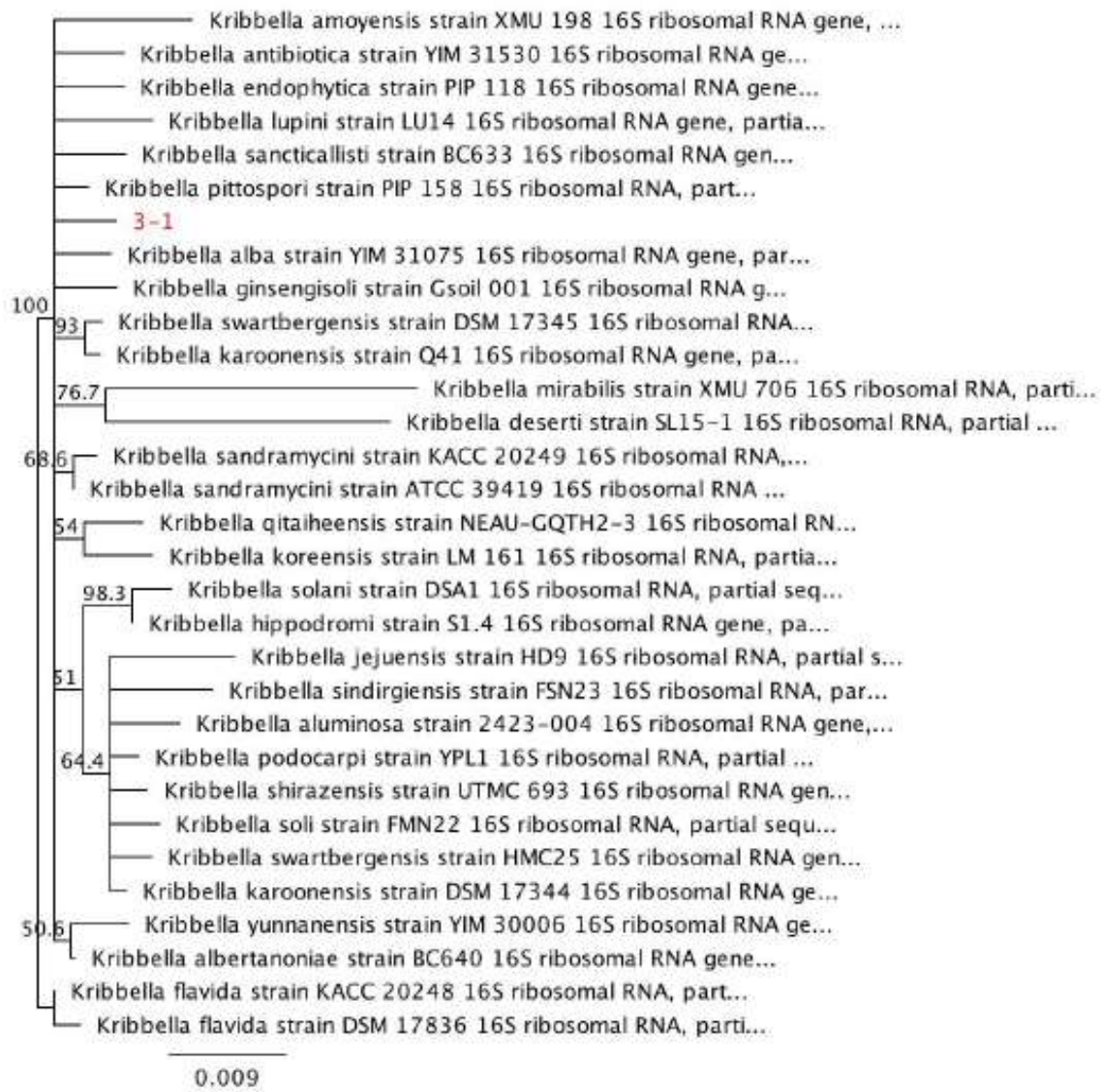
- Salinas Vera, J. D. (2019). *Evaluación Del Potencial Celulolítico Por Bacterias Y Hongos A Diferentes Concentraciones De Diésel De Suelo No Perturbado Y Disturbado Del Piedemonte Llanero Obtenido Del Instituto Agrícola Guacavía En El Municipio De Cumaral (Meta)*. Villavicencio . Retrieved from <https://repository.usta.edu.co/handle/11634/16793?show=full>
- Sergio, C. G. (2011). *Dialnet* . Desarrollo de Bacterias simbióticas en los suelos Obtenido de Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno: file:///C:/Users/personal/Downloads/Dialnet-BacteriasSimbióticasFijadorasDeNitrogeno-3761553.pdf
- Susana Saval, F. L. (2012). *lessar*. Contaminación De Acuíferos Con Hidrocarburos: Causas, Efectos, Riesgos Asociados Y Medidas De Prevención. Retrieved from: <http://www.lessar.com.mx/files/0-Cap.Academia-final.pdf>
- Tello, R. B. (2014). *Evaluación De Los Efectos Ambientales De La Gasolina, Diesel, Biodiesel Y Etanol Carburante En Colombia Por Medio Del Análisis De Ciclo De Vida* . bogota. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/50031/1/02300580.2014.pdf>
- Torres delgado , k., & zuluaga montoya , t. (2009). *Biorremediación De Suelos Contaminados Por Hidrocarburos*. medellin . Retrieved from http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf
- UCM . (2010). *UCM.ES*. Materia orgánica y actividad biológica : Retrieved from <https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-104576/1.%20Materia%20org%C3%A1nica%20y%20actividad%20biol%C3%B3gica.pdf>
- Universidad Nacional Autónoma de México . (2014). Probas bioquímicas microbiológicas.Retrieved from http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Protocolos2014_1_24195.pdf pág. 74.
- Vargas Tejedor , Y., & Leon Rodriguez , N. (2016). *Exploración y explotación de petróleo: enfoque geográfico de los efectos ambientales en el Piedemonte llanero*. Obtenido de scielo.org: <http://www.scielo.org.co/pdf/pgeo/v21n2/v21n2a02.pdf>
- VILLANUEVA, A. L. (febrero de 2016). Trabajo de grado de bacterias hidrocarbonoclastas *Universidad Autónoma De Nuevo León* . Obtenido de repositorio Universitario : <http://eprints.uanl.mx/13661/1/1080238042.pdf>
- VIRACACHÁ, M. C. (2012). Impactos por hidrocarburos en el suelo Obtenido de <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/2645/Otaloramildred2012.pdf?sequence=1&isAll>
- Wen, J. L., Dong, W., yu-quin, Z., Li- Hua, X., & Cheng- Li , J. (24 de enero de 2006). *sciencedirect.com* Microbiología Sistemática y aplicada. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0723202005001293>

