

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)



JOSÉ DAVID SALINAS VERA



UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
VILLAVICENCIO

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
GUACAVIA EN EL MUNICIPIO DE CUMARAL (META)

JOSÉ DAVID SALINAS VERA

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniero Ambiental

Asesor

MSc. MARÍA ALEXANDRA MÉNDEZ LEAL

Microbióloga Industrial

UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
VILLAVICENCIO

2019

Autoridades Académicas

P. Juan Ubaldo LÓPEZ SALAMANCA, O.P.

Rector General

P. Mauricio Antonio CORTÉS GALLEGO, O.P.

Vicerrector Académico General

P. José Arturo RESTREPO RESTREPO, 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

YÉSICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN

Decana Facultad de Ingeniería Ambiental.

Nota De Aceptación

YÉSICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN

Decana de Facultad

MARÍA ALEXANDRA MÉNDEZ LEAL

Directora Trabajo de Grado

CESAR AUGUSTO RIVEROS ROMERO

jurado

NUBIA LORENA VALENCIA ZULETA

jurado

Villavicencio, mayo de 2019

*A la memoria de aquellos que con su esfuerzo y compromiso consiguieron su sueño buscando su
propio sendero...*

Agradecimientos

En la vida nos quedamos cortos en poder expresar todo el agradecimiento y la gratitud hacia aquellos que nos ayudaron y brindaron un voto de confianza en momentos de crisis.

A mi familia, especialmente mi abuelita quien sin su sabia orientación, entrega y sacrificio muchos de los logros aquí presentes no se hubieran cumplido. A la Docente; María Alexandra Méndez directora del presente proyecto, por su dedicación e infinita paciencia, a la Docente; Alfonsina Bocanegra Gómez que con su colaboración aportó sus conocimientos para el desarrollo de este documento. Al FODEIN (fondo de investigación) de la Universidad Santo Tomás, sede Villavicencio por la financiación de este proyecto. A la coordinación de Laboratorios y personal por su amplia tolerancia, acompañamiento y ayuda.

Tabla de contenido

	Pág.
Resumen.....	17
Abstract	18
Introducción	19
1. CAPÍTULO I	21
1.1. Planteamiento del problema.	21
1.1.1. Formulación entorno al problema.	21
1.1.2. Descripción del problema.	21
1.2. Objetivos	23
1.2.1. Objetivo general.....	23
1.2.2. Objetivos específicos	23
1.3. Justificación.....	24
1.4. Alcance.....	26
1.4.1. Población.....	26
1.4.2. Espacial	26
1.4.3. Temporal	26
1.5. Hipótesis nula.....	26
2. Capítulo II.....	27
2.1. Antecedentes.	27
2.2. Marco teórico	28
2.2.1. Hidrocarburos derivados del petróleo.	28
2.2.2. Diésel.	29
2.2.3. Vertimientos o derrames de diésel.....	29
2.2.4. Piedemonte Llanero.....	30
2.2.5. Piedemonte llanero en el departamento del Meta.	30
2.3. Marco conceptual	31
2.3.1. Celulasas.....	31
2.3.2. Celulosa.....	31

2.3.3.	Microorganismos con actividad celulolítica.	31
2.3.4.	Institución Educativa Agrícola de Guacavía en Cumaral – Meta.	33
2.4.	Marco legal.....	33
3.	Capítulo III	34
3.1.	Metodología.	34
3.1.1.	Etapas metodológicas.....	34
3.1.2.	Materiales y métodos.	35
4.	Capítulo IV.	43
4.1.	Resultados y análisis	43
4.1.1.	Determinación de la viabilidad y actividad celulolítica.....	47
4.1.2.	Identificación de microorganismos celulolíticos.	47
4.1.3.	Correlación de resultados.....	51
4.1.4.	Correlación de resultados.....	69
	Conclusiones y Recomendaciones.....	75
	Referencias.....	78

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Número de artículos científicos publicados por año en la base de datos Scopus con las palabras clave.....	27
Figura 2. Estructura química de la celulosa.	31
Figura 3. Sistema aleatorio tipo Zig-Zag.	35
Figura 4. Guía de procedimiento NTC 4113-4/2017 (1 ha por 1 muestra).....	36
Figura 5. Tamizaje a través de 0,2 mm.	36
Figura 6. Contaminación de Diésel a diferentes concentraciones..	37
Figura 7.Tratamientos contaminados con Diésel.....	37
Figura 8. Ubicación de los tratamientos contaminados en el laboratorio de Toxicología Ambiental.....	37
Figura 9. Muestra en el agitador orbital durante 30 min.....	39
Figura 10. Diluciones en Cajas de Petri.....	39
Figura 11. Medición del diámetro de halo..	41
Figura 12. Evidencia fotográfica del resultado obtenido a partir de la tabla Munsell.	45
Figura 13. Coco Gram Negativo.....	49
Figura 14. Coco-Bacilo.....	49
Figura 15. Método de siembra por superficie demostrando capacidad celulolítica en Agar CMC 1% (p/v)..	50
Figura 16. Zona de aclaramiento, cepa N1b2 (a) y la cepa N2b2 (b) en Agar CMC 1% (p/v).....	51
Figura 17. Comportamiento de la cepa N0b1 a distintas concentraciones de CMC.....	52
Figura 18. Comportamiento de la bacteria N0b2 a distintas concentraciones de CMC.	54
Figura 19. Comportamiento de la bacteria N0b3 a distintas concentraciones de CMC..	55
Figura 20. Comportamiento entre las bacterias de estudio a 6,1 g/kg de Diésel.	55
Figura 21. Comportamiento de la bacteria N1b1 a distintas concentraciones de CMC.	57
Figura 22. Comportamiento de la bacteria N1b2 a distintas concentraciones de CMC.	58
Figura 23. Comportamiento de la bacteria N1b3 a distintas concentraciones de CMC.	59

Figura 24. Comportamiento entre las bacterias de estudio a 9,8 g/kg de Diésel mes 1.....	60
Figura 25. Grafico comparativo entre cepas, concentración de CMC y concentración de Diésel.	61
Figura 26. Comportamiento de la bacteria N2b1 a distintas concentraciones de CMC.	62
Figura 27. Comportamiento de la bacteria N2b2 a distintas concentraciones de CMC.	63
Figura 28. Comportamiento de la bacteria N2b3 a distintas concentraciones de CMC.	65
Figura 29. Comportamiento entre las bacterias de estudio a 9,8 g/kg de Diésel en el mes 2	65
Figura 30. Comportamiento de los microorganismos luego de un periodo de un mes. Serie 1. Mes 1 y Serie 4. mes 2. i. Representa n° de serie.	66
Figura 31. Cepa de hongo filamentoso <i>Aspergillus</i> sp.	67
Figura 32. Zona de aclaramiento, cepa N0h1 en Agar CMC 1% (p/v)..	68
Figura 33. Zona de aclaramiento, cepa N1h2 en Agar CMC 1% (p/v).	68
Figura 34. Zona de aclaramiento, cepa N2h3 en Agar CMC 1% (p/v)..	68
Figura 35. Actividad celulolítica de la cepa N0h1.....	70
Figura 36. Actividad celulolítica de la cepa N0h2.....	71
Figura 37. Actividad celulolítica de la cepa N0h3.....	72
Figura 38. Comportamiento de las cepas de Hongos.....	73
Figura 39. Extrapolación de los resultados de las cepas que presentaron mayor potencial celulolítico.....	74

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Distribución metodológica.....	34
Tabla 2. Tratamientos de control.	36
Tabla 3. Parámetros físicos procesado en el laboratorio de Suelos	38
Tabla 4. Parámetro obtenido por el laboratorio de Tecno Ambiental S.A.S.	38
Tabla 5. Reactivos del medio de cultivo CMC (P/V).	40
Tabla 6. Porcentaje textural.	43
Tabla 7. Resultados físicos preliminares.	44
Tabla 8. Resultados físicos del terreno de donde se extrajo la muestra.....	44
Tabla 9. Datos obtenidos de los resultados de Agrosavia.....	46
Tabla 10. Datos obtenidos del laboratorio de Tecno Ambiental S.A.S..	47
Tabla 11. Número de colonias de bacterias presentes en los tratamientos	47
Tabla 12. Tabla de decodificación de las cepas seleccionadas.....	48
Tabla 13. Caracterización macro y microscópica de las cepas bacterianas aisladas	49
Tabla 14. Actividad celulolítica cualitativa de las cepas bacterias aisladas en agar CMC 1% (p/v).....	50
Tabla 15. Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°1 (N0b1).....	52
Tabla 16. Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°2 (N0b2).....	53
Tabla 17. Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°3 (N0b3).....	54
Tabla 18. Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°4 (N1b1) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg para el mes 1 potencial celulolítico por duplicado (A y B).....	56
Tabla 19. Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°5 (N1b2) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 1 para el potencial celulolítico por duplicado (A y B)..	57
Tabla 20. Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°6 (N1b3) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 1 para el potencial celulolítico por duplicado (A y B)..	58
Tabla 21. Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°7 (N2b1) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 2, para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).	61

Tabla 22. Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°8 (N2b2) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 2, para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).	63
Tabla 23. Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°9 (N2b3) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 2, para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).	64
Tabla 24. Actividad celulolítica cualitativa de las cepas de hongos filamentosas aisladas en agar CMC 1% (p/v) y codificación.....	67
Tabla 25. Índice de correlación de Pearson de la cepa de hongo n°1 en relación al tratamiento Diésel 2.4571 g/kg, para el potencial celulolítico.....	69
Tabla 26. Índice de correlación de Pearson de la cepa de hongo n°2 en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg, para el potencial celulolítico.....	71
Tabla 27. Índice de correlación de Pearson de la cepa de hongo n°3 en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg, para el potencial celulolítico.....	72

Lista de Anexos

	Pág.
<i>Anexo 1. Límites entre Villavicencio y Cumaral.</i>	88
<i>Anexo 2. Ubicación del Instituto Educativo Agrícola de Guacavía dentro de la frontera.....</i>	89
<i>Anexo 3. Ficha técnica de la vigilancia tecnológica.</i>	90
<i>Anexo 4. Noticias de incidentes de vertimiento.</i>	91
<i>Anexo 5. Precipitación en zonas del Piedemonte Llanero.</i>	92
<i>Anexo 6. Histograma de precipitación de la estación APTO VANGUARDIA.....</i>	93
<i>Anexo 7. Instituto Agrícola Guacavía en el Municipio de Cumaral (Meta).</i>	94
<i>Anexo 8. Cercanía del Instituto Agrícola Gua</i>	95
<i>Anexo 9. Anexo normativo.</i>	96
<i>Anexo 10. Parámetros, métodos y unidades de los datos químicos.</i>	98
<i>Anexo 11. Datos obtenidos de los parámetros químicos por el laboratorio de suelos de Agrosavia.....</i>	99
<i>Anexo 12. Tabla de las cepas de hongos encontradas.....</i>	100
<i>Anexo 13. Tabla de las cepas Bacterianas.</i>	101

Glosario

1. **Agar:** Agar o Agar-agar es un compuesto de polisacárido con galactosa, un azúcar simple; del cual se obtiene a partir de agregado de ciertas algas (Pérez, *et al*, 2015).
2. **Aislar:** Separar un elemento químico, un microorganismo u otra cosa de manera que se pueda analizar por separado (Pérez, *et al*, 2011).
3. **Bioquímicas:** Es la encargada del estudio de las sustancias que se encuentran presentes en los organismos vivos y de las reacciones químicas fundamentales para los procesos vitales, algunos como son, las proteínas, los lípidos, los carbohidratos y los ácidos (Pérez, *et al*, 2009).
4. **Carboximetilcelulosa:** El (CMC) o Carboximetilcelulosa, es un compuesto soluble en agua derivado del éter de celulosa, importante la aplicación en diversos usos en la industria. Se produce por modificación química de la celulosa (Terán, *et al*, 2008).
5. **Celulasas:** Uno de los compuestos orgánicos más abundante en la tierra, y por tanto el carbohidrato más abundante. Debido a que el componente primario en la mayoría de las paredes celulares de las plantas superiores (Psychiatric Association, 2017).
6. **Celulosa:** “Polisacárido natural de alto grado, de fórmula empírica $(C_6H_{10}O_5)_n$, formado por una cadena abierta de moléculas de celobiosa (-d glucopiranosido 1,4 - d glucopirasona)” (NTC 417, 1970).
7. **Cepa:** Cultivo puro de un clon o raza de una especie debidamente identificado y caracterizado, utilizado para iniciar procesos de multiplicación masiva y como material de referencia (ICA, 2011).
8. **Colonia:** “Acumulación visible localizada de masa microbiana, desarrollada sobre o dentro de un medio nutritivo sólido a partir de una partícula viable” (NTC 5698-1, 2009).
9. **Cultivo mixto:** Cultivo microbiológico que comprende más de un tipo de genero microbiano (Romero, *et al*; 2016).
10. **Cultivo puro:** Obtener colonias aisladas, que provienen de una sola célula (son clones) en un cultivo (Luna, F. J. (2012).

- 11. Dilución:** Disminución de la concentración de los compuestos contaminantes presentes en el gas de escape de un vehículo automotor debido a un aumento excesivo en la concentración de oxígeno presente en la muestra analizada (NTC 4983; 2012).
- 12. Halo:** Zona de aclaramiento alrededor de la colonia (Flores, 2009).
- 13. Hidrocarburo:** Es el compuesto bioquímico formado únicamente por carbono e hidrógeno en su molécula (Pérez, 2011).
- 14. Inóculo:** Volumen conocido o no de células microbianas que permite obtener colonias aisladas (Brock, *et al*; 2018).
- 15. Impacto ambiental:** “Cualquier alteración en el sistema ambiental biótico, abiótico y socioeconómico, que sea adverso o beneficioso, total o parcial, que pueda ser atribuido al desarrollo del proyecto, obra o actividad” (Uribe, 2011).
- 16. Metabolismo:** Resultado conjunto de las reacciones catabólicas y anabólicas que se producen en la célula. (OpenStax Biología; 1999)
- 17. Microorganismo:** Son los seres más primitivos y numerosos que existen en la Tierra, colonizan todo ambiente: suelo, agua y aire, participando de forma vital en los ecosistemas y están en interacción continua con las plantas, los animales y el hombre (Torres, 2011)
- 18. Oxisol:** Suelos muy evolucionados, típicos de ambientes tropicales. Casi no tienen minerales diferentes al cuarzo en su fracción gruesa y en la fracción arcilla predominan los óxidos de Fe y de Al; son ácidos y se identifican por la terminación OX (Jaramillo, 2002).
- 19. Ultisoles:** “Suelos muy evolucionados que presentan un horizonte que ha acumulado arcilla que se ha movilizado desde las partes más superficiales del suelo. Las arcillas acumuladas son de baja calidad por lo que el suelo es ácido y poco fértil” (Jaramillo, 2002).
- 20. Inceptisoles:** “Son suelos que no cumplen los requisitos para ubicarse en alguno de los órdenes anteriores pero que presentan evidencias de evolución incipiente que los ha llevado a desarrollar varios horizontes con estructura de suelo” (Jaramillo, 2002).
- 21. Piedemonte Llanero:** También denominada Llanos Orientales de Colombia, una extensa sabana que llega hasta el río Orinoco por el oriente y se extiende en sentido norte-sur desde el río Arauca hasta el río Guaviare; en la cual se pueden identificar los paisajes de piedemonte, ubicados en la base de la vertiente oriental de la cordillera Oriental (Cortes, *et al*, 2018).

- 22. Potencia enzimática:** Efectividad en los procesos de dirección de la variabilidad de las reacciones químicas; en la que ocurren las acciones necesarias que dan lugar a todo ser vivo (Ferrerías Gómez, 1994).
- 23. Rojo congó:** O también denominada sal de ácido naftilensulfónico 3,3'-(4,4'-bifenilenbis (azo) bis (4amino) disódico, es un colorante diazo-aniónico, el cual es preparado por una tetradiazotación con bencidina y ácido naftilsulfónico (Martínez, 2012).
- 24. Suelo:** Es un sistema abierto, con intercambio continuo de materia y energía, con ecodependencia energética con el ambiente y los mecanismos autorreguladores que conducen a establecer un orden a través de las fluctuaciones (Bonnet, 1968).
- 25. Tinción de Gram:** Tinción diferencial, permite la descripción de la morfología de la bacteria y la clasificación en dos grupos dependiendo de si retienen o no la tintura violeta cristal (Gram+) en las condiciones de ensayo. (Pérez, *et al*, 2014)
- 26. UFC g-1 de suelo:** Unidades Formadoras de Colonia, cada colonia desarrollada en un medio de cultivo sólido (agar, principalmente), proveniente de la siembra en el de un extracto de suelo con una determinada dilución (Camacho, 2009).
- 27. Xenobiótico:** Toda sustancia ajena que produce algún tipo de alteración en el medio produciendo una composición o metabolismo de los organismos vivos. El cual está relacionado con toxico y contaminante ambiental, ya que pueden ser contaminantes tóxicos (Universidad de Alcalá, 2018).

Resumen

El estudio presenta la viabilidad y capacidad de bacterias y hongos endémicos en el mantenimiento de la capacidad de producir enzimas células, uno de los roles primordiales del ciclaje de los nutrientes y la productividad ecosistémica en suelos, ante el vertimiento accidental o incidental de combustibles derivados del petróleo como el diésel.

La investigación, hace parte del macroproyecto denominado “*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 cual busca responder al segundo objetivo “*Evaluar la densidad microbiana de bacterias y hongos asociados a los grupos funcionales de microorganismos del suelo en los ciclos biogeoquímicos de nitrógeno, fósforo y carbono, en un ensayo experimental ex situ con dos tipos de contaminantes (gasolina y diésel)*”, informando exclusivamente los comportamientos de microorganismos celulolíticos en tratamientos con diésel, para lo cual, se simuló un vertimiento del combustible en condiciones controladas, empleando suelo del piedemonte llanero, obtenido de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía (I.E.A.G.) (Cumaral-Meta) y procesado para aislar y analizar el potencial celulolítico de bacterias y hongos endémicos, en los laboratorios de Microbiología y Biología, Suelos y Biotecnología y Toxicología de la Universidad Santo Tomás Sede Villavicencio (Meta); la metodología planteada se desarrolló en cuatro meses, se emplearon tratamientos conteniendo 7 kg de suelos, se contaminaron artificialmente, por triplicado, con las concentraciones de diésel 0 g/kg, 2,5 g/kg, 6,1 g/kg y 9,8 g/kg, donde la preseleccionaron las cepas con actividad celulolítica empleando rojo congo; obteniendo que del 33% de las cepas de hongos filamentosos con la propiedad, tan solo el 23,1%, cepas N0h1, N1h2 y N2h3, demostraron mayor capacidad de hidrólisis, se identificaron como *Aspergillus* sp. Del 67% de las cepas bacterianas encontradas, solo el 11,3% presento una mayor capacidad celulolítica, siendo identificadas en su mayoría como *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp.; a continuación, mediante el índice de Pearson que las cepas N0b1 y N2b2 poseen el mayor potencial celulolítico, siendo de interés para ser empleadas en procesos de recuperación de suelos impactados con vertimientos de diésel.

Palabras clave: Celulolíticos, suelo piedemonte, diésel, bacterias y hongos.

Abstract

The study presents the viability and capacity of bacteria and fungi in the maintenance of the ability to produce enzymes of cells, one of the primary roles of the service cycle and productivity in soil systems, before accidental spillage or incidental petroleum-based fuels such as diesel.

The research is part of the macroproject called "Behavior of the physical, chemical and microbiological characteristics in soils of agricultural vocation artificially contaminated with Gasoline and Diesel in the foothills of the municipality of Cumaral (Meta)", which seeks to respond to the second objective " To evaluate the microbial density of bacteria and fungi associated to the functional groups of soil microorganisms in the biogeochemical cycles of nitrogen, phosphorus and carbon, in an ex situ experimental test with two types of pollutants (gasoline and diesel), "reporting exclusively the behaviors of cellulolytic microorganisms in reactors with diesel, for which, simulated a dumping of the fuel under controlled conditions, using soil from the piedmont piedmont, obtained from the Agricultural Educational Institution of Guacavia (IEAG) (Cumaral-Meta) and processed to isolate and analyze the cellulolytic potential of bacteria and ho endemic ngos, in the laboratories of Microbiology and Biology, Soils and Biotechnology and Toxicology of the Santo Tomás University Villavicencio Headquarters (Meta); the proposed methodology was developed in four months, reactors containing 7 kg of soil were used, they were artificially contaminated, in triplicate, with the concentrations of diesel 0 g / kg, 2.5 g / kg, 6.1 g / kg and 9 , 8 g / kg, then a preselection of the strains with cellulolytic activity using Congo red was carried out; obtaining that of 33% of the strains of filamentous fungi with the property, only 23.1%, strains N0h1, N1h2 and N2h3, showed a greater hydrolysis capacity, they were identified as *Aspergillus* sp. Of 67% of the bacterial strains found, only 11.3% had a greater cellulolytic capacity, being identified mostly as *Pseudomonas* sp. and *Bacillus* sp .; then, it was determined by the Pearson index that strains N0b1 and N2b2 have the highest cellulolytic potential, being of interest to be used in recovery processes of soils impacted with diesel discharges.

Key words: Cellulolytics, piedmont plains soil, diesel, bacterium and fungus

Introducción

El sector agrícola, representa económicamente importancia a nivel mundial; según las estimaciones de crecimiento poblacional, la producción agrícola tendrá un incremento del 60% hasta el 2050 para poder satisfacer la demanda global proyectada de alimentos, fibras y combustibles (El Economista, 2017; FAO, 1955). Tan solo en Colombia, este grupo representa el segundo generador de empleo después de la fracción de servicios sociales, comunales, y personales; del cual se origina el 14% del producto interno bruto (Pedraza Zapata, 2014). El departamento del Meta posee un uso de suelo agrícola del 4,423,365 ha, equivalente al 51,7% de su territorio; gran parte de los agroecosistemas se hallan localizados cerca de la infraestructura vial y de transporte (Madr-Sipra, 2018).

La cercanía de cultivos a la malla vial del departamento, vinculada con el uso operativo de maquinaria agrícola y la dependencia al uso de combustibles de origen fósil, incrementa el riesgo latente a vertimientos de crudo de petróleo o sus derivados, impactando de manera negativa al entorno ecológico provocando un desequilibrio en el entorno biótico y abiótico (Velásquez, 2017; Gómez Romero, *et al*, 2008).

Los efectos biológicos y ambientales –alteración de flora, fauna y microbiota- que se presentan luego de un derrame de Diésel u otros derivados de los hidrocarburos sobre el suelo, son causados por las propiedades intrínsecas del compuesto químico; tales como sus elevados rangos en el número de átomos de carbono, los cuales resultan tóxicos para el entorno. Dichos derrames se ven influenciadas por características físicas, químicas y biológicas del suelo y por las condiciones climatológicas del entorno (Fernández, 2015).

Entre los materiales que forman los suelos del piedemonte llanero, se ubican los entisoles, inceptisoles, molisoles, ultisoles, los cuales se caracterizan por tener un plano inclinado con una pendiente 1-7 %, un microrelieve ondulado, textura variada de gruesa a finas, muy fuertemente ácidos, fertilidad baja, toxicidad por aluminio encuentran con un relieve de Abanicos antiguos y

una litología de sedimentos mixtos aluviales que recubren depósitos de cantos y grava bastantes alterados (IGAC, 2018).