14. Apéndices

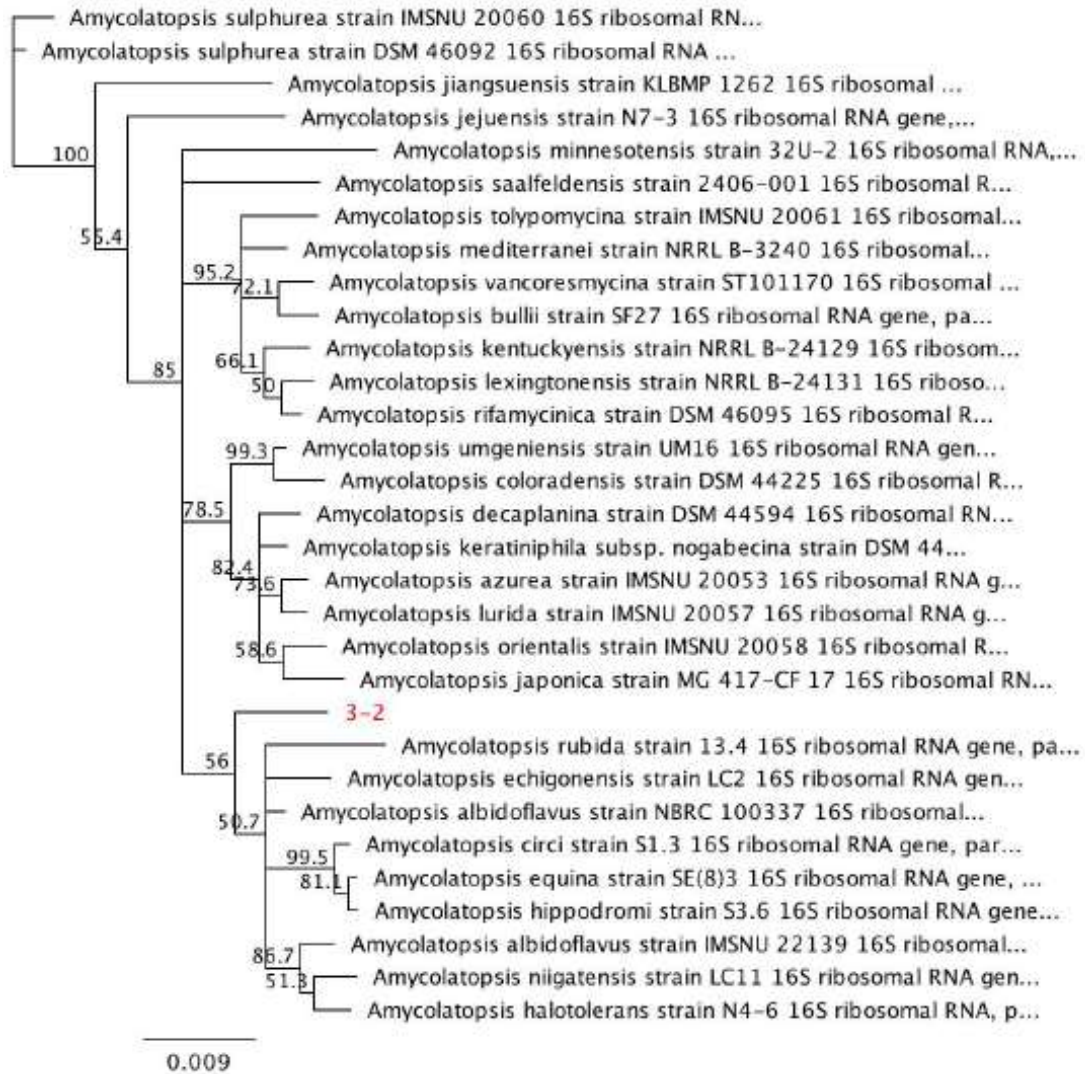
Apéndice A. Ubicación del laboratorio de Microbiología de la Universidad Santo Tomas de Villavicencio donde se efectuaron los datos