El departamento del Meta; cuya temperatura promedio oscila entre los 26 °C, pH (<4,5), saturación alta de aluminio (>70%), baja saturación de bases (<25%); predominancia de cuarzo, caolinita (arcilla), provenientes de sedimentos del pleistoceno reciente al Holoceno; baja disponibilidad de fósforo (1 ppm), potasio, calcio y magnesio, y elementos menores, con excepción del hierro y baja concentración de carbono orgánico, con una precipitación anual de 2700 mm, humedad relativa promedio del 85% (Rincón, *et al*, 2010).

Con respecto a la microbiota, en los oxisoles se han identificado hongos del genero *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp, *Actinomucor* sp, *Streptomyces* sp., *Trichoderma* sp. y bacterias del genero *Pseudomonas* sp, *Arthrobacter* sp, *Agrobacterium* sp, *Alcaligenes* sp, *Azotobacter* sp., *Mycobacterium* sp. *Flavobacter* sp., *Cellulomonas* sp., *Micrococcus* sp.; aunque específicamente de los suelos en el piedemonte llanero, la información correspondiente a recuentos, identificación y funcionalidad de la microbiota nativa son escasos (Beltrán, 2015), generando incertidumbre en los análisis de estudios con respecto al comportamiento de éstos ante un eventual derrame de hidrocarburos derivados del petróleo, como el diésel.

Por tanto, el presente estudio, se encuentra en el marco del segundo objetivo “Evaluar la densidad microbiana de bacterias y hongos asociados a los grupos funcionales de microorganismos de suelos en los ciclos biogeoquímicos de nitrógeno, fósforo y carbono, en un ensayo experimental”, del macroproyecto “*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)*”; buscando determinar la importante actividad en el ciclo del carbono, como es la capacidad para degradar uno de los compuestos más complejos y abundantes de la naturaleza, la celulosa; mediante el análisis del potencial para hidrolizar diferentes concentraciones de carboximetilcelulosa por parte de bacterias y hongos nativos aislados del suelo del piedemonte llanero artificialmente contaminado con diésel.

1. Capítulo I

1.1. Planteamiento del problema.

1.1.1. Formulación entorno al problema.

Determinar la actividad y potencial celulolítico de bacterias y hongos identificados en un suelo no perturbado con hidrocarburos y disturbado con vocación agrícola, extraído de predios de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía en el municipio de Cumaral (Meta) contaminado experimentalmente con diésel en concentraciones (2,5 g/kg, 6,1 g/kg y 9,8 g/kg), en un periodo de 4 meses.

1.1.2. Descripción del problema.

El departamento del Meta actualmente es el principal productor de petróleo en el país. Según el Departamento Nacional de Estadística (DANE), contribuyó de un modo significativo a la tasa de crecimiento anual del producto interno bruto (PIB) del país; con una variación porcentual del 20,7% al 27,7% (ICER, 2016). Así mismo, Los volúmenes de hidrocarburo que son extraídos cada año son movilizados a través de carro-tanques por la malla vial del departamento, incrementando el riesgo latente de derrames de hidrocarburos o derivados que causen alteraciones a las comunidades aledañas y al medio biótico que la compone. (Cipirán, *et al*; 2015).

El transporte de carga es una actividad importante y responsable del crecimiento de la economía del país, tan solo en el 2013 aportó el 3,1 % del PIB; presentando un aumento en el segundo trimestre del 2014 en 14,7 % respecto al mismo periodo de 2013 (Cámara de comercio de Bogotá, 2017). Según la Agencia Nacional de Seguridad Vial (ANSV) para el 2016 en Colombia se registraron 534 accidentes diarios (ANSV, 2016); según Martínez, *et al* (2011), los derrames de crudo de petróleo y derivados ocuparon los primeros lugares en el país; por tanto, es primordial que se realicen estudios que permitan obtener información base en una de las regiones

ambientalmente más sensible de Colombia (los llanos orientales), de acuerdo con lo expuesto por la política ambiental para la protección de los recursos ecosistémicos.

Debido al aumento del empleo de combustibles y productos derivados de hidrocarburos de petróleo, la contaminación ha sido de igual manera, significativa (Benavides, 2006). Los elevados niveles de carbonos presentes en los hidrocarburos, como el diésel (gasóleo) con rangos entre 10 a 25 átomos carbono, con mixturas complejas de alcanos cíclicos, normales y ramificados, compuestos aromáticos (1,3 butadieno, benceno, aldehídos y cetonas), partículas (constituidas de hidrocarburos aromáticos policíclicos, sulfatos y trazas de elementos), ocasionan alteraciones en flora, fauna y biota, debido a que la matriz suelos presenta variabilidad en la absorción de los contaminantes; aunado a esto, las distintas variables climáticas y características del terreno, ocasionando cambios en la actividad química, biodisponibilidad y toxicidad de los xenobióticos. (Pastor, 1930; Calao, 2007).

El desequilibrio en la matriz ocasionado por el aumento de carbonos, perturba el balance natural de nutrientes en el sistema, en algunos casos reduciendo o deteniendo el crecimiento de bacterias y hongos o incrementando la actividad de algunos y eliminando a otros, por tanto, se han realizado estudios para dilucidar el destino de microorganismos (como agentes primarios de degradación) y xenobióticos, denominado biorremediación. (Martínez, et al, 2001, Cando, 2011, Martínez, et al, 2018).

Las técnicas biológicas para la recuperación de sitios contaminados, se desarrollaron hace un par de décadas, sobre todo a escala piloto, aunque en los últimos años han incrementado su uso a escala comercial, tanto en el caso de suelos contaminados como en el caso de aguas o efluentes (Martínez, *et al*, 1980).

Debido a la elevada importancia; de dilucidar la presencia y comportamiento de microorganismos celulolíticos o con características enzimáticas capaces de degradar una de las estructuras químicas de mayor complejidad y abundante de la naturaleza, como la celulosa (Dávila, 2006), es primordial estudiar la relación que existe entre la actividad microbiológica, las características fisicoquímicas del suelo y las distintas concentraciones de Diésel en un terreno

con vocación agrícola, para establecer los cambios en el potencial enzimático, se planteó la siguiente pregunta de investigación:

¿Cómo varían las correlaciones entre las distintas concentraciones de Diésel y la presencia de bacterias y hongos con actividad celulolítica, para determinar el potencial enzimático, en suelos de vocación agrícola extraído de predios de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía, en un periodo de cuatro meses?

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

O.G. Caracterizar el potencial celulolítico por bacterias y hongos a diferentes concentraciones de diésel de un suelo disturbado tomado de predios de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía.

1.2.2. Objetivos específicos

O.E.1. Identificar bacterias y hongos con actividad celulolítica a partir de una muestra de suelo contaminado con Diésel a diferentes concentraciones (2,5 g/kg, 6,1 g/kg y 9,8 g/kg) de suelo extraído de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía.

O.E.2. Determinar la viabilidad mediante la actividad celulolítica de las bacterias y hongos aislados de un tratamiento experimental utilizando Diésel, a una concentración de (2,5 g/kg, 6,1 g/kg y 9,8 g/kg).

O.E.3. Correlacionar los resultados obtenidos para determinar el potencial celulolítico de suelos del piedemonte llanero contaminados con diésel.

1.3. Justificación

El suelo del piedemonte llanero posee una extensión de 653197,138157 ha, en la que se compone el departamento del Meta con un área 8548140,14847 ha, de la cual se presenta una extensión de la frontera agrícola nacional de 4,423,365 ha, que equivale al 51,7% de su territorio, siendo los cultivos de arroz, piña, cacao, palma de aceite, pastizales y demás; sufriendo grandes presiones por ser intervenidos por asentamientos urbanos y rurales (MADR-UPRA, 2018).

Según Hugar, et al. (2005), el suelo es el organizador central de los ecosistemas terrestres en el cual los minerales, la materia orgánica y microorganismos son sus principales componentes sólidos, y no son entidades separadas sino que interactúan entre ellos controlando reacciones biogeoquímicas como la formación de óxidos metálicos, la catalización de la formación de sustancias húmicas, la estabilidad y actividad enzimáticas, la transformación de minerales, los ciclos del Carbono, Nitrógeno, Fósforo y Azufre y la transformación y destino de contaminantes.

Los derrames por hidrocarburos del petróleo y sus derivados, son ocasionados por accidentes e incidentes en el transporte en Colombia por vía terrestre, las consecuencias, debido a la variada composición química de los hidrocarburos de petróleo (compuestos saturados, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos asfálticos y resinas), pueden ser de difícil degradación y fácilmente acumulables en el ambiente durante años; uno de los más afectados es el recurso suelo, ya que causan cambios drásticos en las características naturales generando un sin número de desequilibrios.

Siendo los microorganismos, capaces de fijar más del 95 % del nitrógeno y del azufre y solubilizando entre 20 y 90 % del fósforo en suelo, son actores clave en la nutrición vegetal (Haider, 2002), es decir, la microbiota rizosférica, aporta en la germinación de las semillas, inducen a un mayor crecimiento de las plantas y floración, mejoran la calidad de los suelos y reducen la dependencia a fertilizantes minerales (Jaramillo, 2002). Por tanto, aportan a la producción de alimentos, ácidos orgánicos, azúcares fermentables, etanol, bebidas, textiles, detergentes, papel, pulpa y tintas de papel (R. V. C., 2015), participando, además, en la transformación de materiales celulolíticos a etanol y ácidos orgánicos en detergentes. (Kuhad, et al 2011) (Schwarz, 2002) (Duhalt, 2006).

Es decir, para mejorar la calidad del suelo y la disponibilidad de los nutrientes, los microorganismos celulolíticos son capaces de difíciles degradaciones, como la que logran a partir de celulosa, hemicelulosa y lignina, consiguiendo mineralizar estos compuestos e incluyendo los mismos en los ciclos biogeoquímicos del suelo (Arrom, et al; 2018).

Entre los grupos microbianos, los hongos forman un papel fundamental puesto que son los organismos responsables de transformar alrededor del 80% de la celulosa que se produce y ésta es la mayor reserva de carbono en el mundo y el polisacárido más abundante en la naturaleza (Pontón, 2008). Además, la microbiota en el suelo es muy numerosa (entre 10^8 y 10^9 células. g⁻¹ de suelo) y más pequeños (0.2 a 2 μ m de diámetro y 1 a 10 μ m de largo) (Sylvia, et al., 2005). Entre estas, se encuentran las bacterias celulolíticas: *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Streptomyces* y hongos como *Sclerotium* sp., *Aspergillus* sp., *Achlya* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp. (Gaitán & Pérez, 2007), (Cerde, 2016).

Si bien la importancia de los microorganismos celulolíticos es alta para el desarrollo de la producción de la vida en el planeta, son pocos los estudios experimentales o información al público disponible que se tiene de éstos en suelos del Piedemonte Llanero del departamento del Meta, más aún cuando tales suelos han sufrido vertimientos de hidrocarburos derivados del petróleo, como el diésel.

Además, como parte del plan de desarrollo actual del gobierno, el centro de Investigación y Estudios de Biodiversidad y Recursos Genéticos (CIEBREG) del instituto Alexander Von Humboldt, busca “caracterizar, evaluar y monitorear la biodiversidad en paisajes naturales asociada a sistemas productivos para el mantenimiento de la funcionalidad ecológica” (Rodríguez, 2007).

De tal manera, se plantea el diseño experimental de un aislamiento e identificación de especies de microorganismos (bacterias y hongos) degradadores de celulosa, a partir de suelo no perturbado con hidrocarburos de vocación agrícola y disturbado de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía del municipio de Cumaral - Meta, contaminado artificialmente con Diésel a distintas concentraciones.

1.4. Alcance

1.4.1. Población

Los actores beneficiados por el proyecto son las instituciones gubernamentales, entidades territoriales usuarios individuales y la academia, Organizaciones públicas y privadas, Corporaciones Autónomas Regionales (CAR's) y la Institución Educativa Agrícola de Guacavía, siendo, además, un insumo para el 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 Fondo de Investigación Interna de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio.

1.4.2. Espacial

El área donde se ubicó el sitio de muestreo correspondió a predios de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía en el municipio de Cumaral – Meta (Anexo 1); el cual se encuentra dentro de los suelos catalogado como frontera Agrícola nacional (Anexo 2).

1.4.3. Temporal

El presente trabajo se desarrolló en un período de 4 meses, donde se realizaron análisis del suelo obtenido de predios de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía obtenido como resultado el potencial celulolítico de bacterias y hongos a diferentes concentraciones de Diésel.

1.5. Hipótesis nula

“En un suelo con vocación agrícola existen bacterias y hongos con actividad celulolítica las cuales reducen su actividad enzimática entre mayor sea la concentración de diésel en el área.”

2. Capítulo II

2.1. Antecedentes.

Con el propósito de determinar la tendencia en las publicaciones de artículos acerca del potencial biodegradador de bacterias y hongos celulolíticos aislados en suelos contaminados por diésel en el piedemonte llanero, se realizó la vigilancia tecnológica (Anexo 3). Con base en la búsqueda de indicadores cuantitativos de la producción científica acerca de (“biodegradable potential” “cellulolytic bacteria” “cellulolytic fungi” “soil” “diesel”), obtenidos de la base de datos de Scopus (Elsevier, b.v. 2019), Scintist Direct. A partir del comando de búsqueda (palabras clave) empleado para la realización de la vigilancia tecnológica, se obtuvo como resultado un registro de 24 artículos científicos publicados a nivel mundial correspondientes a las palabras de búsqueda.

En la figura 1, se presenta la dinámica científica de la producción de artículos relacionados con el tema de estudio durante el primer periodo de 1997 al 2019, utilizando los 5 descriptores. En esta se puede apreciar que la máxima cantidad alcanzada en publicaciones fue en el periodo 2009, donde se publicaron 5 artículos, En lo que ha transcurrido del 2019, se tiene registro de una publicación (artículos).

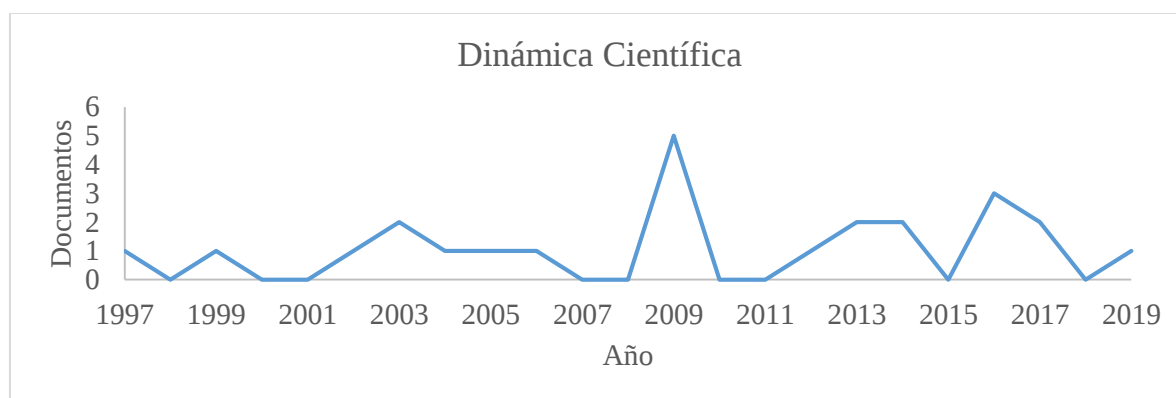


Figura 1. Cantidad de artículos científicos publicados por año en la base de datos Scopus con las palabras clave. Adaptado de “Scopus”, por Salinas J, 2019.

Posteriormente, se presenta un ranking de los 10 principales países con mayor número de publicaciones o artículos científicos divulgados en torno al comando de búsqueda; Estados

Unidos (3), Bélgica (2), Alemania (2), Nigeria (2), Polonia (2), Federación Rusa (2), Corea del Sur (2), Taiwán (2), Canadá (2) y Brasil (2).

En Colombia no se presenta ningún tipo de aporte científico en relación a las cinco palabras utilizadas como método de búsqueda; de allí la importancia del presente proyecto, buscando aportar información base, acerca del potencial biodegradador de bacterias y hongos celulolíticos aislados en suelos no perturbado y disturbados con hidrocarburos del piedemonte llanero contaminados artificialmente a distintas concentraciones de diésel.

2.2. Marco teórico

2.2.1. Hidrocarburos derivados del petróleo.

La refinación de petróleo es un eslabón único y fundamental de la cadena de suministro de petróleo, (extracción del petróleo crudo a la superficie, transferencia desde el yacimiento petrolífero a los depósitos y luego a las refinerías, traslado de los productos refinados desde las refinerías a las terminales de despacho e instalaciones de productos de consumo final, etc.) (ICCT, 2011).

Los productos derivados de la destilación y refinación de crudo de petróleo, tales como: Gasolina, diésel, nafta, gas licuado de petróleo (GLP), queroseno y demás. Son obtenidos a través de la torre de refinación mediante una serie de puntos de fusión determinados por la cantidad de carbono; los más ligeros como la nafta se evaporan a menor temperatura (70°C); en cambio, combustibles como el diésel se evapora a una temperatura entre los 200°C y 360°C. (CONUEE, *et al*; 1983).

Entre los subproductos mencionados, los combustibles para transporte son los de mayor valor, mientras que los aceites combustibles y el asfalto son menores. La mayoría de las centrales de refinación actuales, están diseñadas para maximizar la producción de destilado (combustible diésel y pesado), debido a que se ha registrado un crecimiento acelerado de la demanda de estos productos en la mayoría de las regiones del mundo (ICCT, 2011).

2.2.2. Diésel.

Ecopetrol presentó ventas de combustibles refinados del orden de 2.906 millones de galones por año, en cifras del 2008, de las cuales el 72% corresponde a las gasolinas y los diéseles que se consumen en el transporte nacional, excluyendo el gas natural. (Arango, 2009); durante el año 2012, informó ventas promedio de 76.974 barriles por día de gasolina motor y 110.746 barriles por día de diésel. Estas cifras son superiores en un 3,3% para la gasolina motor y en un 1,6% para el diésel con respecto a los promedios presentados durante el año 2011 (MinMinas; 2012, pág. 36).

De acuerdo con el Decreto 1471 de 2014; estos subproductos derivados del crudo de petróleo están diseñados como combustibles para motores de combustión interna; para efecto del presente Decreto se entienden como combustibles básicos la gasolina corriente, la gasolina extra, el diésel corriente y el diésel extra o de bajo azufre (Decreto 1471 de 2014, art. 7° numeral 15°).

Siendo, el ACPM o diésel una mezcla de hidrocarburos entre diez y veintiocho átomos de carbono que se utiliza como combustible de motores diésel y se obtiene por destilación directa del petróleo (Decreto 4299 de 2005, art. 3)

2.2.3. Vertimientos o derrames de diésel.

Algunos productos derivados del hidrocarburo como el diésel son una de las sustancias potencialmente contaminantes más importantes, por su abundancia, por su distribución espacial en entornos urbanos y por su perseverancia en distintos sectores ambientales (Torres, *et al*; 2009). Dicha sustancia al ser liberadas en el agua flota y se separa; aunque resulta ser muy poco soluble en agua, los componentes solubles se disuelven y dispersa. En la matriz suelo y sedimentos, bajo condiciones aeróbicas, la mayoría de los componentes del gasóleo están sujetos a procesos de biodegradación, siendo en condiciones anaerobias más persistente (Betancur, 2013).

Según reportes presentados por CORMACARENA en un convenio realizado con Ecopetrol S.A; se elabora una base de datos en la cual se evidencian algunos incidentes presentados en la vía ya sea por volcamientos, ineficiencia en los equipos, fallas, fugas, entre otros (Anexo 4).

2.2.4. Piedemonte Llanero.

El paisaje de piedemonte llanero es una franja de terreno que constituye la zona de transición entre los departamentos del Meta y Casare, Ubicada dentro de la vertiente de la cordillera Oriental y la llanura. Poseen alturas que van desde los 200 y los 700 m.s.n.m. El piedemonte acumula los mejores suelos por ser menos propensos a inundaciones y por la acumulación de nutrientes provenientes de la parte altas de la cordillera, componiendo uno de los hábitats más fértiles y con mayor precipitación durante la época seca de los llanos; la mayoría de las precipitaciones se presentan en las zonas de piedemonte con valores que oscilan entre los 3500 y los 4500 mm anuales hacia el sureste del departamento (Anexo 5). Caracterizándose un régimen pluviométrico bimodal, es decir, que se presenta un periodo de intensas lluvias y otro de escasas precipitaciones. El periodo seco va del mes de diciembre a marzo, siendo enero el mes de menos lluvias (Anexo 6). La temperatura promedio mensual se encuentra en un rango de 27 °C alcanzando su menor valor en las zonas de piedemonte y el máximo en las zonas de llanura. La humedad relativa varía entre 60 y 90% presentándose el menor porcentaje en la temporada seca. (Zorro, 2007).

2.2.5. Piedemonte llanero en el departamento del Meta.

El Piedemonte llanero hace parte del 51,7% de suelos con capacidad agropecuaria, destacándose como una de las principales actividades económicas del departamento; los principales cultivos son arroz, palma africana, plátano, maíz, cacao, cítricos y otros frutales (IGAC, 2016). A lo largo del piedemonte, habitan la mayor parte de la población, según proyecciones hechas por el Departamento Administrativo Nacional de Estadística, DANE; para el año 1993, la población fue estimada en 979.710 habitantes, distribuidos en municipios. Para el año 2016; se informó 495.227 habitantes en Villavicencio (Proyecciones de población DANE, 2014).

2.3. Marco conceptual

2.3.1. Celulasas.

La celulosa es abundante en los árboles y en el algodón. Las frutas y los vegetales contienen pequeñas cantidades de celulosa que tiene un papel estructural en las células. Es todavía objeto de controversia si las celulasas son importantes en el ablandamiento vainas de arvenses. Hay abundante información disponible sobre celulasas microbianas por su importancia potencial para convertir desechos celulósicos insolubles en glucosa (Whitaker; 1986).

2.3.2. Celulosa.

Es un importante constituyente de las plantas superiores ya que proporciona su estructura (figura 2) y probablemente es, el compuesto orgánico más abundante en la naturaleza, cerca del 40 - 60% de la hidrólisis de este carbohidrato es realizado por microorganismos del suelo, denominados celulolíticos (Atlas R, 2002).

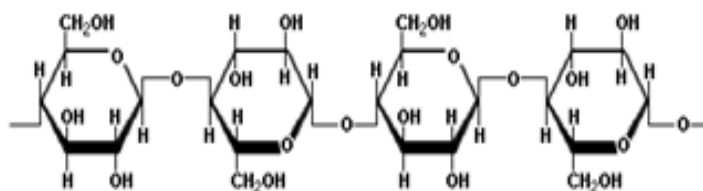


Figura 2. Estructura química de la celulosa. Por Scientific Psychic, 2017

2.3.3. Microorganismos con actividad celulolítica.

Los microorganismos celulolíticos, están conformados por una comunidad compleja (hongos filamentosos, bacterias, actinomicetos, entre otros), los hongos son los principales causantes de la degradación de la celulosa en suelos húmedos, caso contrario de las bacterias, las cuales realizan una mejor labor en suelos semiáridos. Los basidiomicetos celulolíticos son especialmente importantes en la degradación de la celulosa, pero estos microorganismos reciben una escasa atención en los procesos investigativos, debido a que no se desarrollan en medios de cultivo convencionales (Martínez, *et al*, 2001).

La microbiota con enzimas celulasas, aportan fuentes de carbono a microorganismos fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fósforo de las cuales dicha reacción enzimática celulolítica permite que la transformación tome lugar en hábitats con o sin O₂, en pH ácido o alcalino, niveles altos o bajos de humedad y temperatura (psicrófilos hasta termófilos). (Martin, 1980), formar agregados, quelatos, generando cargas negativas aumentando la capacidad de intercambio catiónico (C.I.C), el cual contribuye en la formación del horizonte A (Primavesi, 1984).

Los suelos contaminados por hidrocarburos o derivados, eliminan la diversidad microbiana y permiten la proliferación de ciertos organismos específicos, un 1% de la población total de aproximadamente $10^4 - 10^6$ células por gramo de suelo contaminado por hidrocarburos (Compeau, *et al*, 1997).

Los cambios en el número de células de la microbiota por unidad de volumen son indicadores de modificaciones en el contenido de materia orgánica del suelo (Lynd, *et al*, 2002), causando afectaciones en el crecimiento y metabolismo de los microorganismos y/o afectando al compuesto xenobiótico (Boldu, *et al*; 2002).

Halden, *et al*; (1999) demostraron la eficiencia de bacterias del género *Pseudomonas* sp. en la degradación del ácido 3-Phenoxybenzoico en suelos. Este experimento sirvió también para evaluar el papel biodegradativo de dos cepas de *Pseudomonas* sp. que habían sido manipuladas genéticamente. Las bacterias resultaron ser efectivas en todos los casos; sin embargo, las bacterias modificadas genéticamente tuvieron una mayor capacidad para sobrevivir a factores ambientales adversos. Este resultado es alentador, dado que uno de los factores que muchas veces impide la biorremediación de suelos *in situ* son las condiciones ambientales desfavorables para el crecimiento bacteriano. (Halden, 1999).

Adicional a la capacidad de producción de celulasas, los hongos y bacterias en suelo, también han sido evaluados para la degradación de hidrocarburos. Boldu, Vervoort, Grontehuis, & Van Grienestijn, (2002) estudiaron el papel del hongo *Cladophialophora* sp. sobre la degradación de benceno, tolueno, etilbenzeno y xileno, siendo capaz los compuestos alcalinizados (tolueno, etilbenzeno y xileno), a excepción del benceno (Pueyo, 2002).

2.3.4. Institución Educativa Agrícola de Guacavía en Cumaral – Meta.

La Institución Educativa Agrícola de Guacavía (Anexo 7), ubicada en coordenadas 4°15'5.08"N y 73°19'59.72"O del municipio de Cumaral (Meta) (Anexo 8). Es una Institución pública, en la cual permanece una población de cerca de 200 personas entre personal directivo, administrativo, profesores y estudiantes de primaria y secundaria, quienes realizan labores de formación académica a través de actividades agropecuarias y en donde, la USTA sede Villavicencio, ha focalizado las labores de Responsabilidad Social Universitaria.

2.4. Marco legal

2.4.1. Constitución Política de Colombia 1991

“En el artículo 80 de la Constitución política, se le otorga al Estado la obligación de planificar el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución; además de esto, deberá prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental, imponer las sanciones legales y exigir la reparación de los daños causados” (Alcaldía de Bogotá, 1991).

Para el resto del documento normativo se presenta que con lo cual se rige y se reglamentan los derechos y normas ambientales contenidas en el marco jurídico de la constitución política colombiana y sus convenios internacionales en relación al tema de investigación, teniendo en cuenta que, así como la ley, la normatividad ambiental no es rígida sino cambiante, se propone manejar las normas citadas a manera de anexo normativo (Anexo 9).

3. Capítulo III

3.1. Metodología.

La presente investigación se enmarco en un estudio experimental, con enfoque cuantitativo en el que se registra la manipulación de algunas variables a estudiar o las muestras de suelo que representan las características de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía. Como material de diseño se establece la variación en las concentraciones de diésel con las concentraciones de carboximetilcelulosa -CMC-.

3.1.1. Etapas metodológicas.

Con el fin de llevar acabo el cumplimiento de los objetivos, se presenta en la tabla 1 las etapas que comprenden la secuencia de actividades propuestas para desarrollar la solución de la problemática de investigación.

Tabla 1.
Distribución metodológica.

ETAPAS		
ETAPA 1 <u>Actividad 1</u>	ETAPA 2 <u>Actividad 2</u>	ETAPA 3 <u>Actividad 3</u>
Extracción de la muestra de suelo requerida para el desarrollo de la investigación en el Institución Educativa Agrícola de Guacavía.	Muestreo mensual durante un periodo de 4 meses, del suelo contaminado artificialmente con Diésel a diferentes concentraciones por triplicado en controles y en suelo sin contaminar.	Recopilación de la información primaria y secundaria (actividad 1 y 2).
<u>Actividad 1.1</u>	<u>Actividad 1.1</u>	<u>Actividad 1.1</u>
Se disponen las muestras de suelo en los bio-tratamientos situados ex-Situ en el laboratorio de Toxicología de la Universidad Santo Tomás – Villavicencio.	Procesamiento en laboratorio: • Determinación de parámetros físicos. • Determinación de parámetros químicos (medida de la concentración de materia orgánica, cuenta de cantidad de carbono) • Microbiología –aislamiento de bacterias y hongos con capacidad celulolítica (Productores celulosa), recuento y potencial celulolítico del suelo contaminado con diésel.	Análisis de los resultados obtenidos.

Nota. Distribución metodológica. Por José Salinas, 2018.

3.1.2. Materiales y métodos.

3.1.2.1. Etapa 1: Extracción y disposición de las muestras.

La zona seleccionada para el proceso de muestreo corresponde a las coordenadas 4°17'16.14"N Y 73°31'19.48"O, perteneciente al lote N°1 de las inmediaciones de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía, la cual se encuentra adecuada para el cultivo, la ubicación del muestreo se realizó siguiendo los criterios de la NTC 4113-4/2004. Posteriormente, se siguieron los criterios establecidos por la NTC 4113-2/1997, para llevar a cabo la obtención de la muestra mediante un sistema aleatorio de tipo zig-zag, en suelo disturbado tomando en cada punto una muestra compuesta (sub-muestra) a 20 cm de profundidad, perteneciente al horizonte A, y mezclada, para mantener una muestra homogénea del terreno (figura 3).

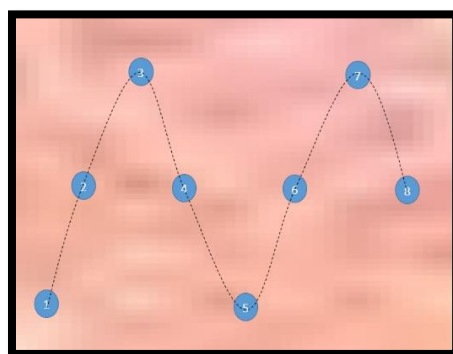


Figura 3. Sistema aleatorio tipo Zig-Zag. Adaptado de “NTC 4113-2/1997”. Por Salinas J, 2018.

Según lo establecido por la NTC 4113-6/1997; se procedió a la recolección de las muestras de suelo, depositadas en bolsas plásticas (figura 4) previamente rotuladas; y posteriormente se trasladó al laboratorio de Biología y Microbiología Ambiental de la Universidad Santo Tomás, en donde se les retiró la humedad a temperatura ambiente, se tamizó a través de 0,2 mm de diámetro (figura 5), se mezcló y luego se acomodó en recipientes cada uno con 7 kg de suelo (control biótico y diferentes concentraciones de Diésel (Tabla 2)) por triplicado (figura 6 y 7) y dispuestos en el laboratorio de Toxicología Ambiental (figura 8). Adicionando las diferentes concentraciones de diésel, cantidades determinadas a partir de estudios previos (Ramírez, et al 2013, Carrillo, et al, 2015, Torrez, et al).

Tabla 2.

Tratamientos de control.

Tratamientos por triplicado (7 kg suelo)	Diésel (g/kg)
Control –R0–	0
R1	2,5
R2	6,1
R3	9,8

Nota. Concentraciones implementadas. Por Salinas J, 2018.



Figura 4. Extracción de la muestra (1 ha por 1 muestra). Adaptado de “NTC 4113-6/1997”. Por Quiroz, 2018.



Figura 5. Tamizaje a través de 0,2 mm. Por Méndez A, 2018.



Figura 6. Contaminación de Diésel a diferentes concentraciones. Por Salinas J, 2018.



Figura 7. Tratamientos contaminados con Diésel. Por Salinas J, 2018.



Figura 8. Ubicación de los tratamientos contaminados en el laboratorio de Toxicología Ambiental. Por Salinas J, 2018.

3.1.2.2. Etapa 2: Muestreo y procesamiento en laboratorio.

Los tiempos de muestreo fueron; el tiempo cero, luego de 24 horas de aplicado el contaminante y cada 30 días durante los 4 meses de duración del estudio, para evaluar el comportamiento de los suelos en los bio-tratamientos.

Los parámetros físicos tales como la densidad real (método del picnómetro), densidad aparente (método del cilindro), libro de color del suelo Munsell, dispersión de la textura, floculación de suelo, textura mediante el test textural por sedimentación y demás resultados obtenidos fueron hallados siguiendo el manual de prácticas de campo y de laboratorio de suelos del Centro Agropecuario “La Granja” Regional Tolima Sena; los cuales se procesaron en las instalaciones del laboratorio de suelos de la Universidad Santo Tomás (Tabla 3).

Tabla 3.

Parámetros físicos procesado en el laboratorio de Suelos de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio.

Parámetro	Unidad	Método
Textura	%	Sedimentación
Densidad aparente	%	Manual de prácticas de campo y del laboratorio de suelos
Densidad real	%	Manual de prácticas de campo y del laboratorio de suelos
Porosidad	%	Manual de prácticas de campo y del laboratorio de suelos
%Agua	%	Manual de prácticas de campo y del laboratorio de suelos
%Aire	%	Manual de prácticas de campo y del laboratorio de suelos
Color	Espectro	Munsell soil color book

Nota. Datos físicos preliminares. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Cesar Riveros y José Salinas, 2018.

Para la obtención de los parámetros químicos, se obtuvo los resultados del macro proyectó de investigación entre los que se encuentran los enviados al laboratorio de Tecno Ambiental S.A.S. (Asesoría y laboratorio) para obtener las trazas de hidrocarburos totales presentes en las muestras de suelo que fueron contaminadas con las distintas concentraciones de diésel en los bio-tratamientos. Mediante el método reglamentado EPA 9071 B S-M 5520 DM; cual posee un límite de detección del 0,001% preservante HCl (Tabla 4). Los demás parámetros químicos se obtienen mediante una serie de métodos presentados en el anexo 10, éstos fueron procesados por el laboratorio de suelos de Agrosavia en Mosquera-Cundinamarca.

Tabla 4.

Parámetro obtenido por el laboratorio de Tecno Ambiental S.A.S.

Parámetro	Unidad	Método
Hidrocarburos Totales (TPH)	%	Ultrasonido_NMX-AA-145_SCFI-2008_IR_SM_5520C.F

Nota. Parámetros, unidades y método implementado por Tecno Ambiental para la obtención de TPH. Por TecnoAmbiental S.A.S, 2018.

Para la obtención de los datos microbiológicos se realizó el proceso de aislamiento primario de las bacterias y hongos con actividad celulolítica siguiendo las recomendaciones establecidas por la NTC 4092/2009; en la que se tomó una muestra de 10 gramos de suelo y se adicionó en un frasco tapa rosca con 90 mL de solución salina al 0,85% (material esterilizado en autoclave (JEIOTECH®- ST-G), homogeneizado durante 30 min (figura 9); en un agitador orbital (Thermo

Scientific®-C16641301); luego se realizaron las diluciones (de 10^{-0} a 10^{-6}) (Figura 10), de los diferentes sustratos por triplicado; a partir de éstas se siembra en superficie con espátula digralsky en medio de cultivo agar CMC, compuesto por los siguientes elementos en un soluto de agua destilada de 1000 mL se incorporan: (NH_2SO_4 (Sulfato de amonio) 0,5 g, CaCl_2 (Cloruro de calcio) 0,5 g) (EMERSURE®- VMB16426 737, AM 1046617 725), KH_2PO_4 (fosfato de potasio monobásico) 0,1 g (Acrós organics®-378610010-), K_2HPO_4 (fosfato de potasio dibásico) 0,1 g (Biopack®-7758-11-4), Carboximetilcelulosa 10 g (Alfa Aesar® -A18105-), Agar-Agar 15 g (SIGMA-ALDRICH® -05040-1KG) (tabla 5). (NTC 4092; 2016).



Figura 9. Muestra en el agitador orbital durante 30 min. Por Salinas J, 2018.

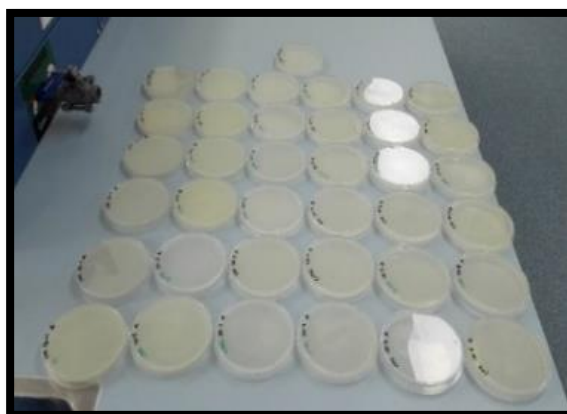


Figura 10. Diluciones en Cajas de Petri. Por Salinas J, 2018.

Tabla 5.

Reactivos del medio de cultivo CMC (P/V).

Reactivos	Unidades	Cantidad
Agua Destilada	mL	1000
Extracto de levadura	g	2.5
NH ₂ SO ₄ (Sulfato de amonio)	g	0.5
CaCl ₂ (Cloruro de calcio)	g	0.5
KH ₂ PO ₄ (Fosfato de potasio monobásico)	g	0.1
K ₂ HPO ₄ (Fosfato de potasio monobásico)	g	0.1
Carboximetil-Celulosa (CMC)	g	10
Agar-agar	g	15

Nota. Reactivos implementados para la preparación del medio CMC Agar. Por José Salinas, 2018.

Las cajas fueron incubadas a 25°C por 48 horas (TermoFisher scientific® – Precisión) según recomendaciones bibliográficas y una vez transcurrido este tiempo de incubación se adiciona una solución de rojo congó al 1% p/v, el cual es implementado como agente revelador de las colonias presentes en los medios con capacidad celulolítica, luego de transcurrido quince minutos se retira la solución y se le adiciona solución salina 20% durante quince minuto; una vez transcurrido el tiempo es retirado el exceso y se informa el recuento de unidades formadoras de colonia de microorganismos con capacidad celulolíticos por dilución (Teather y wood, 1982); a las que se les realizó pases sucesivos en Agar CMC al 1% a aquellas que presentaron un mayor diámetro en el halo de hidrolisis, a los cuales se les hace:

3.1.2.2.1. *Identificación estructural y bioquímica.*

Se efectúa la identificación por descripción macroscópica de las cepas microbiana y microbiología por morfología a las bacterias mediante tinción de Gram y pruebas bioquímicas tradicionales (oxidasa, citrato, manitol, TSI Y LIA); y para las cepas de hongos filamentosos se identificó mediante tinción con azul de lactofenol.

3.1.2.2.2. *Prueba de potenciales en agar CMC.*

Paras las cepas de cultivo puro obtenidas que presentaron un mayor diámetro en su halo de hidrolisis, se realizó una concentración del cultivo similar al tubo 0.5 de la escala de McFarland (TermoFisher scientific® –Remel r20410), para mantener una concentración de las colonias, posteriormente se efectuó siembra en superficie en Agar CMC al 0.5%, 1% y 2%, utilizando la

espátula digralsky y llevando a incubar a 35°C por 48 horas para bacterias y a temperatura ambiente durante 72 horas para hongos; finalmente se procedió nuevamente a revelar los halos de hidrolisis con rojo congó y medir en milímetros desde el borde externo de la colonia hasta el borde revelado por la hidrolisis (Figura 11).

Después de la incubación, medir los diámetros de las zonas de inhibición o halos, aproximar al mm más cercano. Los márgenes de la zona deben leerse como el área que no muestra un crecimiento evidente detectado a simple vista.

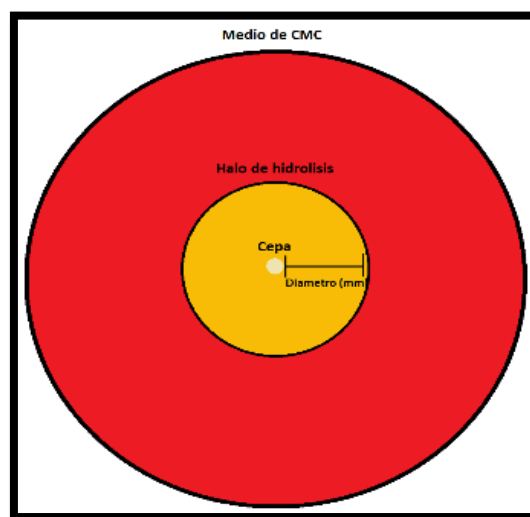


Figura 11. Medición del diámetro de halo. Por José Salinas, 2018.

3.1.2.3. Etapa 3: Análisis de los datos.

3.1.2.3.1. Índice de correlación de Pearson.

Con la finalidad de complementar el análisis de la actividad enzimática se aplicó el coeficiente de correlación de Pearson, el cual es un estadístico que proporciona información sobre la relación lineal existente entre dos variables. Esta información se refiere a dos características de la relación lineal: la dirección o sentido y la cercanía o fuerza. Debido a esto, muchas veces el coeficiente de correlación se define de tal manera como un instrumento estadístico que permite medir el grado de asociación lineal entre dos variables (Medina, et al; 2018).

Este coeficiente se aplicó para los resultados de las propiedades, cantidad de UFC y el diámetro de halo presentes para así, observar los potenciales enzimáticos de las cepas obtenidas de los suelos afectados por el diésel a diferentes concentraciones de CMC.

3.1.2.3.2. *Análisis estadísticos.*

A partir de los datos obtenidos de los procesos microbiológicos, se pudo identificar la cantidad de microorganismos presentes en un suelo sin contaminar y en suelos contaminados con distintas concentraciones de Diésel. Luego, se procedió a evaluar la actividad enzimática mediante un análisis de varianza paramétrico, la cual permite determinar por correlación las variables de temperatura, humedad, físicas, químicas y microbiológicas. Así mismo, para verificar la significancia estadística entre las variables medidas se realiza una correlación de Pearson a través del software *SPSS*.

En donde el rango de +1 presenta que una relación lineal directa perfecta (positiva) entre las dos variables, el 0 se interpreta como la no existencia de una correlación lineal entre las dos variables estudiadas y -1 significa que existe una relación lineal inversa perfecta entre las dos variables; junto con la representación gráfica de la tendencia lineal del índice de Pearson, obtenido a partir de cada una de las cepas bacterianas, inoculadas en medios de cultivo Carboximetilcelulosa al 0,5, 1 y 2%, versus su potencial celulolítico; con una proporción adimensional de sus valores expresado de menor a mayor (0, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 3 y 3,5).

4. Capítulo IV.

4.1. Resultados y análisis

La determinación de textura del suelo proporcionado en el estudio fue determinada por el método de sedimentación de sustrato en el que se determinaron los valores de arena, limo y arcilla; presentes en la tabla 6. Al cotejar los valores presentes con el triángulo textural se asimila a una clase textural de tipo Franco arcilloso arenoso (francos con textura moderadamente fina) con una simbología FArA; los cuales presentan valores entre Arenoso 45–80%, limoso 0-28% y arcilloso 20-35% (FAO-Roma; 2009).

Tabla 6.
Porcentaje textural.

Capas	Medidas	%
Limo		2,73
Arcilla	2.0	22.72
Arena	7.0	74.55

Nota. Datos del porcentaje de sustrato que compone el suelo. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

En la tabla 7, se presentan los datos físicos preliminares obtenidos del suelo extraído de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía; procesados en el laboratorio de suelos de la universidad Santo Tomás. Los cuales fueron utilizados para hallar los valores de máximo, mínimo, varianza, entre otros datos estadísticos presentes en la tabla 8.

Este tipo de suelo presenta un porcentaje de porosidad del 51,571%, con una densidad aparente del 1,105 y densidad real del 2,811, que se asocia al tipo encontrado, caracterizándose por tener una calificación satisfactoria, además esta relación textural confiere al suelo resistencia a la compactación, adsorción rápida de agua, generalmente posee un adecuado drenaje. Como desventaja, posee una baja capacidad en la retención de agua, por tanto, tienen alta pérdida de nutrientes por lixiviación (Medina); dicha particularidad de lixiviación no se cumple en el presente estudio dado que se las variables ambientales como temperatura y humedad fueron controladas en bio-tratamientos de manera Ex – Situ. Según los valores presentes en el porcentaje aire 37,937% y agua 27,445%; indica buena aireación, buen drenaje, intensa meteorización.

Tabla 7.

Resultados físicos preliminares.

Repetición	Da	Dr	P	%Agua	%Aire
1	1,04	2,28	54,57	30,03	36,99
2	1,12	2,31	51,34	24,86	36,99
3	1,03	2,24	54,24	27,05	42,86
4	1,24	2,29	46,13	27,84	38,89

Nota. Datos físicos preliminares de Densidad Aparente (Da), Densidad Real (Dr), Porosidad (p) Agua% y Aire%. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Cesar Riveros y José Salinas, 2018.

Tabla 8.

Resultados físicos del terreno de donde se extrajo la muestra.

Sitio de Muestreo	Densidad Aparente	Densidad Real	Porosidad	%Agua	%Aire
N	4	4	4	4	4
% de N total	30,8%	30,8%	30,8%	30,8%	30,8%
Media	1,1051	2,2811	51,5710	27,4432	38,9297
Mediana	1,0794	2,2861	52,7897	27,4447	37,9376
Máximo	1,24	2,31	54,57	30,03	42,86
Mínimo	1,03	2,24	46,13	24,86	36,99
Varianza	0,009	0,001	15,259	4,553	7,660
Desviación estándar	0,09691	0,02735	3,90633	2,13367	2,76767

Nota. Parámetros físicos del terreno. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Cesar Riveros, 2018.

Según los valores correspondientes hallados en el libro Munsell (figura 12), se asocia a una coloración gris marrón [5YR 4/4], indicativo que el estado del suelo se encuentra en unos niveles iniciales o intermedios de alteración; lo cual se asocia a niveles medios bajos presentados de materia orgánica, ácida parcialmente descompuesta y combinaciones de óxidos de hierro que se asocian con los niveles de pH en el suelo.