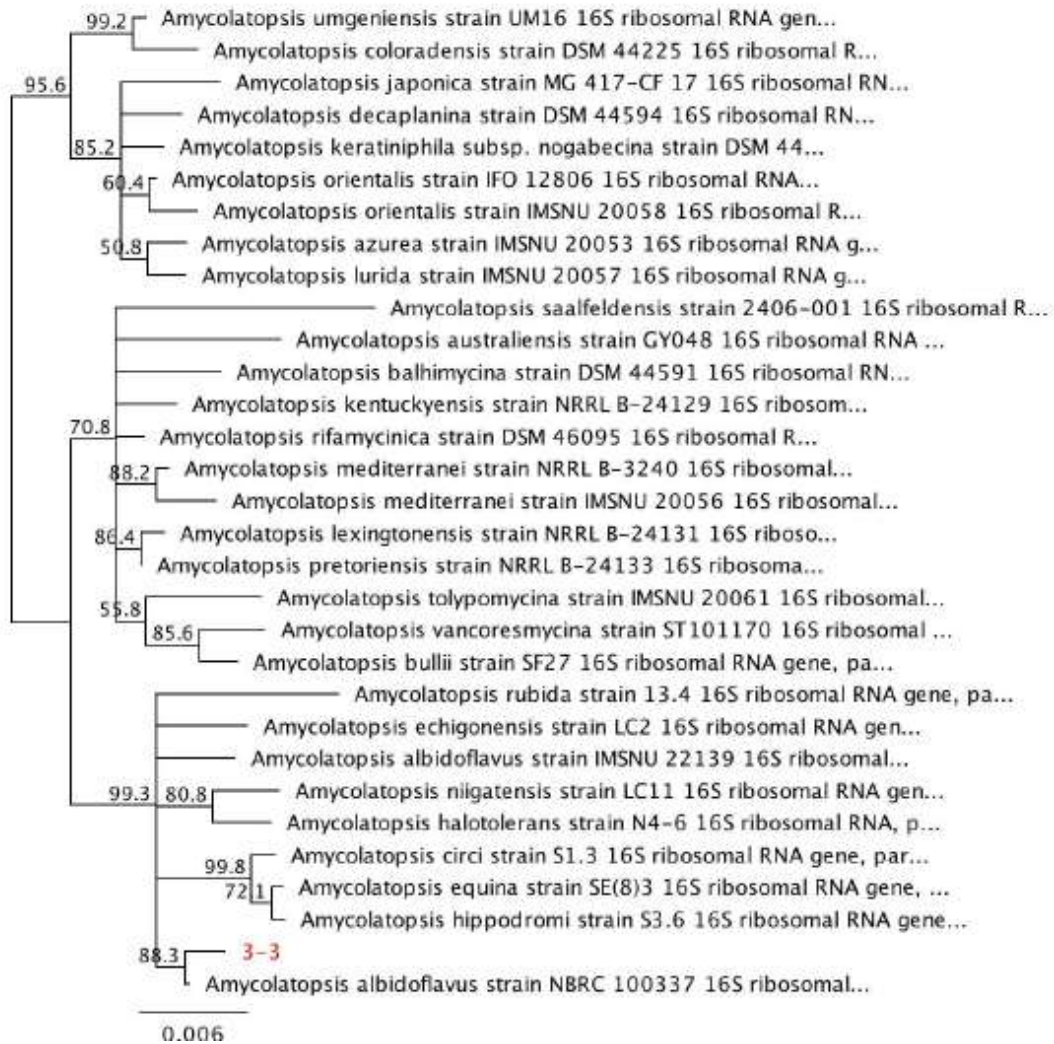
Apéndice B. Árbol filogenético de la cepa D_04.