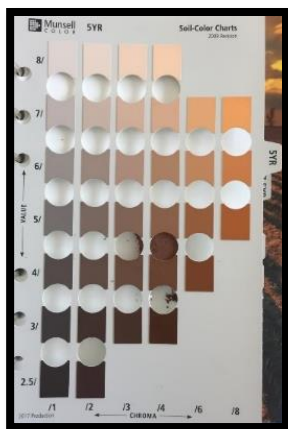


Figura 12. Evidencia fotográfica del resultado obtenido a partir de la tabla Munsell. Por José Salinas, 2018.

En el anexo 11, se presentan los datos suministrados por el laboratorio de Agrosavia, ubicado en Mosquera –Cundinamarca-, de las muestras enviadas. Los cuales fueron utilizados para llevar acabo el desarrollo de la tabla 9; en la que se presentan los niveles de N, C y relación C=N. Según los datos evaluados, se determina que los niveles de pH encontrados (5,2 y 5,37) indican que el suelo es fuertemente ácido, corroborando la presencia de aluminio intercambiable; a pH ácido se obtiene mayores niveles de cobre, zinc, boro, hierro y manganeso y bajas concentraciones de molibdeno, magnesio, azufre, calcio, potasio, fosforo y nitrógeno. Adicionalmente, el exceso de precipitación de la región genera lixiviación y acumulación de hierro y aluminio y alto consumo de bases por parte de las plantas. Jaramillo (2002).

De acuerdo con lo reportado por Abril, et al 1999; las poblaciones bacterianas, reducen las densidades a $\text{pH} < 5,5$, los niveles de materia orgánica (MO) disponible se asocian con los niveles de aluminio intercambiable presentes en el sustrato de suelo. Pero para este caso los niveles de aluminio no presentan un aumento considerable en comparación con los niveles de MO, los cuales presentan un aumento progresivo al aumentar los niveles del agente xenobiótico.

La concentración de aluminio presente en los sustratos de suelos analizados no se encontró sobre el rango crítico (< 1), resultó bajo, indicativo de no ocasionar afectaciones negativas para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Ortiz, et al; 2015).

La capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) se ubica entre 5 y 15, indicando que se trata de arenas o arcillas que no retienen los nutrientes necesarios el cual es corroborado con el tipo de suelo al que corresponden. “A estas se les llama arcillas 1:1. Son tierras poco fértiles” (FINAGRO; 2013), según los valores encontrados del CIC, el suelo se caracteriza por ser una catiónica, que correspondería al tipo de suelo con característica arenosa. Estos valores reflejan que es un lugar con procesos de meteorización y bajo contenido de materia orgánica.

Al no presentarse algún documento como antecedente del terreno de los diferentes de cultivos o los distintos tipos de fertilizantes implementados en el procese de mejoramiento de la calidad de suelo, según los resultados enviados por Agrosavia este suelo posee niveles elevados de manganeso, fosforo disponible en el terreno; lo cual, según Rivas, et al en el 2018 indica que este tipo de suelo se le han realizado algún tipo de mejoramiento al aplicar algún tipo de insumo para incrementar sus niveles nutricionales.

Tabla 9.

Datos obtenidos de los resultados de Agrosavia.

Parámetros	0 g/kg (Testigo)	Diésel 2,5 g/kg	Diésel 6,1 g/kg	Diésel 9,8 g/kg
P.H	5,37	5,3	5,2	5,28
M.O	0,0845	0,133	0,155	0,177
Aluminio Intercambiable (Al)	0	0,08	0,02	0
Capacidad de Intercambio Catiónico	5,73	4,71	4,67	4,38
N	0,004225	0,00665	0,00775	0,00885
%C	0,04901392	0,07714617	0,08990719	0,10266821
c=n	11,6009281	11,6009281	11,6009281	11,6009281

Nota. Resultados obtenidos de la información suministrada por Agrosavia. *Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.*

En la tabla 10, se presentan los resultados suministrados por el laboratorio de TecnoAmbiental S.A.S.

Tabla 10.

Datos obtenidos del laboratorio de Tecno Ambiental S.A.S. de las muestras desuelo enviadas analizar.

Fecha	Parámetro	Unidad	Método	Diésel 2,5 g/kg	Diésel 6,1 g/kg	Diésel 9,8 g/kg
14/11/2018	Hidrocarburos Totales (TPH)	%	Ultrasonido_NMX-AA- 145_SCFI- 2008_IR_SM_5520C.F	3,7	5,26	6,60
05/02/2019	Hidrocarburos Totales (TPH)	%	Ultrasonido_NMX-AA- 145_SCFI- 2008_IR_SM_5520C.F	2,12	5,49	8,39

Nota. Resultados, parámetros, unidades y método implementado por Tecno Ambiental para la obtención de TPH. Por TecnoAmbiental S.A.S, 2018.

4.1.1. Determinación de la viabilidad y actividad celulolítica.

Con el fin de identificar la cantidad de colonias presentes en los tratamientos se realizó un único recuento con base de cálculo siguiendo lo indicado en la NTC 4092/2009 (tabla 11).

Tabla 11.

Número de colonias de bacterias presentes en los tratamientos de Diésel 0 g/kg (Testigo), 2,5 g/kg, 6,1 g/kg, 9,8 g/kg; en medio CMC al 1% en un periodo de 1 mes.

Concentración de Diésel (g/kg)	UFC/10 mL
0 (Testigo)	3,9x10 ⁵
2,4	1,0x10 ⁵
6,1	2,3x10 ⁵
9,8	3,8x10 ⁵

Nota. Numero de UFC presentes en los tratamientos (Testigo, Diésel 2,4 g/kg, Diésel 6,1 g/kg y Diésel 9,8 g/kg). Por José Salinas, 2018.

4.1.2. Identificación de microorganismos celulolíticos.

A partir de las muestras de suelo obtenidas de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía, contaminadas artificialmente con diferentes concentraciones de diésel, se aislaron 39 cepas de hongos y 80 cepas bacterianas (Anexo 12 y 13), las cuales fueron sometidas al revelado de halo de hidrolisis para determinar la actividad celulolítica inicial, dicha actividad se observó mediante una evaluación cualitativa de la zona de aclaramiento utilizando rojo congó al 1% (p/v) como se han reportado por diferentes autores (Gaitán, et al, 2007; Camacho, 2014; Rodríguez, 2015), de las cuales se seleccionaron aquellas que presentaron un mayor diámetro en su halo (mm) de hidrolisis o zona de aclaramiento; como se presentan en estudios anteriores (Gaitán, et al; 2007).

4.1.2.1. Bacterias.

En la tabla 12, se presenta la codificación y resultados de las pruebas bioquímicas de las 9 cepas bacterianas, equivalentes al 11,3% con mayor capacidad celulolítica, seleccionadas del 67% de las bacterias halladas. La tabla 13, se evidencian las características de la microscopia de Gram y descripción de la cepa macroscópica en las que se identifican en su gran mayoría como *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp (figuras 13 y 14).

Comparando los datos obtenidos por Arrieta, et al; en el 2010 por los microorganismos implementados para la biorremediación de un suelo con diésel, se identifican microorganismos tanto coco como bacilos Gram negativos. Revisar la morfología del genero *Bacillus* sp, no corresponde microscópicamente a un coco bacilo.

Tabla 12.

Tabla de decodificación de las cepas seleccionadas.

Código	Cepas estudiadas	Carácter	Oxidasa	Citrato	Manitol	TSI
4C	1	N0b1	Positivo	Negativo	Positivo	A/A
9C	2	N0b2	Positivo	Negativo	Negativo	A/A
10C	3	N0b3	Positivo	Positivo	Positivo	A/A
12D	4	N1b1	Positivo	Negativo	Positivo	A/A
25D	5	N1b2	Positivo	Positivo	Débilmente positivo	A/A
34D	6	N1b3	Positivo	Negativo	Débilmente positivo	A/A
12E	7	N2b1	Positivo	Negativo	Débilmente positivo	A/A
15E	8	N2b2	Positivo	Negativo	Positivo	A/A
20E	9	N2b3	Positivo	Positivo	Positivo	A/A

Nota. Codificación de las cepas seleccionadas; junto con las pruebas bioquímicas realizadas. Descarboxilación lisina (k/k), fermentación glucosa (k/A)

Tabla 13.

Caracterización macro y microscópica de las cepas bacterianas aisladas con actividad celulolítica en agar CMC 1% (p/v).

Microscopia de Gram y descripción de la cepa macroscópica						
Cepas	Morfología	Gram	Forma	Color	Textura	Genero
1	Bacilo	Negativo	Irregular	Beige	Creмоса	<i>Pseudomonas</i> sp
2	Coco	Negativo	Irregular	Beige	Creмоса	N.I.
3	Coco-Bacilo	Positivo	Irregular	Beige	Creмоса	<i>Bacillus</i> sp
4	Coco-Bacilo	Positivo	Irregular	Beige	Creмоса	<i>Bacillus</i> sp
5	Coco-Bacilo	Positivo	Irregular	Beige	Creмоса	<i>Bacillus</i> sp
6	Coco-Bacilo	Positivo	Irregular	Beige	Creмоса	<i>Bacillus</i> sp
7	Coco-Bacilo	Positivo	Irregular	Beige	Creмоса	<i>Bacillus</i> sp
8	Coco-Bacilo	Negativo	Irregular	Beige	Creмоса	N.I.
9	Coco-Bacilo	Positivo	Irregular	Beige	Creмоса	<i>Bacillus</i> sp

Nota. Características Macroscópicas de las cepas bacterianas seleccionadas para potencial. N.I.: No Identificada. Por José Salinas, 2018.

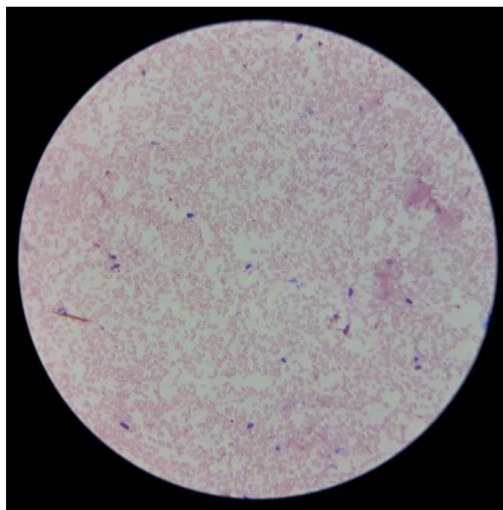


Figura 13. Coco Gram Negativo. Por Salinas J, 2018.

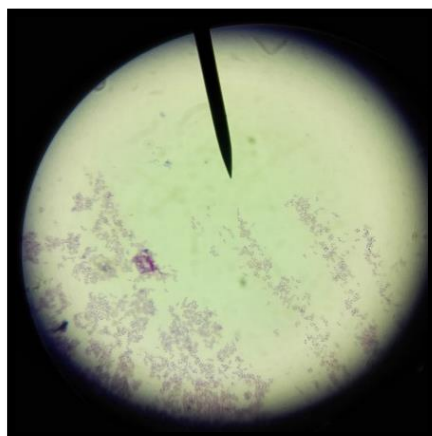


Figura 14. Coco-Bacilo. Por Salinas J, 2018.

En la tabla 14, se presentan los diámetros iniciales de las cepas seleccionadas para el desarrollo del estudio; las cuales fueron escogidas por presentar un mayor potencial enzimático en cada una de las diluciones y concentraciones.

Tabla 14.

Actividad celulolítica cualitativa de las cepas bacterias aisladas en agar CMC 1% (p/v), seleccionadas por tener un mayor diámetro en su halo de hidrólisis (mm) y codificación de la selección.

Cepa	Carácter	Diámetro halo de hidrólisis
1	N0b1	0,205 mm
2	N0b2	0,505 mm
3	N0b3	0,707 mm
4	N1b1	0,508 mm
5	N1b2	0,606 mm
6	N1b3	0,608 mm
7	N2b1	0,506 mm
8	N2b2	0,202 mm
9	N2b3	0,505 mm

Nota: Actividad celulolítica de las cepas bacterianas seleccionadas para potencial y codificación implementada. Por Salinas J, 2018.

En las figuras 15, se presenta el método de siembra por superficie de para la obtención de algunas de las cepas seleccionadas para desarrollar el proceso por agotamiento para así desarrollar el agotamiento y posterior evaluación del potencial celulolítico.

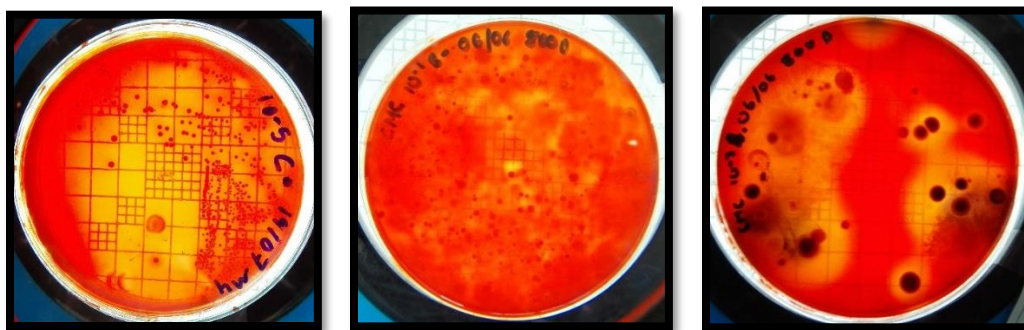


Figura 15. Método de siembra por superficie demostrando capacidad celulolítica en Agar CMC 1% (p/v). Por Salinas J, 2018.

En la figura 16, se presenta el método por agotamiento de dos cepas seleccionadas para elaborar el potencial celulolítico.

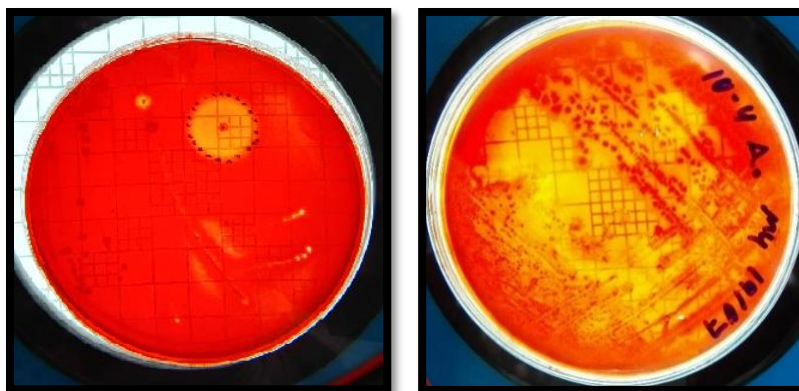


Figura 16. Zona de aclaramiento, cepa N1b2 (a) y la cepa N2b2 (b) en Agar CMC 1% (p/v). Por Salinas J, 2018.

Se implementa una conservación de las cepas bacterias con actividad Celulolítica, mediante el método de Liofilización (BHI), el cual favorece en mayor porcentaje la viabilidad de las cepas en comparación con métodos de microsecado. Según un estudio realizado por Barragán, *et al*, en el 2009, la liofilización o BHI; garantiza una mejor estabilidad de las cepas ya que presenta una buena protección del microorganismo frente a daños mecánicos y químicos que se originan en el proceso.

4.1.3. Correlación de resultados.

En el desarrollo del sistema de correlación de Pearson, se tuvieron en cuenta las variables de diámetro de halo (mm) y numero de colonias en distintas concentraciones de CMC; en las cuales se pueden apreciar cada una de las correlaciones realizadas a las bacterias seleccionadas en el estudio (tabla 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 y 23).

En la tabla 15, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°1 codificada con el nombre N0b1, en la que se evidencian la variación entre las concentraciones de CMC y su potencial celulolitico junto con el número de colonias formadoras en la que se presentan las correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 15.

Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°1 (N0b1) en relación al tratamiento Diésel 6.1428 g/kg para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA N0b1. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	1	-0,196	0,096	-0,334	0,127	0,094
	N	310	310	66	7	310	77
0,5% B	Pearson*	-0,196	1	0,018	0	-0,442	-0,212
	N	310	505	66	7	505	77
1% A	Pearson*	0,096	0,108	1	-0,156	0	0,171
	N	66	66	66	7	66	66
1% B	Pearson*	-0,334	0	-0,156	1	0	-0,258
	N	7	7	7	7	7	7
2% A	Pearson*	0,127	-0,442	0	0	0	0
	N	310	505	66	7	77	77
2% B	Pearson*	0,094	-0,212	0,171	-0,258	0	1
	N	77	77	66	7	77	77

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En la figura 17, se presentan los valores promedios obtenidos de la tabla 15 con respecto a la cepa bacteriana N0b1, en la cual se evidencia que la cepa presento una mejor adaptación y diámetro de halo a una concentración de 1% de CMC, pero al disminuir o aumentar la cantidad de CMC se genera una disminución del diámetro del halo celulolítico.

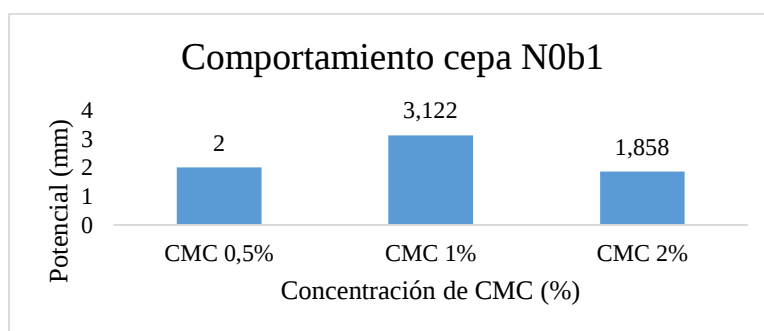


Figura 17. Comportamiento de la cepa N0b1 a distintas concentraciones de CMC. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Salinas J, 2018.

En la tabla 16, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°2 codificada con el nombre N0b2, en la que se evidencian su potencial celulolítico junto con el número de colonias formadoras en la que se presentan correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 16.

Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°2 (N0b2) en relación al tratamiento Diésel 6.1428 g/kg para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA N0b2. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	1	0,082	0,436	-0,14	0	-0,088
	N	66	66	16	66	4	30
0,5% B	Pearson*	0,082	1	0	-0,164	0	-0,312
	N	66	122	16	122	4	30
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
1% A	Pearson*	0,436	0	1	0,215	0	0,074
	N	16	122	16	16	4	16
1% B	Pearson*	-0,14	-0,164	0,215	1	0	0,039
	N	66	122	16	465	4	30
2% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	4	4	4	4	4	4
2% B	Pearson*	-0,088	-0,312	0,074	0,039	0	1
	N	30	30	16	30	4	30

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En relación a los valores obtenidos en la figura 18, del índice de correlación de Pearson presentado en la tabla 16 para la cepa bacteriana N0b2, se desarrolla un mayor potencial degradador en la concentración de 0,5% de CMC, en la cual se genera una disminución de su potencial al aumentar su concentración al 1% y aumentando al incrementar los niveles de CMC al 2%

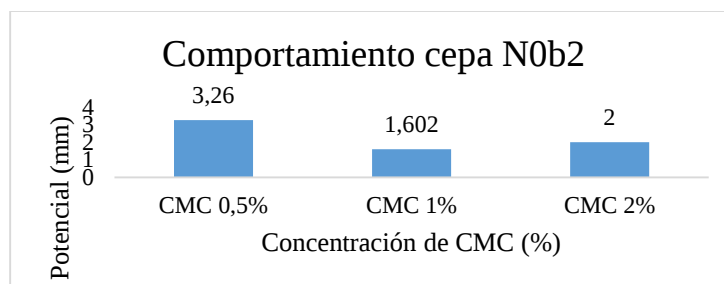


Figura 18. Comportamiento de la bacteria N0b2 a distintas concentraciones de CMC. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Salinas J, 2018.

En la tabla 17, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°3 codificada con el nombre N0b3, en la que se evidencian su potencial celulolítico junto con el número de colonias formadoras en la que se presentan correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 17.

Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°3 (N0b3) en relación al tratamiento Diésel 6.1428 g/kg para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA N0b3. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	1	-0,577	-0,213	-0,381	0	0
	N	12	4	12	12	2	6
0,5% B	Pearson*	-0,577	1	0	0,577	0	0
	N	4	4	4	4	2	4
1% A	Pearson*	-0,213	0	1	0,081	0	0
	N	12	4	24	24	2	6
1% B	Pearson*	-0,381	0,577	0,081	1	0	0
	N	12	4	24	33	2	6
2% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	2	2	2	2	2	2
2% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	6	4	6	6	2	6

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En la figura 19, se evidencia que la cepa n°3 codificada como N0b3, la cual tiene una mejor adaptación y potencial celulolítico a una concentración de 0,5% de CMC, pero se presenta una

disminución de manera paulatina de su actividad celulolítica al incrementar las concentraciones de CMC.

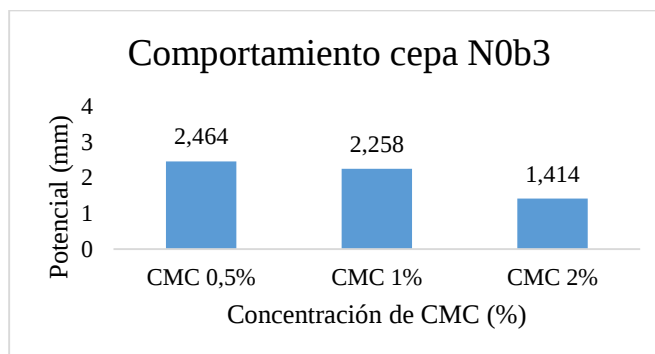


Figura 19. Comportamiento de la bacteria N0b3 a distintas concentraciones de CMC. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Salinas J, 2018.

En la figura 20, se evidencia una extrapolación de los resultados obtenidos por parte de las cepas bacterianas que fueron extraídas de la preselección del potencial celulolítico a una concentración de 6,1 g/kg de diésel al 1% de CMC. Donde se encontró que la cepa bacteriana N0b1 presenta un mayor potencial celulolítico en comparación con las otras; seguida de N0b2 la cual expreso unos valores de potencial enzimático muy cercanos al de mayor potencial.

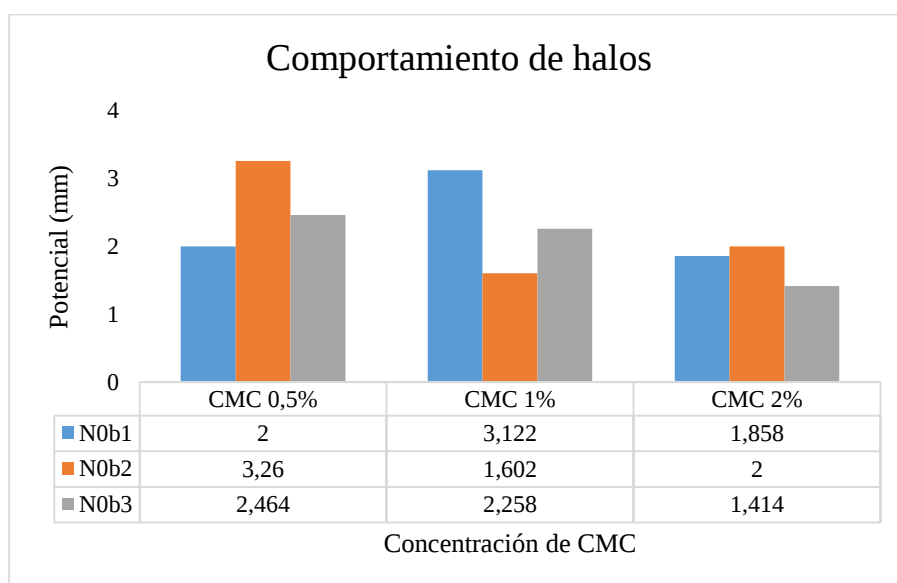


Figura 20. Comportamiento entre las bacterias de estudio a 6,1 g/kg de Diésel. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Salinas J, 2018.

En la tabla 18, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°4 codificada con el nombre N1b1, en la que se evidencian su potencial celulolítico junto con el número de colonias formadoras en la que se presentan correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 18.

Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°4 (N1b1) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg para el mes 1 potencial celulolítico por duplicado (A y B).

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA N1b1. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	1	0	0,447	-0,556	-0,543	0,465
	N	5	3	5	5	3	3
0,5% B	Pearson*	0	1	0,182	0,489	0,863	-0,872
	N	3	3	3	3	3	3
1% A	Pearson*	0,447	0,182	1	0,561	-0,605	0,409
	N	5	3	6	6	6	6
1% B	Pearson*	-0,543	0,489	0,561	1	-0,243	-0,175
	N	5	3	6	8	8	8
2% A	Pearson*	-0,543	0,863	-0,605	-0,243	1	-0,071
	N	5	3	6	8	118	79
2% B	Pearson*	0,465	-0,872	0,409	-0,175	-0,071	1
	N	5	3	6	8	79	79

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

Según la correlación de Pearson realizada la cepa bacteriana n°4 codificada como N1b1, se presenta un alto nivel de potencial enzimático a una concentración de CMC AL 1%; disminuyendo su potencial en el momento que se aumentó o disminuyó la concentración de CMC.

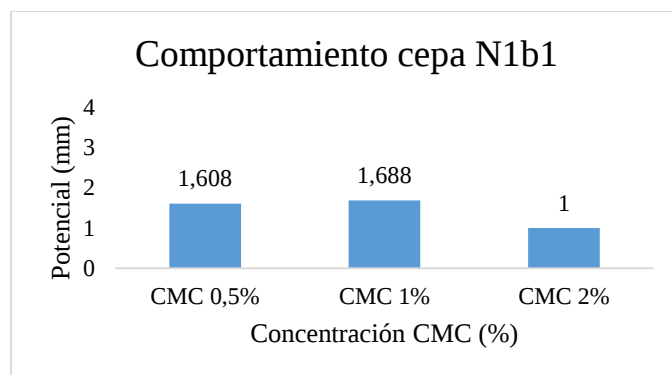


Figura 21. Comportamiento de la bacteria N1b1 a distintas concentraciones de CMC. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Salinas J, 2018.

En la tabla 19, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°5 codificada con el nombre N1b2, en la que se evidencian su potencial celulolítico junto con el número de colonias formadoras en la que se presentan correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 19.

Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°5 (N1b2) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 1 para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA N1b2. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	1	0,63	0,044	-0,018	0,015	0,87
	N	17	13	17	17	17	3
0,5% B	Pearson*	0,63	1	0,036	-0,063	-0,07	0,865
	N	13	13	13	13	13	3
1% A	Pearson*	-0,044	0,036	1	-0,199	-0,067	0,87
	N	17	13	35	35	25	3
1% B	Pearson*	-0,018	-0,063	-0,199	1	-0,015	0
	N	17	13	35	42	25	3
2% A	Pearson*	0,015	-0,07	-0,067	-0,015	1	0
	N	17	13	25	25	25	3
2% B	Pearson*	0,87	0,865	0,87	0	0	1
	N	3	3	3	3	3	3

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En la figura 22, se grafica el promedio encontrado por el índice de correlación de Pearson para la cepa bacteriana n°5 codificada como N1b2, presento un mayor potencial en la concentración de CMC al 1%, disminuyendo su actividad a medida que se aumentaba o disminuirla la cantidad de CMC presenté en el medio. Aunque en la concentración de 0,5% el microorganismo presenta un índice no muy alejado del valor de mayor rango.

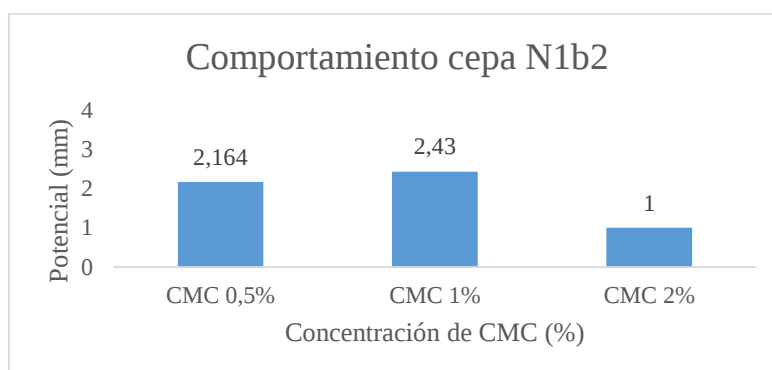


Figura 22. Comportamiento de la bacteria N1b2 a distintas concentraciones de CMC. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

En la tabla 20, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°6 codificada con el nombre N1b3, en la que se evidencian su potencial celulolítico junto con el número de colonias formadoras en la que se presentan correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 20.

Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°6 (N1b3) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 1 para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA N1b3. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	1	0,232	0,012	0,411	-0,211	0,689
	N	16	12	16	16	10	6
0,5% B	Pearson*	0,232	1	-0,125	0,155	-0,287	0,311
	N	12	12	12	12	10	6
1% A	Pearson*	0,012	-0,125	1	0,114	0,395	0,549
	N	16	12	33	24	10	6
1% B	Pearson*	0,411	0,155	0,144	1	0,519	0,713
	N	16	12	24	24	10	6

Tabla 20. Continuación

2% A	Pearson*	-0,211	-0,287	0,395	0,519	1	-0,293
	N	10	10	10	10	10	6
2% B	Pearson*	0,689	0,311	0,549	0,713	-0,293	1
	N	6	6	6	6	6	6

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En relación a los valores obtenidos por la correlación de Pearson de la cepa n°6 codificada como N1b3, se presentó un mayor potencial en la concentración de CMC al 1%; pero al aumentar su cantidad de CMC el valor decayó hasta 0 y al disminuir los niveles de CMC representa una caída del nivel en su potencial, pero consistente en el proceso de producción de enzima.

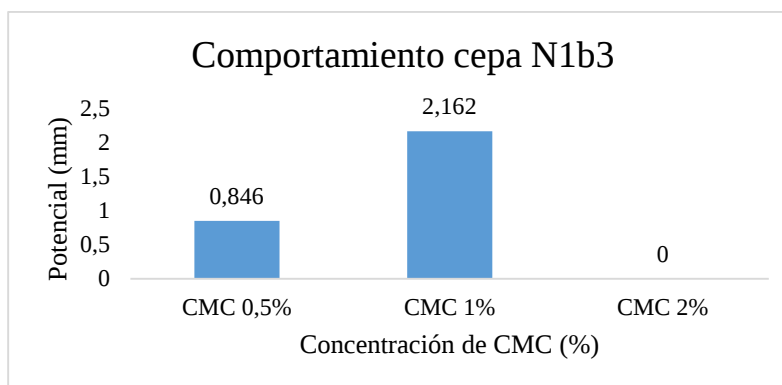


Figura 23. Comportamiento de la bacteria N1b3 a distintas concentraciones de CMC. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Salinas J, 2018.

En la figura 24, se evidencia una extrapolación de los resultados obtenidos de la correlación de Pearson de las bacterias N1b1, N1b2 y N1b3, las cuales fueron extraídas de la preselección del potencial celulolítico a una concentración de diésel al 9,8 g/kg y a niveles de CMC del 1%. Donde se encuentra que la cepa N1b2 presenta un mayor potencial celulolítico en comparación con las otras; seguida de N1b1 la cual expreso unos valores muy cercanos a la cepa de mayor potencial.

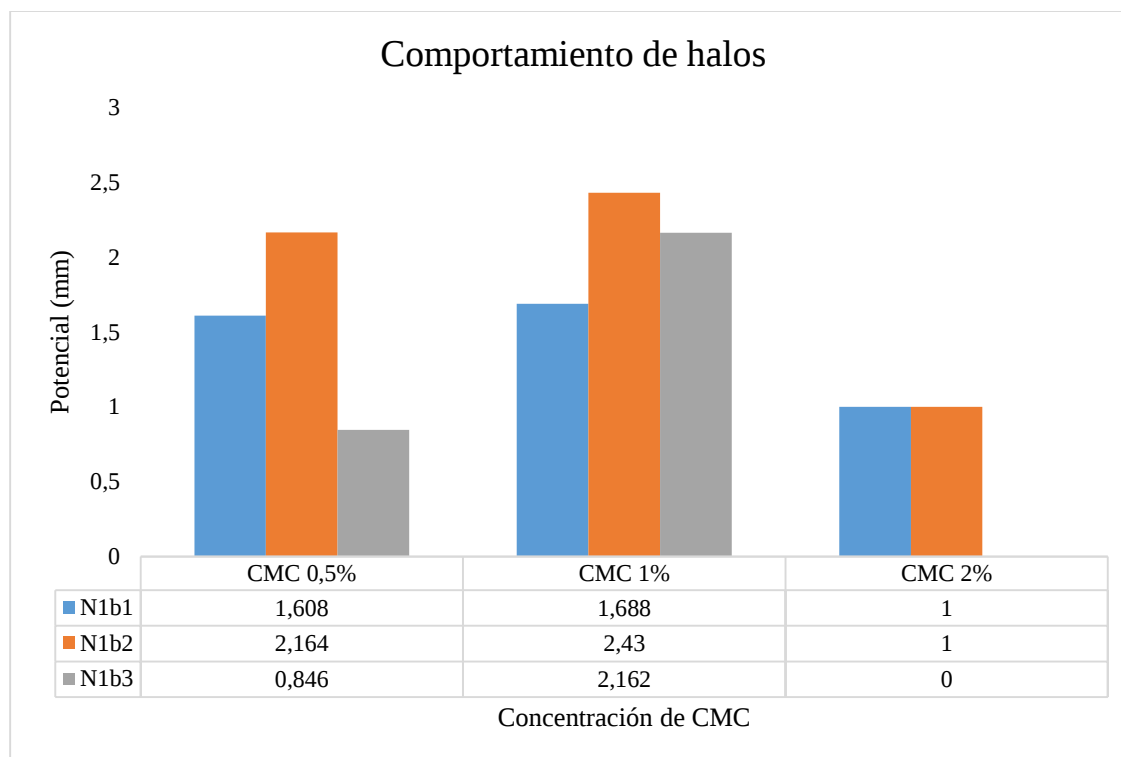


Figura 24. Comportamiento entre las bacterias de estudio a 9,8 g/kg de Diésel mes 1. Adaptado de “Excel, 2018”. Por Salinas J, 2018.

En la figura 25, se evidencia una extrapolación de los resultados obtenidos por parte de las cepas bacterianas sometidas a distintas concentraciones de Diésel a 6,1 g/kg (N0b1, N0b2 y N0b3) y 9,8 g/kg (N1b1, N1b2 y N1b3) en concentraciones del 0,5, 1 y 2% de CMC. En la cual se obtuvo que al aumentar las concentraciones de Diésel disminuye significativamente el potencial celulolítico de las cepas sometidas en el estudio. Se destaca la cepa bacteriana N0b1 por presentar un mejor potencial en relación con las demás seguida de la cepa N0b2 que a pesar de presentar un buen nivel de su potencial enzimático pero menor a la anterior cepa; su concentración tiene un patrón del potencial celulolítico al aumentar los niveles de CMC.

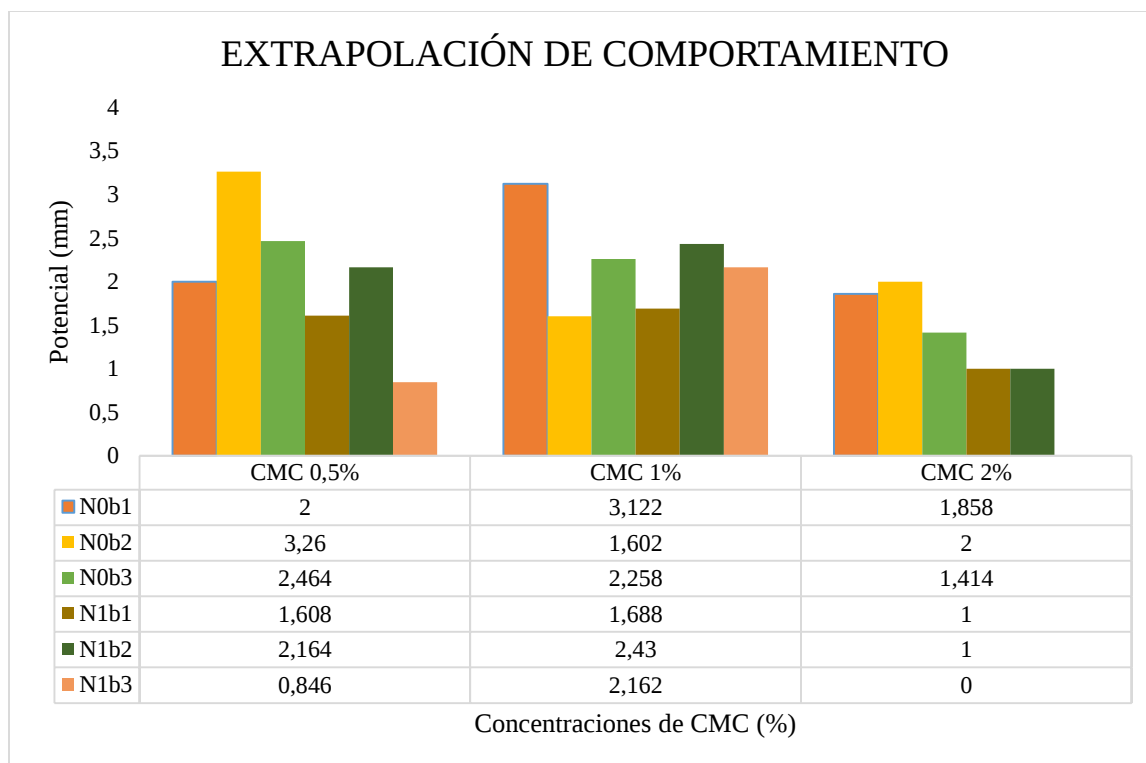


Figura 25. Grafico comparativo entre cepas, concentración de CMC y concentración de Diésel. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

En la tabla 21, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°7 codificada con el nombre N2b1, en la que se evidencian su potencial celulolítico junto con el número de colonias formadoras en la que se presentan correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 21.

Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°7 (N2b1) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 2, para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA N2b1. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	1	0,167	0,663	0	0	-0,408
	N	5	5	5	5	2	5
0,5% B	Pearson*	0,167	1	0,023	-0,03	0	-0,5
	N	5	13	13	13	2	6
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
1% A	Pearson*	0,663	0,023	1	0,406	0	-0,081

Tabla 21. Continuación

	N	5	13	17	17	2	6
1% B	Pearson*	0	-0,03	0,406	1	0	0
	N	5	13	17	33	2	6
2% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	2	2	2	2	2	2
2% B	Pearson*	-0,408	-0,5	-0,081	0	0	1
	N	5	6	6	6	2	6

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

A continuación, se presentan, los comportamientos de las cepas bacterianas, luego de trascurrido 1 mes de aplicar el diésel a una concentración de 9,8 g/kg en el sustrato de suelo.

En la figura 26, se presenta el comportamiento de la cepa n°7 codificación N2b2 en donde a una concentración de 1% de CMC presenta un mayor potencial celulolítico en comparación con una concentración del 0,5%, presentando una disminución de su potencial al aumentar la concentración de CMC como se evidencia al 2%.

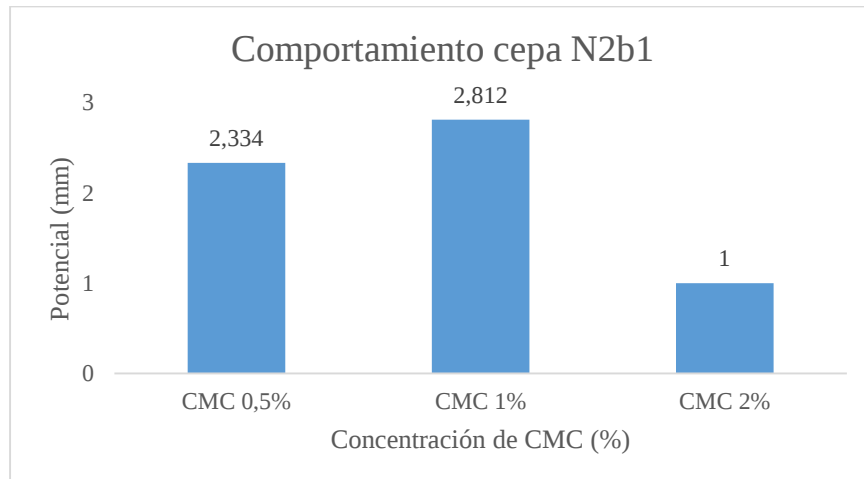


Figura 26. Comportamiento de la bacteria N2b1 a distintas concentraciones de CMC. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

En la tabla 22, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°8 codificada con el nombre N2b2, en la que se evidencian su potencial celulolítico junto con el número de colonias formadoras en la que se presentan correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 22.

Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°8 (N2b2) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 2, para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA N2b2. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	1	-0,143	-0,187	0,084	0,190	-0,238
	N	25	16	25	25	25	25
0,5% B	Pearson*	-0,143	1	-0,140	0,059	0,218	-0,112
	N	16	16	16	16	16	16
1% A	Pearson*	-0,187	-0,140	1	0,037	0,123	0,376
	N	25	16	36	36	36	36
1% B	Pearson*	0,084	0,059	0,037	1	-0,048	-0,275
	N	25	16	36	43	43	43
2% A	Pearson*	0,190	0,218	0,123	-0,048	1	0,152
	N	25	16	36	43	73	73
2% B	Pearson*	-0,238	-0,112	0,376	-0,275	0,152	1
	N	25	16	36	43	73	85

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En relación a los valores obtenidos en la figura 27, según los resultados expresados por el índice de correlación de Pearson para la cepa n°8 codificación N2b2, se observa que esta presenta un comportamiento ascendente a medida que se incrementan los niveles de CMC.

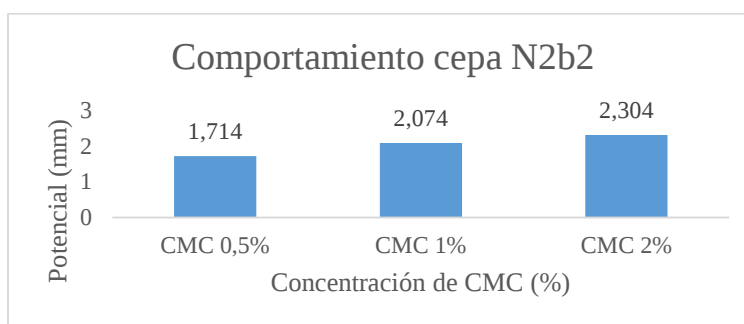


Figura 27. Comportamiento de la bacteria N2b2 a distintas concentraciones de CMC. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

En la tabla 23, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°9 codificada con el nombre N1b2, en la que se evidencian su potencial celulolítico junto con el número de

colonias formadoras en la que se presentan correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 23.

Índice de correlación de Pearson de la cepa bacteriana n°9 (N2b3) en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg del mes 2, para el potencial celulolítico por duplicado (A y B).

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA N2b3. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	1	-0,181	0,471	-0,115	0,051	0,617
	N	13	13	13	13	13	13
0,5% B	Pearson*	-0,181	1	-0,245	-0,001	-0,032	-0,315
	N	13	22	22	22	22	14
1% A	Pearson*	0,471	-0,245	1	-0,171	-0,226	0,393
	N	13	22	49	49	23	14
1% B	Pearson*	-0,115	-0,001	-0,171	1	0,125	-0,350
	N	13	22	49	68	23	14
2% A	Pearson*	0,051	-0,032	-0,226	0,125	1	0,289
	N	13	22	23	23	23	14
2% B	Pearson*	0,617	-0,315	0,393	-0,350	0,289	1
	N	13	14	14	14	14	14

Nota. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En relación a los valores obtenidos en la figura 28, en el índice de correlación de Pearson para la cepa n°8 codificada como N2b3, se observa que la cepa responde favorablemente al incremento progresivo de la concentración de CMC.

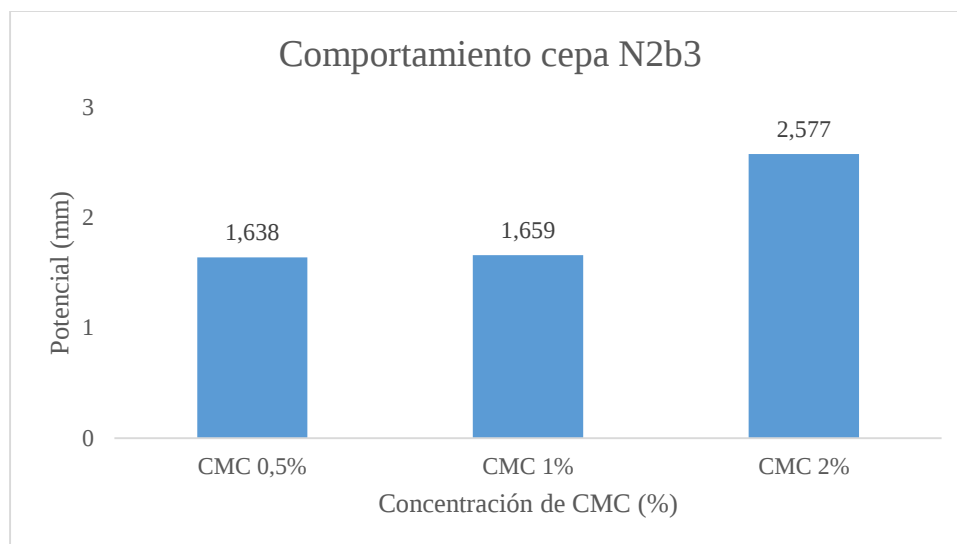


Figura 28. Comportamiento de la bacteria N2b3 a distintas concentraciones de CMC. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

A partir de la figura 29, se evidencia una extrapolación de los resultados obtenidos por parte de las baterías sometidas a distintas concentraciones de Diésel al 9,8 g/kg mes 2 y a concentraciones de CMC del 0,5, 1, 2%. En la cual se obtuvo que la cepa N2b1 presenta un mayor potencial enzimático, seguida de la cepa N2b2; la cual a presenta un mejor comportamiento en el crecimiento progresivo a través de las concentraciones implementadas.