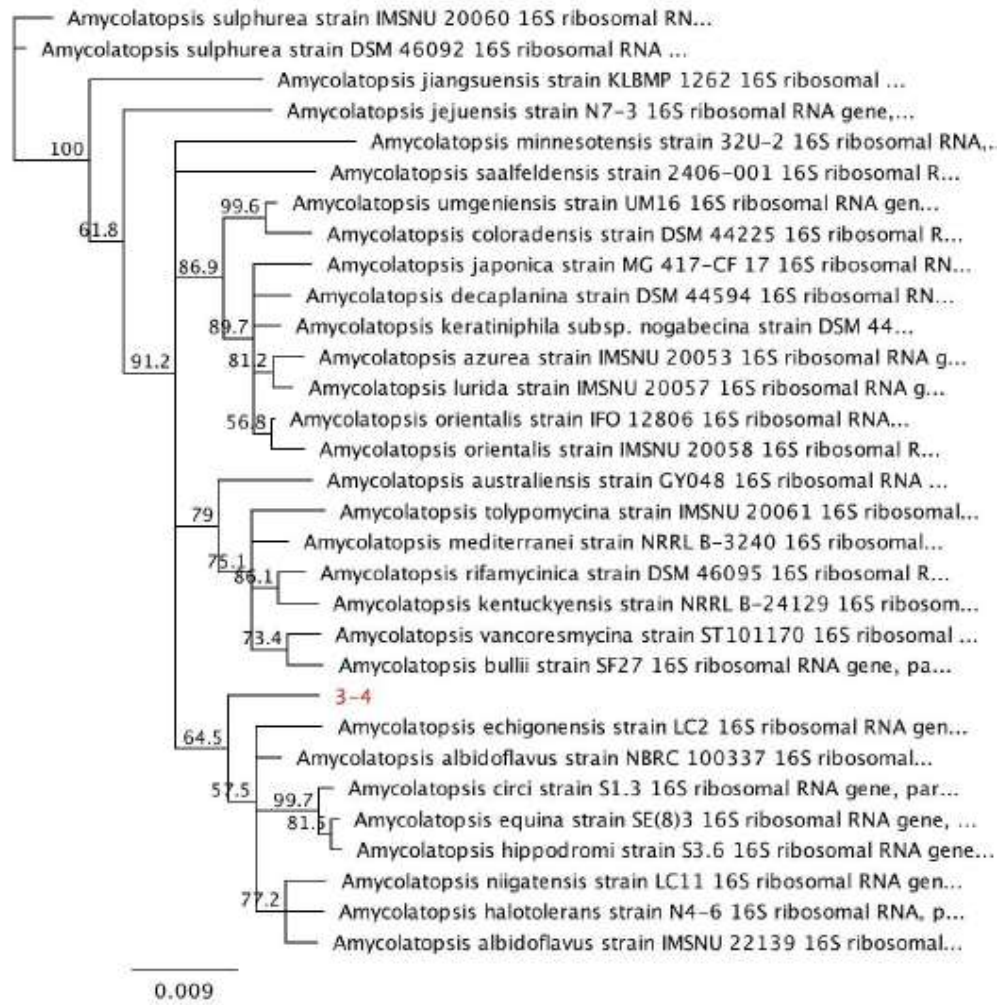
Apéndices C. Árbol filogenético de la cepa D_05