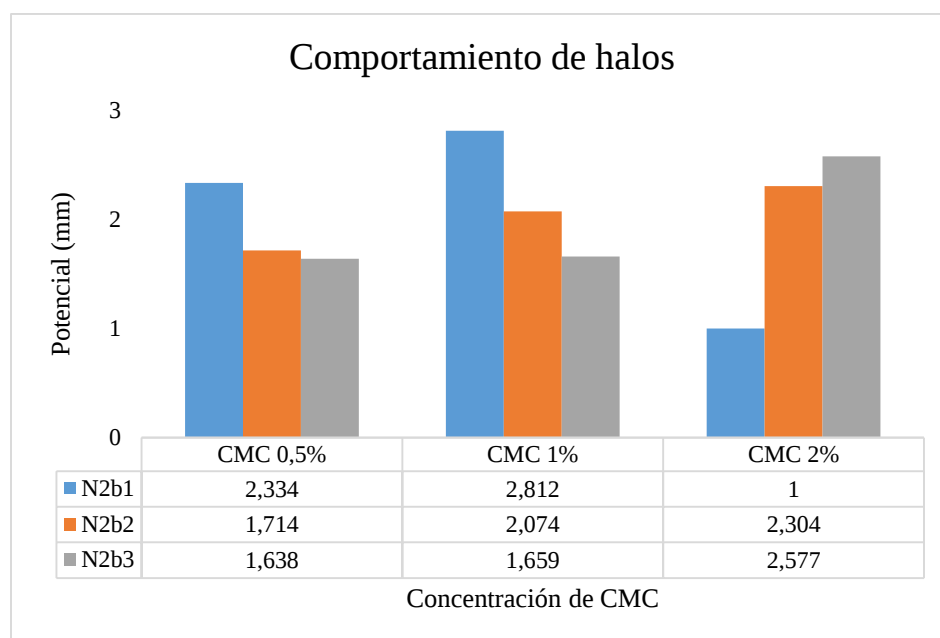


Figura 29. Comportamiento entre las bacterias de estudio a 9,8 g/kg de Diésel en el mes 2. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

En la figura 30, se presenta una extrapolación del índice de correlación de Pearson para el caso de un muestreo realizado en microorganismos transcurrido un mes luego de llevar a cabo el vertimiento artificial de diésel se evidencia que las cepas (N1b1, N1b2 y N1b3) pertenecientes al primer mes de vertimiento del agente xenobiótico presento un menor potencial en comparación con las (N2b1, N2b2 y N2b3) pertenecientes al primer mes de vertimiento del agente xenobiótico. Lo cual indica que las bacterias tuvieron un proceso de resistencia al transcurrir el tiempo de aplicación de la sustancia. La cepa que presento un mejor potencial fue N2b2 ya que su potencial fue incrementando a medida que se elevaban los niveles de CMC; seguida de la cepa N2b3.

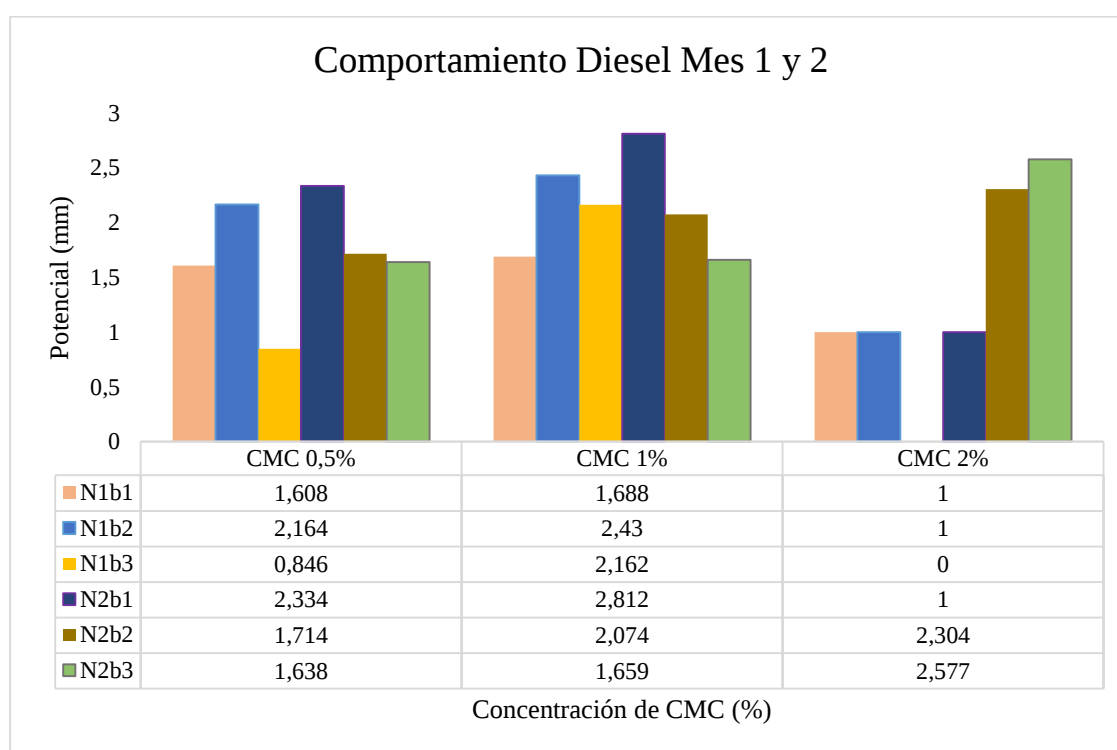


Figura 30. Comportamiento de los microorganismos luego de un periodo de un mes. Serie 1. Mes 1 y Serie 4. mes 2. i. Representa n° de serie. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por el aislamiento hecho por Gaitán, et al en el 2007; en un residuo fresco y de compost generado por un cultivo de crisantemo, microorganismos con actividad celulolítica; del cual se reportaron tres cepas que presentaron actividad celulolítica del (Cepa 2 (0.3 mm), Cepa 6 (0.2 mm) y cepa 8 (0.35 mm)); mientras los observados en el estudio presentan un mayor diámetro en las zonas de aclaramiento por parte de las cepas (N1b3 (0.608 mm), N0h1 (0.703 mm) y N0b3 (0.707)).

4.1.3.1. Hongos.

Del 33% de las cepas de hongos filamentosos encontradas en el presente estudio, se decide trabajar con el 23,1% de las cepas que presenta un mayor rango en su diámetro de halo, el cual representa un mejor potencial celulolítico (Tabla 24). La estructura microscópica de las cepas estudiadas fue determinada mediante una tinción por azul de lactofenol (figura 31).

Tabla 24.

Actividad celulolítica cualitativa de las cepas de hongos filamentosas aisladas en agar CMC 1% (p/v) y codificación.

Cepa	Código	Figura	Diámetro halo de hidrólisis
10	N0h1	32	0,703 mm
11	N1h2	33	0,509 mm
12	N2h3	34	0,509 mm

Nota. Actividad celulolítica de las cepas de hongos filamentosos seleccionadas para potencial y codificación. Por José Salinas, 2018.

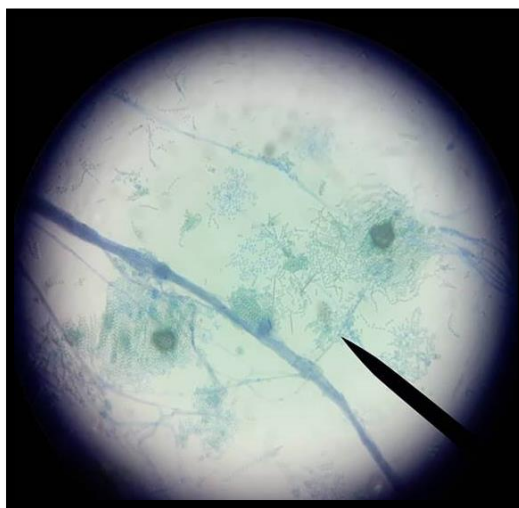


Figura 31. Cepa de hongo filamentoso *Aspergillus* sp. Por Salinas J, 2018.

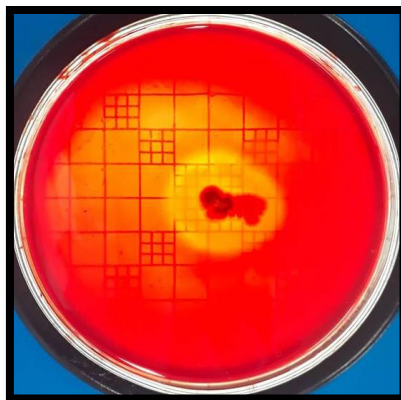


Figura 32. Zona de aclaramiento, cepa N0h1 en Agar CMC 1% (p/v). Por Salinas J, 2018.

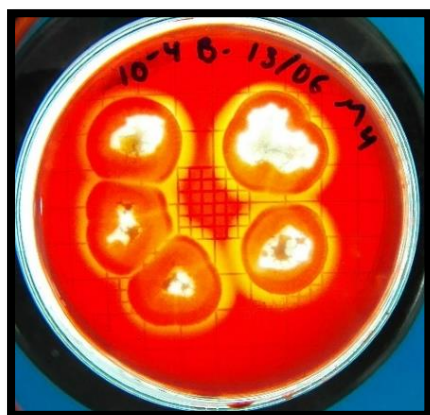


Figura 33. Zona de aclaramiento, cepa N1h2 en Agar CMC 1% (p/v). Por José Salinas, 2018.

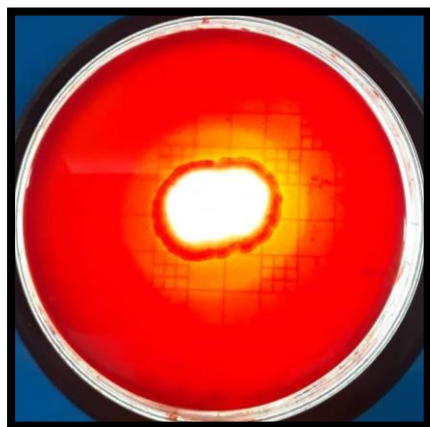


Figura 34. Zona de aclaramiento, cepa N2h3 en Agar CMC 1% (p/v). Por José Salinas, 2018.

Se implementa el método de conservación de hongos filamentosos por glicerol al 10% en ADTE, por ser un método que garantiza, pureza y estabilidad de las cepas, lo que se un e a su

bajo costo y sencillez, capaz de garantizar la estabilidad y supervivencia de diferentes cultivos fúngicos por largos periodos de tiempo. El uso de la conservación de hongos filamentosos mediante la inmersión en agua destilada bien documentado en la literatura (Fernández, et al., 2012), en un estudio realizado por Rey, *et al* en el 2016, se observó que una recuperación de 16 hongos de los 18 evaluados corroborando que el presente método permite la conservación de hongos durante un periodo largo de tiempo.

4.1.4. Correlación de resultados.

El sistema de correlación de Pearson, se tuvieron en cuenta las variables de diámetro de halo (mm) y numero de colonias en concentraciones de CMC; en donde se puede apreciar que las correlaciones de las cepas de hongos presentes en las tablas (tabla 25, 26 y 27), las cuales no presenta una relación directamente lineal entre las dos variables estudiadas. Debido a que el índice de correlación de Pearson para las tres cepas de hongos estudiadas fue de 0 no se presenta ninguna grafica comparativa con respecto a la proyección del potencial enzimático mediante la aplicación del índice de correlación, se presenta la proyección del potencial celulolítico hallado, mediante el empleo de distintas concentraciones de CMC (Figura 35, 36 y 37).

En la tabla 25, se presenta la correlación de los resultados obtenidos por la cepa n°10 codificada con el nombre N0h1, en la que se evidencian su potencial celulolitico junto con el número de colonias formadoras en la que se presentan correlaciones negativas perfectas, correlaciones positivas moderadas fuertes y en ocasiones de ninguna correlación entre las variables.

Tabla 25.

Índice de correlación de Pearson de la cepa de hongo n°1 en relación al tratamiento Diésel 2.4571 g/kg, para el potencial celulolitico.

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA HONGO 1. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1

Tabla 25. Continuación

0,5% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
1% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
1% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
2% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
2% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En la figura 35, se evidencia que la cepa N0h1 de hongo filamentos tiene una mejor adaptación y potencial celulolítico a una concentración de 0,5% de CMC, pero se presenta una disminución de manera paulatina de su actividad celulolítica al incrementar las concentraciones de CMC.

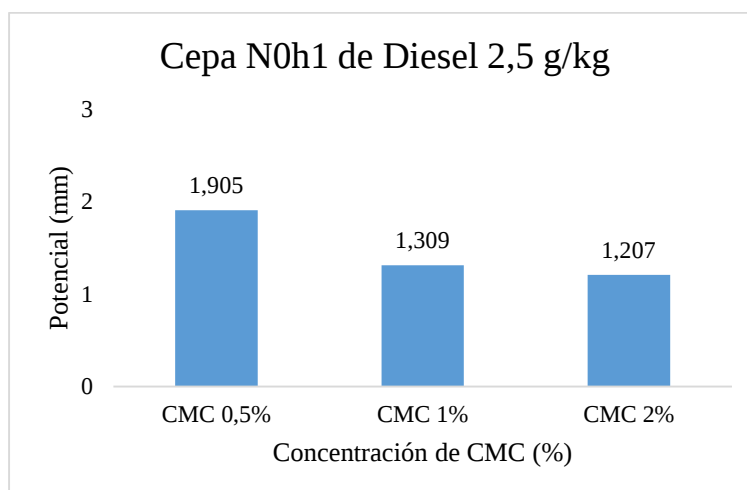


Figura 35. Actividad celulolítica de la cepa N0h1 Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

En la tabla 26, se presentan los valores determinados mediante el método de correlación de Pearson de la cepa de hongo filamentoso n°11 codificada bajo el nombre de N0h2, en la cual se demuestra que no se presenta una correlación directamente lineal entre las variables estudiadas debido a la cantidad de datos hallados.

Tabla 26.

Índice de correlación de Pearson de la cepa de hongo n°2 en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg, para el potencial celulolítico.

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA HONGO 2. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
0,5% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
1% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
1% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
2% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
2% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En la figura 36, se evidencia que la cepa N0h2 de hongo filamentos tiene una mejor adaptación y potencial celulolítico a una concentración en 1% de CMC; pero presenta rangos bajos en concentraciones inferiores y mayores de CMC.

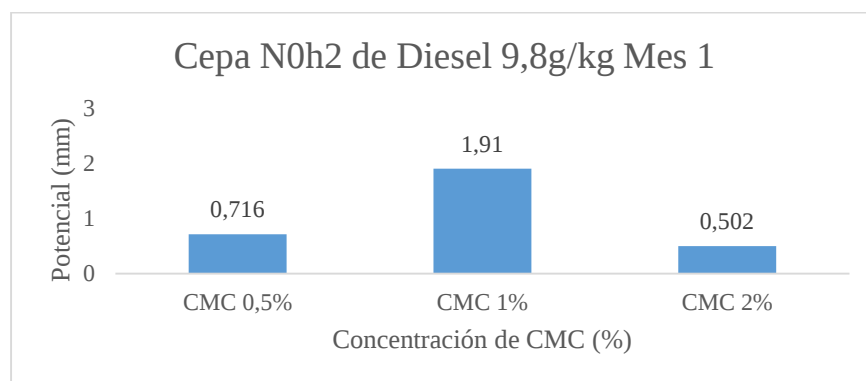


Figura 36. Actividad celulolítica de la cepa N0h2. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

En la tabla 27, se presentan los valores determinados mediante el método de correlación de Pearson de la cepa de hongo filamentososo n°12 codificada bajo el nombre de N0h3, en la cual se

demuestra que no se presenta una correlación directamente lineal entre las variables estudiadas debido a la cantidad de datos hallados.

Tabla 27.

Índice de correlación de Pearson de la cepa de hongo n°3 en relación al tratamiento Diésel 9,8285 g/kg, para el potencial celulolítico.

CMC-CORRELACIÓN DE PEARSON							
CEPA HONGO 3. CONCENTRACIÓN DE CMC VS DIAMETRO DE HALOS							
		0,50%		1,00%		2,00%	
		A	B	A	B	A	B
0,5% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
0,5% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
1% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
1% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
2% A	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1
2% B	Pearson*	0	0	0	0	0	0
	N	1	1	1	1	1	1

Nota. N= Numero de colonias. Pearson*= Correlación de Pearson. Adaptado de “Software IBM SPSS Statistics 24”; Por José Salinas, 2018.

En la figura 36, se evidencia que la cepa N0h3 de hongo filamentos tiene una mejor adaptación y potencial celulolítico a una concentración en 1% de CMC; pero presenta rangos bajos en concentraciones mayores e inferiores de CMC.

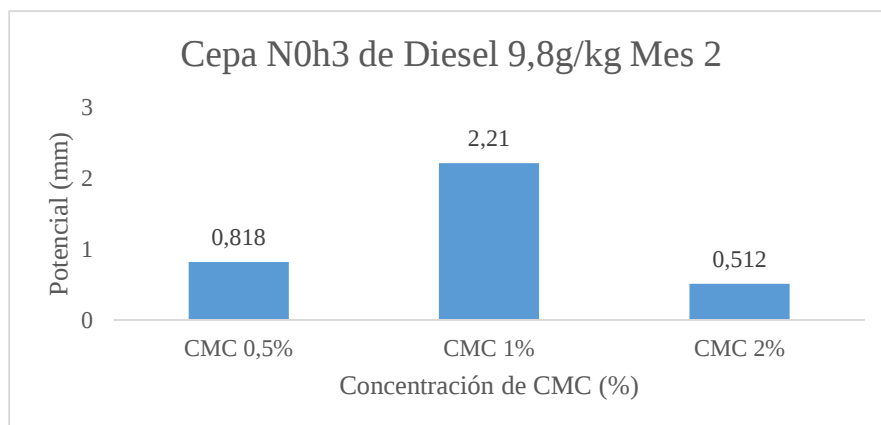


Figura 37. Actividad celulolítica de la cepa N0h3. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

En la figura 38, se presenta una proyección comparativa entre los resultados obtenidos de las cepas de hongos filamentosos; en la cual se obtiene que la cepa que presenta una mejor adaptación y potencial enzimático es N0h1 perteneciente a una concentración de Diésel del 9,8 g/kg del mes 2, seguida de la cepa N0h3 perteneciente a una concentración de Diésel 9,8 g/kg en el mes 1.

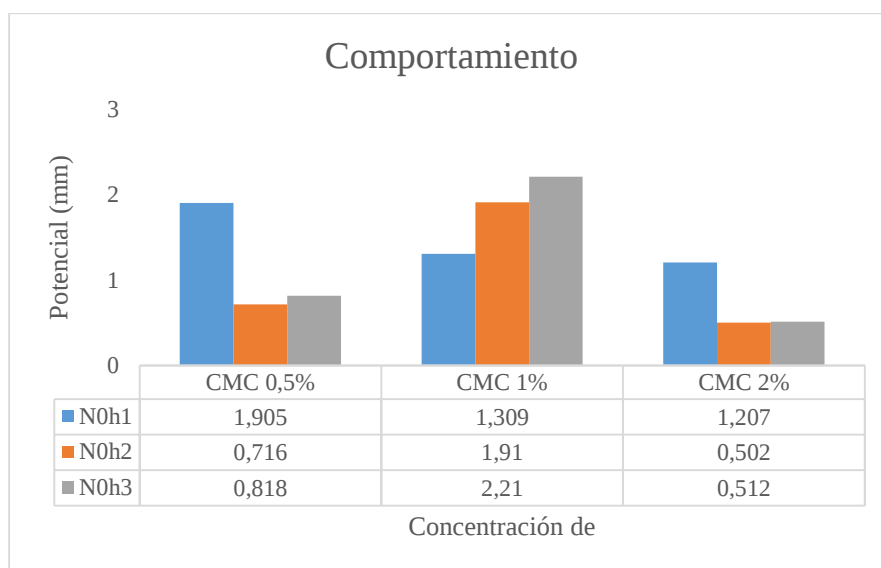


Figura 38. Comportamiento de las cepas de Hongos. Adaptado de “Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

La figura 39, se representa una comparación entre las cepas bacterianas y el hongos filamentosos, estudiados que presentaron un mayor potencial celulolítico en cada una de las concentraciones; con lo cual se infiere que la cepa que demuestra un mayor potencial enzimático es la N0b1 la cual a pesar de tener una caída en el tercer aumento de la concentración de CMC resulta una de las más efectivas, seguida de la cepa N2b2 podría presentar una mejor actividad celulolítica ya que su potencial va en aumento a medida que aumentan las concentraciones de CMC.

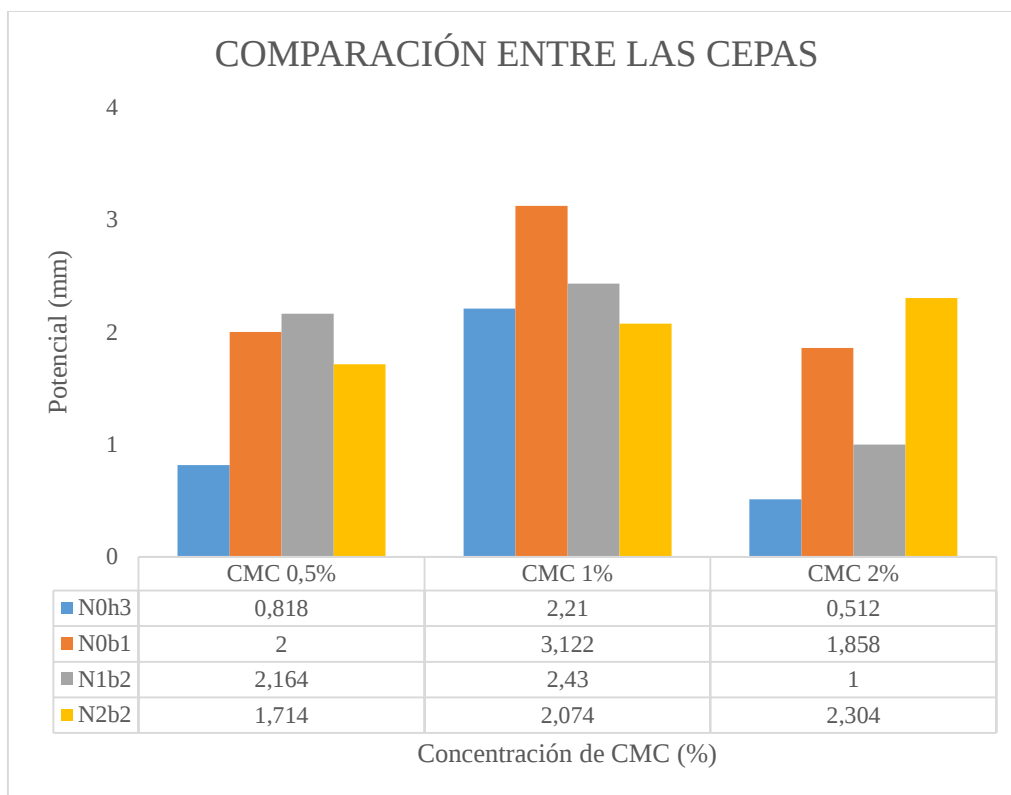


Figura 39. Extrapolación de los resultados de las cepas que presentaron mayor potencial celulolítico. Adaptado de “Software Excel, 2018”. Por José Salinas, 2018.