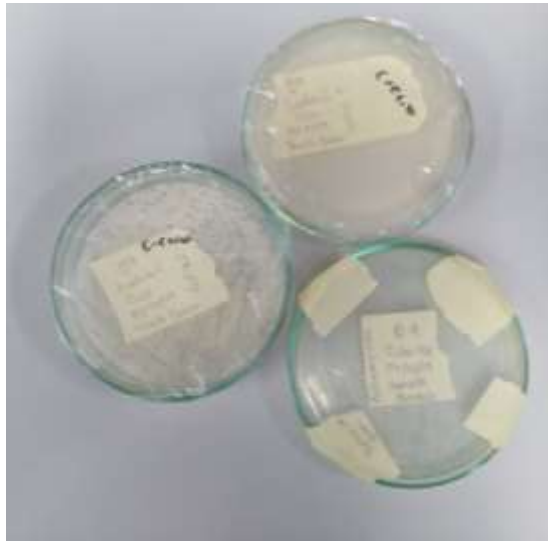
Apéndice D. Árbol filogenético de la cepa D_09



Apéndice E. Árbol filogenético de la cepa D_11



Apéndice F. Selección de cepas que crecieron para el desarrollo de las concentraciones de hidrocarburos



Apéndice G. Prueba estadística Tukey para diferencias significativas entre tratamientos

ANOVA: Single Factor

DESCRIPTION					Alpha	0,05		
Group	Count	Sum	Mean	Variance	SS	Std Err	Lower	Upper
0 mg kg ⁻¹	3	2,9E+06	9,7E+05	4,989E+11	9,978E+11	387233,78	77037,3031	1862962,7
2500 mg kg ⁻¹	3	3,1E+06	1,0E+06	5,5823E+11	1,1165E+12	387233,78	153703,97	1939629,36
6100 mg kg ⁻¹	3	4,7E+06	1,6E+06	5,7013E+11	1,1403E+12	387233,78	680370,636	2466296,03
9800 mg kg ⁻¹	3	3,4E+06	1,1E+06	1,7213E+11	3,4427E+11	387233,78	233703,97	2019629,36

Anova

Sources	SS	df	MS	F	P value	F crit	RMSSE	Omega Sq
Between Groups	6,5829E+11	3	2,1943E+11	0,48778605	0,70024572	4,06618055	0,40323114	0,14685934
Within Groups	3,5988E+12	8	4,4985E+11					
Total	4,2571E+12	11	3,8701E+11					

TUKEY HSD/KRAMER						alpha	0,05
group	mean	n	ss	df	q-crit		
0 mg kg ⁻¹	9,7E+05	3	9,978E+11				
2500 mg kg ⁻¹	1,0E+06	3	1,1165E+12				
6100 mg kg ⁻¹	1,6E+06	3	1,1403E+12				
9800 mg kg ⁻¹	1,1E+06	3	3,4427E+11				
		12	3,5988E+12	8	4,529		

Q TEST

group 1	group 2	mean	std err	q-stat	lower	upper	p-value	mean-crit	Cohen d
	2500 mg					-			
0 mg kg ⁻¹	kg ⁻¹	76666,6667	387233,78	0,19798548	1677115,12	1830448,45	0,99893611	1753781,79	0,11430697
	6100 mg					-			
0 mg kg ⁻¹	kg ⁻¹	603333,333	387233,78	1,55805967	1150448,45	2357115,12	0,69849763	1753781,79	0,89954617
	9800 mg					-			
0 mg kg ⁻¹	kg ⁻¹	156666,667	387233,78	0,40457903	1597115,12	1910448,45	0,99120521	1753781,79	0,23358381
2500 mg	6100 mg					-			
kg ⁻¹	kg ⁻¹	526666,667	387233,78	1,36007418	1227115,12	2280448,45	0,7739902	1753781,79	0,7852392
2500 mg	9800 mg					-			
kg ⁻¹	kg ⁻¹	80000	387233,78	0,20659355	1673781,79	1833781,79	0,9987923	1753781,79	0,11927684
6100 mg	9800 mg					-			
kg ⁻¹	kg ⁻¹	446666,667	387233,78	1,15348064	1307115,12	2200448,45	0,8455939	1753781,79	0,66596236