Conclusiones y Recomendaciones

- Al presentar las variaciones en las cantidades de CMC los microorganismos presentan una formación de colonias de mayor tamaño y mucho más definidas con respecto a una menor concentración de CMC:
 - CMC 0,5%; las formaciones de unidades de colonias son mayores; presentando un diámetro de halo inferior a concentraciones superiores de CMC.
 - CMC 1%; Presentan una menor concentración en los recuentos de colonias, pero el diámetro del halo es superior con respecto a la anterior concentración.
 - CMC 2%; El número de colonias presentes en esta concentración es bajo, casi que nulo, pero el diámetro de su halo se encuentra en un rango intermedio entre 0,5 y 1% de CMC.
 - En ocasiones se encontraba en proporciones inversamente proporcionales con respecto al potencial celulolítico de las bacterias y su número de colonias, a diferentes concentraciones de CMC.
- Los aislamientos con mayor número de fueron los bacterianos en comparación con los hongos. Sin embargo, los hongos presentes produjeron los halos de mayor tamaño, aunque en el momento de realizar una extrapolación del potencial celulolítico a partir de las cepas bacterianas se obtuvo una correlación de dependencia entre la concentración de diésel al que fueron expuestos y la expresión de la capacidad enzimática, caso totalmente opuesto por los hongos filamentosos, ya que a partir del indicador cero, se infiere la no correlación entre la capacidad de los hongos y la concentración de diésel empleado.
- Las cepas que se aislaron de predios de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía, ubicado en suelos del Piedemonte Llanero, contaminados con diésel a distintas concentraciones; fueron 119 microorganismos, (80 cepas de bacterias y 39 cepas de hongos) con capacidad para degradar la celulosa en la forma CMC, de los cuales, presentaron una mayor capacidad nueve cepas bacterianas; N0b1, N0b2, N0b3, N1b1, N1b2, N1b3, N2b1, N2b2 y N2b3 y tres cepas de hongos filamentosos; N0h1, N1h2 y N2h3, y a los que se les hizo la determinación del potencial celulolítico.

- La cepa bacteriana que presentó mayor potencial celulolítico fue N0b1, seguida de cepa N2b2 y la cepa de hongo filamentoso que presentó mayor potencial celulolítico fue N0h1. Estas cepas son preservadas para estudios futuros.
- Según los resultados obtenidos por el número de colonias formadoras en cada uno de los tratamientos a distintas concentraciones de diésel se puede inferir que el reactor con una concentración de 0 g/kg de diésel presentó un mayor número de colonias en medio de CMC al 1% con $3,9 \times 10^5$ UFC/10 ml; pero al ir aumentando la concentración del contaminante disminuye el recuento, así, el reactor con 2,4 g/kg de diésel presentó un recuento bacteriano de $1,0 \times 10^5$ UFC/10 ml; 6,1 g/kg de diésel con $2,3 \times 10^5$ UFC/10ml, no obstante se incrementa la densidad poblacional a 9,8 g/kg con un recuento de $3,8 \times 10^5$ UFC/10 ml, debido a que el objeto del estudio era la determinación del potencial celulolítico de cepas específicas, tan solo se realizó una vez, por tanto, se sugiere realizar un seguimiento de lecturas de unidades formadoras de colonia en un futuro estudio, que permitan explicar este comportamiento.
- El presente estudio contribuye al segundo objetivo “*Evaluar la densidad microbiana de bacterias y hongos asociados a los grupos funcionales de microorganismos del suelo en los ciclos biogeoquímicos de nitrógeno, fósforo y carbono, en un ensayo experimental in situ con dos tipos de contaminantes (gasolina y diésel)*” 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)*” (Méndez, et al; 2018, p.1), debido a que aporta el aislamiento y comportamiento de microorganismos endémicos con capacidades enzimáticas, como las celulasas, contribuyendo al conocimiento de los procesos de degradación y reincorporación a los ciclos biogeoquímicos de complejas estructuras carbonadas, permitiendo la formación de suelo, tan importante para el mantenimiento del frágil equilibrio ecosistémico del piedemonte Llanero.
- Para futuros estudios, se recomienda efectuar el análisis de absorción de la partícula de suelo con relación al diésel, que permita determinar el grado de saturación de la partícula; además de realizar la identificación de las cepas bacterianas N0b1, N0b2, N0b3, N1b1, N1b2, N1b3,

N2b1, N2b2 y N2b3y hongos filamentosos N0h1, N1h2 y N2h3, mediante tipificación molecular y someter las cepas que presentaron mayor potencial a otras concentraciones y tipos de complejas estructuras carbonadas para determinar su comportamiento.

- Se puede inferir que en el aumento de la M.O en el matriz suelo de cada uno de los tratamientos y el potencial celulolítico de las bacterias se asocia al incremento progresivo en los niveles de diésel aplicados al sustrato de suelo.
- Como reflexión final es importante mencionar que el vertimiento elevado de las concentraciones hidrocarburos en el suelo conlleva a su degradación total o parcial, alterando la calidad físicas y químicas del mismo, principalmente por problemas de reducción de los microorganismos presentes en el suelo los cuales resultan importantes para el ciclaje de los nutrientes. A pesar de que dichos suelos puedan presentar óptimos niveles para su implementación agrícola no quedan exentos de presentar algún tipo de vertido, el cual puede ser depurado y mejorado el sustrato implementando microorganismos endémicos con actividad celulolítica.
- Como reflexión final es importante mencionar que un manejo inadecuado de los oxisoles del piedemonte llanero puede conllevar a su degradación total, afectando la calidad química y física de los mismos, principalmente por problemas de compactación, aumento de la acidez, pérdida de la fertilidad y de la capacidad de almacenamiento del agua en el suelo. Sin embargo estos suelos podrían estar entre los mejores del mundo, si se realizan un buen manejo agrícola, como: utilización de variedades de plantas tolerantes a la acidez que sean eficaces y eficientes en la toma y utilización de los nutrientes principalmente del fósforo, fertilización focalizada de acuerdo a los análisis de suelos y a los requerimientos nutricionales del cultivo, cero labranza, cultivos asociados con abonos verdes, cultivos intercalados, cultivos con coberturas vegetales, praderas con árboles y conservación y aumento de la materia orgánica del suelo.

Referencias bibliográficas

- Abril, A., González, C. (1999). Dinámica de la fertilidad y de las poblaciones microbianas en suelos afectados por incendios en las sierras de córdoba (argentina). *AgriScientia*, 16(0) Obtenido de: <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/agris/article/view/2617>
- Alcaldía de Villavicencio. (2016). Parque automotor de Villavicencio llega a casi 80.000 vehículos. Obtenido de: [villavicencio.gov.co](http://www.villavicencio.gov.co) Obtenido de: <http://www.villavicencio.gov.co/NuestraAlcaldia/SalaDePrensa/Paginas/Parque-automotor-de-Villavicencio-llega-a-casi-80-000-vehiculos.aspx>
- American Psychiatric Association. (2017). Guía de Estudio DSM-5 Editorial Médica Panamericana. México. D.F. Obtenido de: <http://www.medicapanamericana.com/VisorEbookV2/Ebook/9788498359756>
- Arrieta, O., Rivera, A., Arias, L., Rojano, Alberto., Ruiz, O., & Cardona, S. (2012). Biorremediación de un suelo con diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión Y Ambiente*, 15(1) Obtenido de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/gestion/article/view/30815>
- Barragán, D; Lesmes, A. (2009). Comparacion de dos metodos de conservacion, liofilizacion y microsecado sobre tres especies bacterianas”: eleccion del mejor método Trabajo de grado. (Pontificia Universidad Javeriana). Obtenido de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8468/tesis432.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Base Antartica Española Juan Carlos I. (Junio de 2007). Plan de contingencia sobre derrames de combustible. Obtenido de Unidad de tecnología Marina: <https://eies.ats.aq/Ats.IE/ContingencyFileUpload/Plan%20contingencia%20derrames%20combustible-JCI.pdf>
- Belabbas, A., Boutoutaou, D., Segai, S., & Segni, L. (2016). Soil contamination by petroleum products. southern algerian case. Obtenido de: doi:10.1063/1.4959436
- Beltrán, M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia. Tecnología Agropecuaria*, 15(1), p.101-113. Obtenido de: <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v15n1/v15n1a09.pdf>

- Betancur, B., Peñuela, G., Cardona, S., & Pino, N. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas: Caso DDT. *Gestión Y Ambiente*, 16(3) Obtenido de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/gestion/article/view/33173>
- Bonnet, J. A. (1968). La ciencia del suelo. San Juan: Colegio de Ingenieros, Arquitectos y Agrimensores de Puerto Rico. Obtenido de: [http://hdl.handle.net/2027/uc1.\\$b691649](http://hdl.handle.net/2027/uc1.$b691649)<http://hdl.handle.net/2027/txu.059173023984785>
- Borras, G. (2008). Efectos de los hidrocarburos en la salud humana. Por Gonzalo Borrás Carnero - CETMAR ~ ECO Natural. Obtenido de: Eco Natural. Obtenido de: <http://econatural-sva.blogspot.com/2011/05/efectos-de-los-hidrocarburos-en-la.html>
- Bossert, I. D. and Compeau, G. C. (1995). Cleanup of petroleum hydrocarbon contamination in soil, in L. Young and C. E. Cerniglia (eds), *Microbial Transformation and degradation of Toxic Organic Chemicals*.
- Calao, J. (2007) Caracterización ambiental de la industria petrolera: tecnologías disponibles para la prevención y mitigación de impactos ambientales. Tesis de Pregrado, Universidad Nacional de Colombia. Obtenido de: http://bdigital.unal.edu.co/823/1/15646742_2009.pdf
- Camacho, A., Giles, M., Ortégón, A., Palao, M., Serrano, B., & Velázquez, O. (2009). Cuenta en placa de bacterias. Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México. Obtenido de: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf
- Camacho, A., Martínez, L., Ramírez, H., Valenzuela, R. & Valdés, M. (2014). Potencial de algunos microorganismos en el compostaje de residuos sólidos. *Terra Latinoamericana*, 32(4), p.291-300. Recuperado en 16 de mayo de 2019, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792014000400291&lng=es&tlng=es.
- Camara de Comercio de Bogotá. (2017). Balance de la economía de la región Bogotá-Cundinamarca. Obtenido de [ccb.org.co](https://www.ccb.org.co): https://www.ccb.org.co/content/download/38898/922925/version/4/file/CCB_Balance+de+la+Economia+de+la+regi%C3%B3n+Bogot%C3%A1+Cundinamarca+2017.pdf
- Cando, M. (2011). Determinación y análisis de un proceso de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Trabajo de grado. (Universidad Politécnica Salesiana). Obtenido de: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/1520/11/UPS-CT002143.pdf>

- Carrillo, A., & Páez, S. (2015). Temática del humor político en las caricaturas de la sección Justicia Infinita del diario El Comercio. Trabajo de grado. Pontificia universidad católica del ecuador Obtenido de: doi:10.13140/RG.2.2.35210.11201
- Cerda, L. A. (2016). Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico paplero (Universitat de Barcelona). Obtenido de: <https://www.tesisenred.net/handle/10803/398119>
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL). (2014). Proyecciones de Población = población Proyecciones. Obtenido de: <https://lhzbw.gbv.de/PPNSET?PPN=818626550>
- Comisión Nacional para el Uso Eficiente de la Energía (CONUEE). (s.f.). ¿Cómo se producen los combustibles? Obtenido de Derivados del petroleo - Diesel: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/241728/DieselFT.pdf>
- Cortes, A., & Varón, C. (2018). Efecto de borde sobre la vegetación emergente en áreas fragmentadas de piedemonte en la reserva forestal protectora caño vanguardia y quebrada vanguardiuño, Villavicencio – Meta. Trabajo de grado. Facultad de Ingeniería Ambiental, Universidad Santo Tomás. Obtenido de: <https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/13673/2018albertocortes.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Davila, G., & Vazquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico, 30, p.29-55. Obtenido de: <https://www.researchgate.net/publication/259781277>
- Decreto 1471. (2014). Por el cual se reorganiza el Subsistema Nacional de la Calidad y se modifica el Decreto 2269 de 19.93. Bogotá, Colombia: Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. Obtenido de https://www.inm.gov.co/images/Normatividad/Decretos/DECRETO_1471_DEL_5_DE_AGOSTO_DE_2014.pdf
- Decreto 4299. (2005). por el cual se reglamenta el artículo 61 de la Ley 812 de 2003 y se establecen otras disposiciones. Bogotá, Colombia: Ministerio de Minas y Energía. Obtenido de <https://www.minenergia.gov.co/documents/10180/674559/Proyecto+Consolidad+de+Decreto+Unico+MME+NumeradoPublicacion.pdf/cdfdd333-251f-4808-af50-2749154350c7>

- Decreto No. 1073. (15 de Mayo de 2015). Por medio del cual se expide el Decreto Único Reglamentario del Sector Administrativo de Minas y Energía. Bogotá, Colombia: Ministerio de Minas y Energía. Obtenido de <https://www.minenergia.gov.co/documents/10180/170046/Decreto+%f2nico+Reglamentario+Sector+Minas+y+Energ%92a.pdf/8f19ed1d-16a0-4a09-8213-ae612e424392>
- Definición ABC. (2009). Definición de Halo. Recuperado de: <https://www.definicionabc.com/general/halo.php>
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE). (2015). Informe de coyuntura económica regional - Villavicencio, Meta. Obtenido de: https://www.dane.gov.co/files/icer/2015/ICER_Meta2015.pdf
- EcuRed.cu. (2018). Cultivos puros. Obtenido de: EcuRed Obtenido de: https://www.ecured.cu/index.php?title=Cultivos_puros&oldid=3258106.
- Enciclopedia en red del gobierno de Cuba (Ecured). (2018). Cultivos puros. Recuperado el 17 de enero de 2019, de [ecured.cu: https://www.ecured.cu/index.php?title=Cultivos_puros&oldid=3258106](https://www.ecured.cu/index.php?title=Cultivos_puros&oldid=3258106).
- Fernández, C., Díaz, L., Illnait, M., Aragonés, C., Martínez, G., & Perurena, M. (2012). Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de Histoplasma y Cryptococcus. Revista Cubana de Medicina Tropical, 64(1), 49-54. Recuperado en 17 de mayo de 2019, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602012000100007&lng=es&tlng=es.
- Ferreras, M. (2002) Control de la actividad enzimática del complejo RNasa-inhibidor de RNasa de testículo de cerdo. Tesis de grado. Universidad Complutense de Madrid. Obtenido de: <https://eprints.ucm.es/4135/1/T18892.pdf>
- Gaitán, D. & Pérez, L. (2007). Aislamiento y evaluación de microorganismos celulolíticos a partir de residuos vegetales frescos y en compost generados en un cultivo de crisantemo (*dendranthema grandiflora*) Trabajo de grado. (Pontificia Universidad Javeriana). Obtenido de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8296/tesis274.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Gutiérrez R., Pinzón V., Casas, A., & Martínez, M. (2008). Determination of cellulolytic activity of soil from *Stevia rebaudiana* Bertoni crops. Agronomía Colombiana, 26(3), p.497-504.

- Obtenido de: May 17, 2019, Obtenido de:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99652008000300015&lng=en&tlng=en.
- Guzmán, F. (2002). El estudio financiero y la evaluación de proyectos en ingeniería. Ingeniería e Investigación, 0(50), p.19-29. Obtenido de:
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/ingenv/article/view/21419>
- Halden, R. U., Tepp, S. M., Halden, B. G., & Dwyer, D. F. (1999). Degradation of 3-phenoxybenzoic acid in soil by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310(pPOB) and two modified *Pseudomonas* strains. Applied and environmental microbiology, 65(8), p.3354–3359. Obtenido de:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91504/pdf/am003354.pdf>
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2009). NTC 5698-1: Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Metodo horizontal para la enumeración de mohos y levaduras. Parte 1: técnica de recuento de colonias en productos con actividad acuosa (Aw) superior a 0,95. Obtenido de: May 17, 2019, from ICONTEC website: <https://ecollection-icontec-org.crai-ustadigital.usantotomas.edu.co/normavw.aspx?ID=4987>
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (2012). NTC 4983: Calidad del aire. Evaluación de gases de escape de vehiculos automotores que operan con ciclo otto. Método de ensayo en marcha mínima (ralentí) y velocidad crucero, y especificaciones para los equipos empleados en esta evaluación. Obtenido de:
<http://cdaavenidasexta.com/wp-content/uploads/2015/11/NTC4983.pdf>
- Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). (1970). NTC 417: Pulpas. Definiciones y clasificación. Obtenido de: <https://ecollection-icontec-org.crai-ustadigital.usantotomas.edu.co/normavw.aspx?ID=3223>
- Instituto Geográfico Agustín Codazzi - IGAC. (2016). Meta: un territorio más para conservar que para producir. Obtenido de: May 17, 2019, from IGAC Noticias Obtenido de:
<https://noticias.igac.gov.co/es/contenido/meta-un-territorio-mas-para-conservar-que-para-producir>
- Izquierdo, R; Venegas, S. (n.d.). La materia orgánica del suelo. papel de los microorganismos. Obtenido de: [https://www.ugr.es/~cjl/MO en suelos.pdf](https://www.ugr.es/~cjl/MO%20en%20suelos.pdf)

- Jaramillo, D. (2002). Introducción a la ciencia del suelo. Obtenido de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2242/1/70060838.2002.pdf>
- Junco, R., & Rodríguez, M. (2001). Cultivo y crecimiento de los microorganismos. En: Microbiología y Parasitología Médicas. P.45-54. Obtenido de: https://www.researchgate.net/publication/288670374_Cultivo_y_crecimiento_de_los_microorganismos
- Khan Academy. (n.d.). Resumen del metabolismo. Obtenido de: May 17, 2019, from [es.khanacademy.org](https://es.khanacademy.org/science/biology/energy-and-enzymes/energy-in-metabolism/a/overview-of-metabolism). Obtenido de: <https://es.khanacademy.org/science/biology/energy-and-enzymes/energy-in-metabolism/a/overview-of-metabolism>
- Ladino, O. E., David Rubio, J., & Chacin Zambrano, C. A. (2016). Evaluación de dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite. Centro Agrícola, p.36-41. Obtenido de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852016000200005&lng=en&tlng=en
- Lozano-Rivas, W. (2016). Suelos: Guía de prácticas simplificadas en campo y laboratorio. Bogotá, Colombia: Universidad Piloto. Obtenido de: <http://www.jstor.org/stable/j.ctv8j5r0>
- Luna, J. (2012). Manual de prácticas de laboratorio: microbiología general y aplicada. Obtenido de: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliotecaustasp/detail.action?docID=5045535&query=Manual+de+prácticas+de+laboratorio%3A+Microbiología+general+y+aplicada#>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR, 66(4), p.506–77, Obtenido de: <https://doi.org/10.1128/membr.66.3.506-577.2002>
- MADR-UPRA. (2018). Identificación general de la frontera agrícola en Colombia. Escala 1:100.000. Obtenido de: [https://www.minagricultura.gov.co/Normatividad/Projects_Documents/IDENTIFICACION_GENERAL_DE_LA_FRONTERA .pdf](https://www.minagricultura.gov.co/Normatividad/Projects_Documents/IDENTIFICACION_GENERAL_DE_LA_FRONTERA.pdf)
- Martin. (1980). Introducción a la microbiología del suelo. . México: AGT. México 18, D.F.
- Martínez, A. & Delgado, M. (2018). Estudio sobre el impacto de la actividad petrolera en las regiones productoras de Colombia. Caracterización departamental Meta (63rd ed.). Obtenido de:

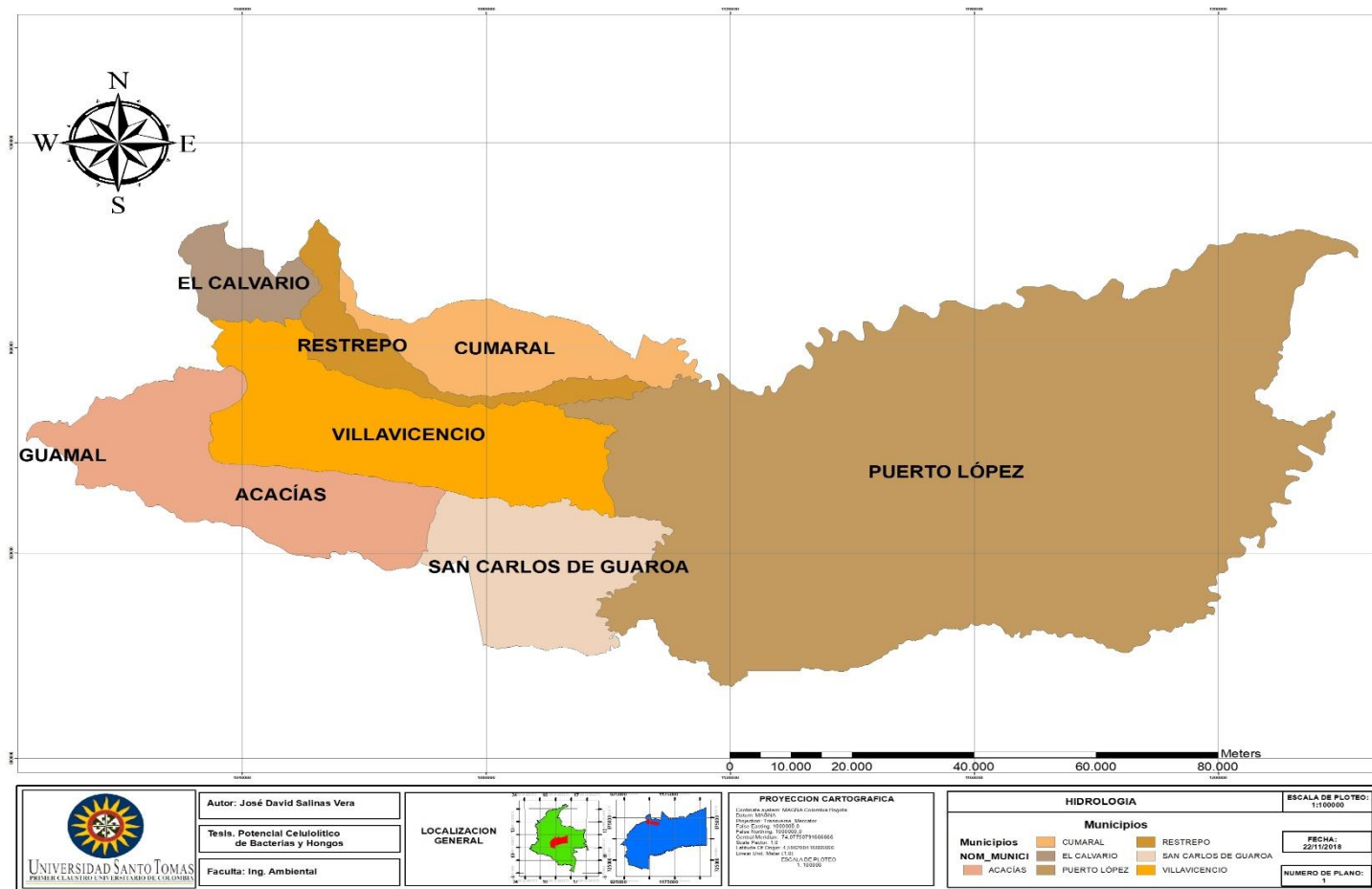
- https://www.repository.fedesarrollo.org.co/bitstream/handle/11445/3618/CDF_No_63_Abril_2018.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Martínez, A. (2012). Biosorción del colorante rojo congo en sistemas en lote utilizando biomasa de *Chlorella* sp Trabajo de grado. (Universidad Autónoma de Nuevo León). Obtenido de: <http://eprints.uanl.mx/3793/1/1080242015.pdf>
- Martínez. (2001). El manejo de los suelos residuos sólidos para la nutrición de suelos. Revista Agricultura de las Américas. No.301, p. 26-28 Adelsa. Bogotá
- Mateu, L., Huguet, J., Errando, C., Breda, A., & Palou, J. (2018). Cómo escribir un artículo original. Obtenido de: [doi://doi-org.crai-ustadigital.usantotomas.edu.co/10.1016/j.acuro.2018.02.011](https://doi-org.crai-ustadigital.usantotomas.edu.co/10.1016/j.acuro.2018.02.011)
- Medigraphic: Literatura Biomédica. (2008). Diversos artículos consultados. Revista Latinoamericana de Microbiología, 50(1–4). Obtenido de: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/contenido.cgi?IDPUBLICACION=1866>
- Méndez, M. & Riveros, M. (2017). 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), Propuesta de investigación. Universidad Santo Tomás. Villavicencio. Obtenido de: <http://www.ustavillavicencio.edu.co/home/media/attachments/2018/04/12/proyec4.pdf>.
- Ministerio de Minas y Energía. (2012). Hidrocarburos. Obtenido de: <https://www.minenergia.gov.co/documents/10180/614096/2-Hidrocarburos.pdf/75855d82-def9-4ccb-9fe4-2d4ee97f9123>
- Mulas, R. (2013). Tratamiento y recuperación de suelos contaminados. Obtenido de http://datateca.unad.edu.co/contenidos/358046/ENTORNO_DE_CONOCIMIENTO/UNIDAD_2/Fundam_Biorremediacion.pdf
- Navarrete, J. (2017). Tendencias y retos en la agricultura mundial (I). Obtenido de: May 17, 2019, from El Economista website: <https://www.eleconomista.com.mx/opinion/Tendencias-y-retos-en-la-agricultura-mundial-I-20170327-0006.html>
- Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO). (1964). Reconocimiento edafológico de los llanos orientales – Colombia: Informe general. Obtenido de: <http://www.fao.org/3/27262s/27262s.pdf>

- Pedraza, D. (2014). Evaluación de la actividad enzimática de aislamientos microbianos celulolíticos y lignolíticos, y su aplicación en la degradación de tamo de arroz (*Oryza sativa*) Trabajo de grado. (Universidad Nacional de Colombia). Obtenido de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/39502/1/186892.2014.pdf>
- Pérez, J. & Gardey, A. (2014). Definición de tinción - Qué es, Significado y Concepto. Obtenido de: definicion.de website: <https://definicion.de/tincion/>
- Pérez, J. & Gardey, A. (2015). Definición de agar - Qué es, Significado y Concepto. Obtenido de: definicion.de website: <https://definicion.de/agar/>
- Pérez, J. & Gardey, A. (2011). Definición de aislamiento - Qué es, Significado y Concepto. Obtenido de: definicion.de website: <https://definicion.de/aislamiento/>
- Pérez, J. & Gardey, A. (2012). Definición de bioquímica - Qué es, Significado y Concepto. Obtenido de: definicion.de website: <https://definicion.de/bioquimica/>
- Pérez, J. & Gardey, A. (2012). Definición de hidrocarburos - Qué es, Significado y Concepto. Obtenido de: definicion.de website: <https://definicion.de/hidrocarburos/>
- Prenafeta-Boldú, F. X., Vervoort, J., Grotenhuis, J. T., & Van Groenestijn, J. W. (2002). Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. *Applied and environmental microbiology*, 68(6), p.2660–2665. Obtenido de: doi:10.1128/aem.68.6.2660-2665.2002
- Primavesi, A. (1984). Manejo Ecológico Del Suelo (Parte 1/2). In Librería El Ateneo Editorial (5th ed.). Obtenido de: <https://es.scribd.com/doc/168200753/Manejo-Ecologico-Del-Suelo-Ana-Primavesi-1984-Parte-1-2>
- Pueyo., J.(2002). Introducción. La biotecnología aplicada al medio ambiente. Ciencia y medio ambiente – CCMA-CSIC. p.265-266. Madrid. Obtenido de: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/27511/1/2002%20Pueyo%20Ciencia%20y%20Medio%20Ambiente.pdf>
- Rincón C., A. y Caicedo G., S. 2010. Monitoreo de las condiciones de los suelos establecidos con la asociación maíz/pastos para la recuperación praderas degradadas en el piedemonte llanero. En: Memorias. XV Congreso Colombiano de la Ciencia del Suelo. El suelo: soporte de la biodiversidad y la producción en los agroecosistemas tropicales. Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo. Comité Regional Eje Cafetero. (CD-ROM).

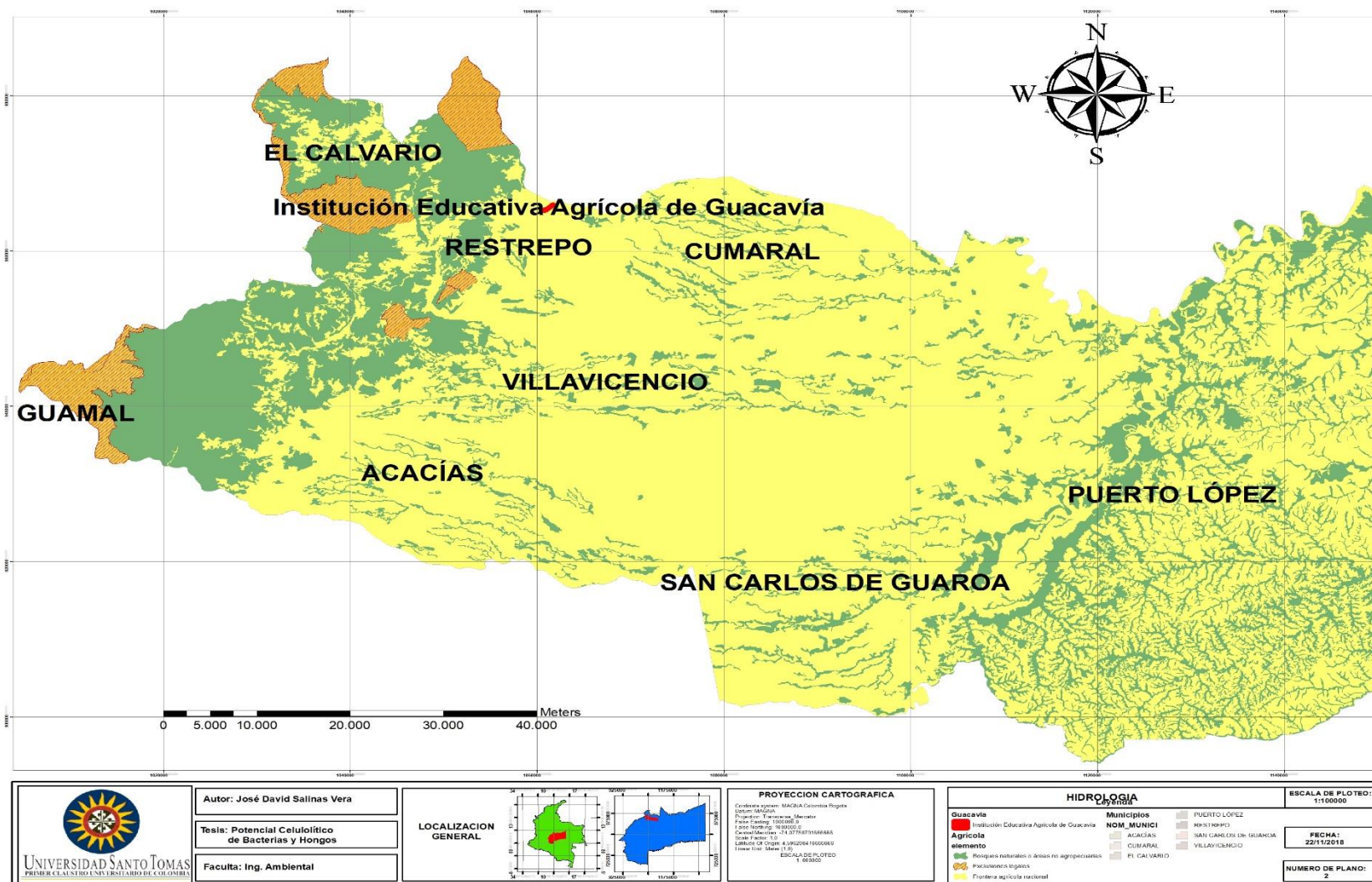
- Rodríguez, D. (2007). Diseño de la estructura organizacional del centro de investigaciones y estudios en biodiversidad y recursos genéticos (CIEBREG) Trabajo de grado. (Universidad Tecnológica de Pereira). Obtenido de: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/handle/11059/801>.
- Rodríguez, L. (2015). Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos Trabajo de grado. (Universidad Nacional de Trujillo). Obtenido de: http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4586/Rodríguez_Silva%2C_Luis_Arturo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Schwarz, W. H. (2002). The cellulases and their application in degrading agro-industrial waste. Revista Colombiana de Biotecnología, Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/4808990.pdf>
- Sociedad Española de Hipertensión. (2015). Resúmenes de artículos. Hipertensión y Riesgo Vascular, 32(3), p.97-130. Obtenido de: <https://www.sciencedirect-com.crai-ustadigital.usantotomas.edu.co/journal/hipertension-y-riesgo-vascular/vol/32/issue/3>
- Sylvia, D.; J. Fuhrman; P. Hartel and D. Zuberer. (2005). Principles and applications of soil microbiology. 2a ed. Pearson Prentice Hall. New Jersey. 650 p.
- Terán, E., & Ramiro, E. (2008). Obtención de carboximetilcelulosa a partir de linter de algodón. Revista Investigación & Desarrollo, 1(7), p.100-113. Obtenido de: <http://www.upb.edu/revista-investigacion-desarrollo/index.php/id/article/download/100/264>
- The International Council On Clean Transportation (ICCT). (2011). Introducción a la refinación del petróleo y producción de gasolina y diésel con contenido ultra bajo de azufre. Obtenido de: https://www.theicct.org/sites/default/files/ICCT_RefiningTutorial_Spanish.pdf
- Torres, E. R. (2011). Pequeños gigantes. Industria Alimenticia, 22(6), 8. Obtenido de: <https://search-proquest-com.ezproxy.uniminuto.edu/docview/871497279?accountid=48797>
- Torres, K. & Zuluaga, T. (2009). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos Trabajo de grado. (Universidad Nacional de Colombia). Obtenido de: http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf

- Trujillo, M., & Ramírez, J. (2012). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental.*, 3(2), p.37-62. Obtenido de: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5344956.pdf>
- Universidad de Alcalá. (2018). Bioquímica ambiental. Obtenido de Módulo 1.-Introducción a la bioquímica ambiental: http://www3.uah.es/bioquimica/Tejedor/bioquimica_ambiental/T2.htm
- Universidad Nacional de Rosario. (2018). Parte II. Siembra y aislamiento de microorganismos. En *Microbiología 2018 trabajo práctico N° 2: Cultivo de microorganismos*. Rosario: Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Obtenido de https://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/160516/mod_resource/content/1/2018%20TP2%20Farmacia.pdf
- Uribe, B. (2011). Intervention: Ministry of the Environment, Housing and Territorial Development. *Revista de Ingeniería*, (35), p.52-54. Obtenido de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-49932011000300010&lng=en&tlng=en.
- Vílchez-Fernández, O. & Ulloa-Carcasés, M. (2015). Evaluación del impacto ambiental por presencia de hidrocarburos en el fundo Los Clavelitos. *Revista Minería y Geología*, 31(3), p.91-108. Obtenido de: <https://www.redalyc.org/html/2235/223541592007/>
- Villa, A. F., Cárdenas, E. A., Pabón, M. L., Carulla, J., & Meléndez, A. P. (2010). Estudio microbiológico y calidad nutricional del ensilaje de maíz en dos ecorregiones de Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 23(1), p.65-77. Obtenido de: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/oaiart?codigo=3237401>
- Volke, T; Velasco, J. & Rosa, D. (2005). Suelos contaminados por metales y metaloides (Instituto Nacional de Ecología, Ed.). Obtenido de: [http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/B1E761B1E2F24A5C05257D490070F94F/\\$FILE/SuelosContaminadosPorMetalesYMetaloides.pdf](http://www2.congreso.gob.pe/sicr/cendocbib/con4_uibd.nsf/B1E761B1E2F24A5C05257D490070F94F/$FILE/SuelosContaminadosPorMetalesYMetaloides.pdf)
- Zorro, J. (2007). Anuros de piedemonte llanero: Diversidad y Preferencias de microhábitat. Obtenido de: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8941/tesis88.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Anexos

Anexo 1. Límites entre Villavicencio y Cumaral. Por José Salinas, 2018.

Anexo 2. Ubicación del Instituto Educativo Agrícola de Guacavia dentro de la frontera. Por José Salinas, 2018.



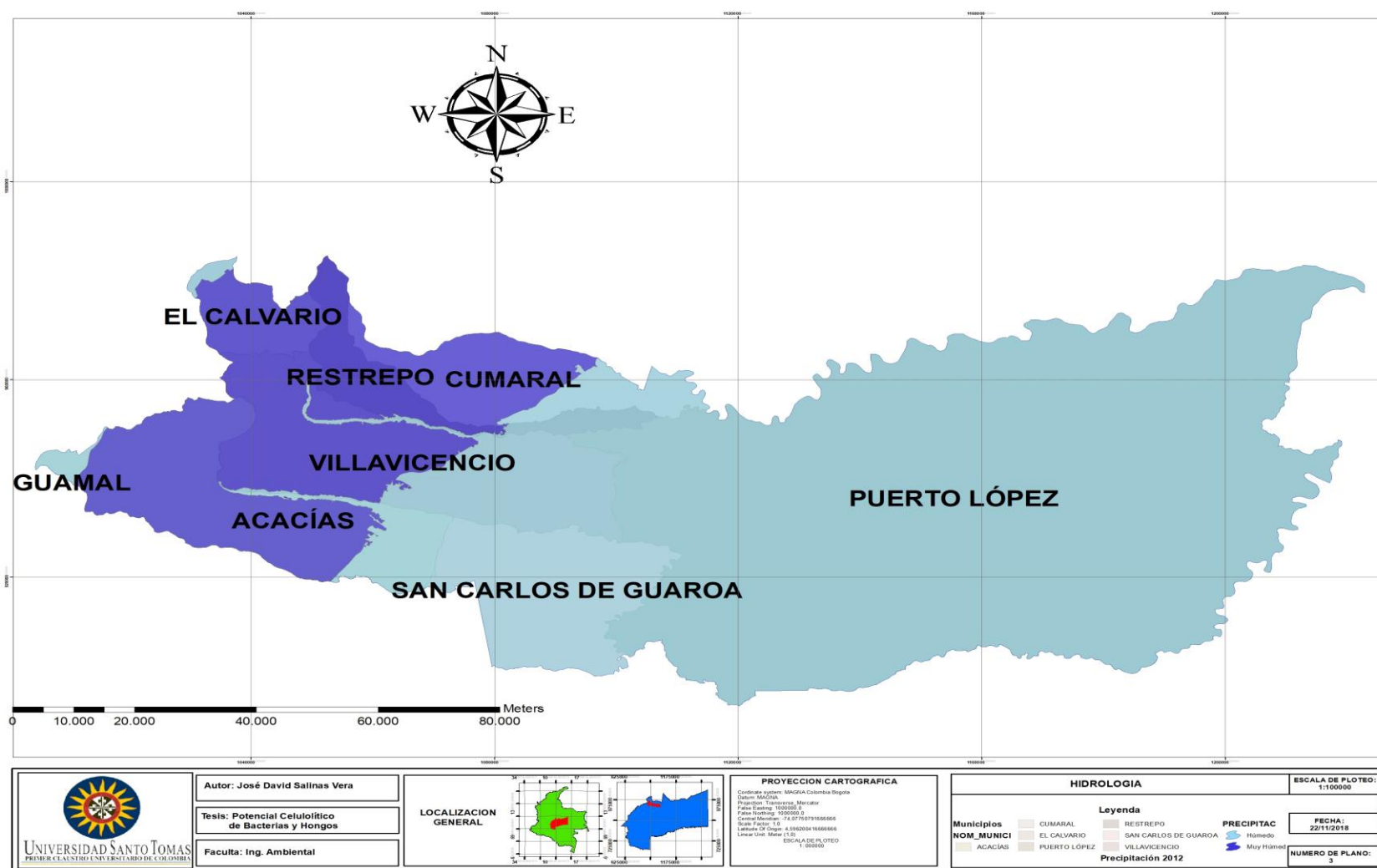
Anexo 3. Ficha técnica de la vigilancia tecnológica.

Facultad	Ingeniería Ambiental, Universidad Santo Tomás sede Villavicencio.
Objeto	Exponer los indicadores bibliométricos de las actividades científicas (artículos) relacionadas con el potencial biodegradación de las bacterias y hongos en suelos contaminados por diésel en el piedemonte del Municipio de Cumaral/ Meta en el Instituto Educativo Agrícola de Guacavia, durante el periodo de consulta del 1999 al 2017.
Tema	Aislamiento y Evaluación del potencial biodegradador de Bacterias y hongos celulolíticos en muestras de suelo contaminado con Diésel en el Instituto Educativo Agrícola de Guacavia.
Factor Crítico	Avances de la investigación científica (artículos) relacionada con el Análisis del potencial biodegradador de bacterias y hongos celulolíticos de suelos contaminados con diesel en Colombia.
Palabras clave	“biodegradable potential” “cellulolytic bacteria” “cellulolytic fungi” “soil” “diesel”
Periodo de consulta	1997 – 2019
Herramientas de consulta	Base de datos Scopus
Responsable	José David Salinas Vera

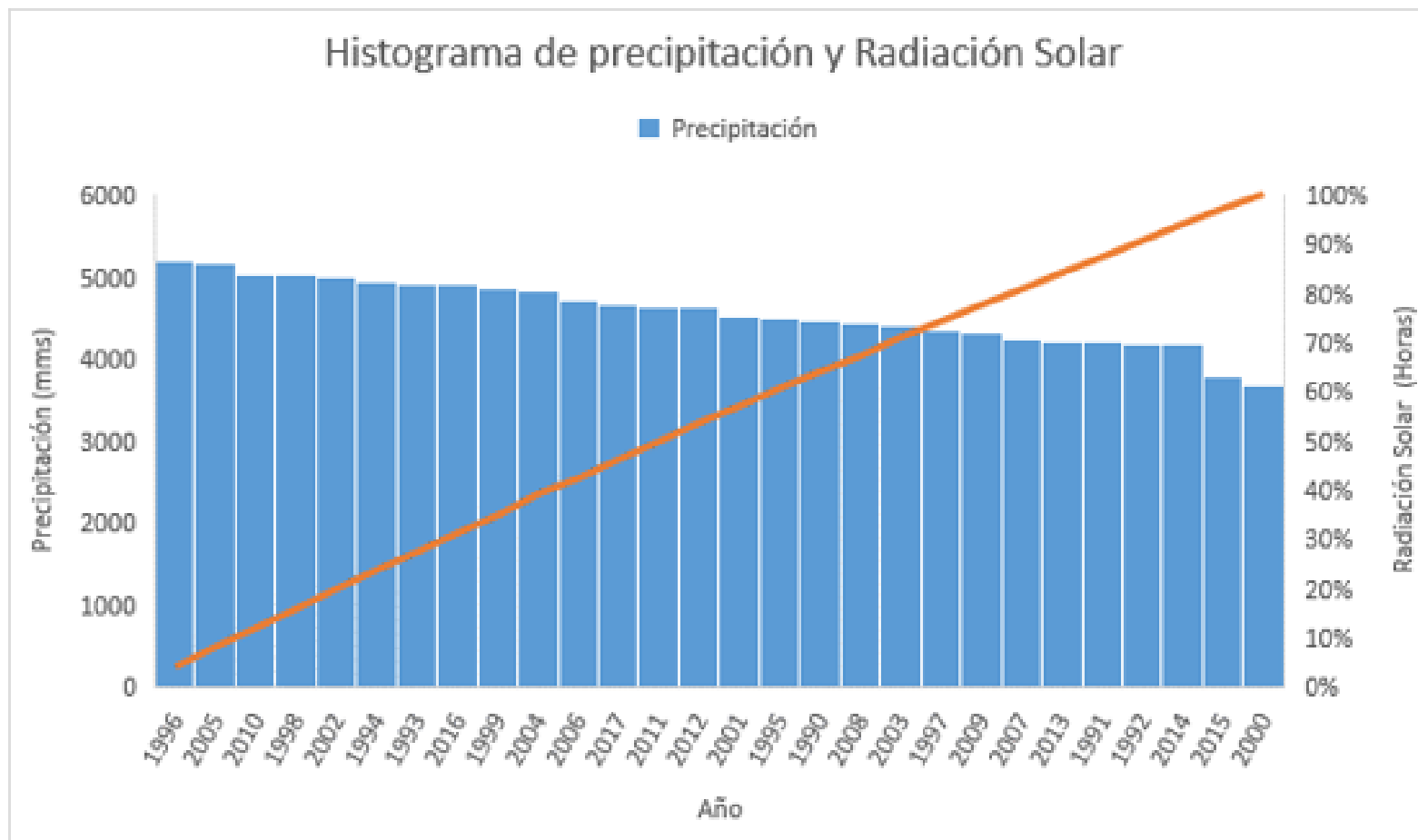
Anexo 4. Noticias de incidentes de vertimiento.

Fecha	Sitio	Cantidad derramada (gal)	Combustible derramado	Fuente
10/04/2012	Kilómetro 55+555 de la Vía que conduce de de Puerto López a Puerto Gaitan	3.000	Diésel	Transportes Álvarez y Biomax S.A.
2/05/2013	kilómetro 4 de la vía que de Villavicencio conduce a Bogotá.	4.200	Diésel	Transunidos Ltda – Petrobras Colombia Combustibles S.A
7/06/2013	Km 0,5 de la antigua vía que de Villavicencio conduce a Bogotá – Barrio Nueva Granada.	1.000	Diésel	Transportes VIGIA S.A.S. - Metapetroleum Corp.
30/09/2013	Km 128+300 Vía Puerto Gaitán – Campo Rubiales (Meta).	20	Diésel	ECOPETROL S.A.S
30/11/2013	Km 92, en la vía que conduce de Puerto Gaitán a Campo Rubiales,	1.000	Diésel	empresa IDEA TRANSPORTADORA S.A.S- ORGANIZACIÓN TERPEL S.A.
20/03/2015	Antigua vía Bogotá Villavicencio, kilómetro 92	4.500	Diésel	Rivarca S.A.S
25/04/2015	Km 43 Via Campo Rubiales, Municipio de Puerto Gaitán	20	Diésel	OPL Carga
24/10/2015	sector conocido como pozo azul (Caño San Andrés) ubicado en el Kilómetro 98 + 800 vía Villavicencio - Barranca de Upía.	10	Diésel	Transportes Iceberg de Colombia S.A
16/09/2016	km 102 + 100 via pto Lopez - pto gaitan Meta	40	Diésel	GRUPO CALDERON S.A.S

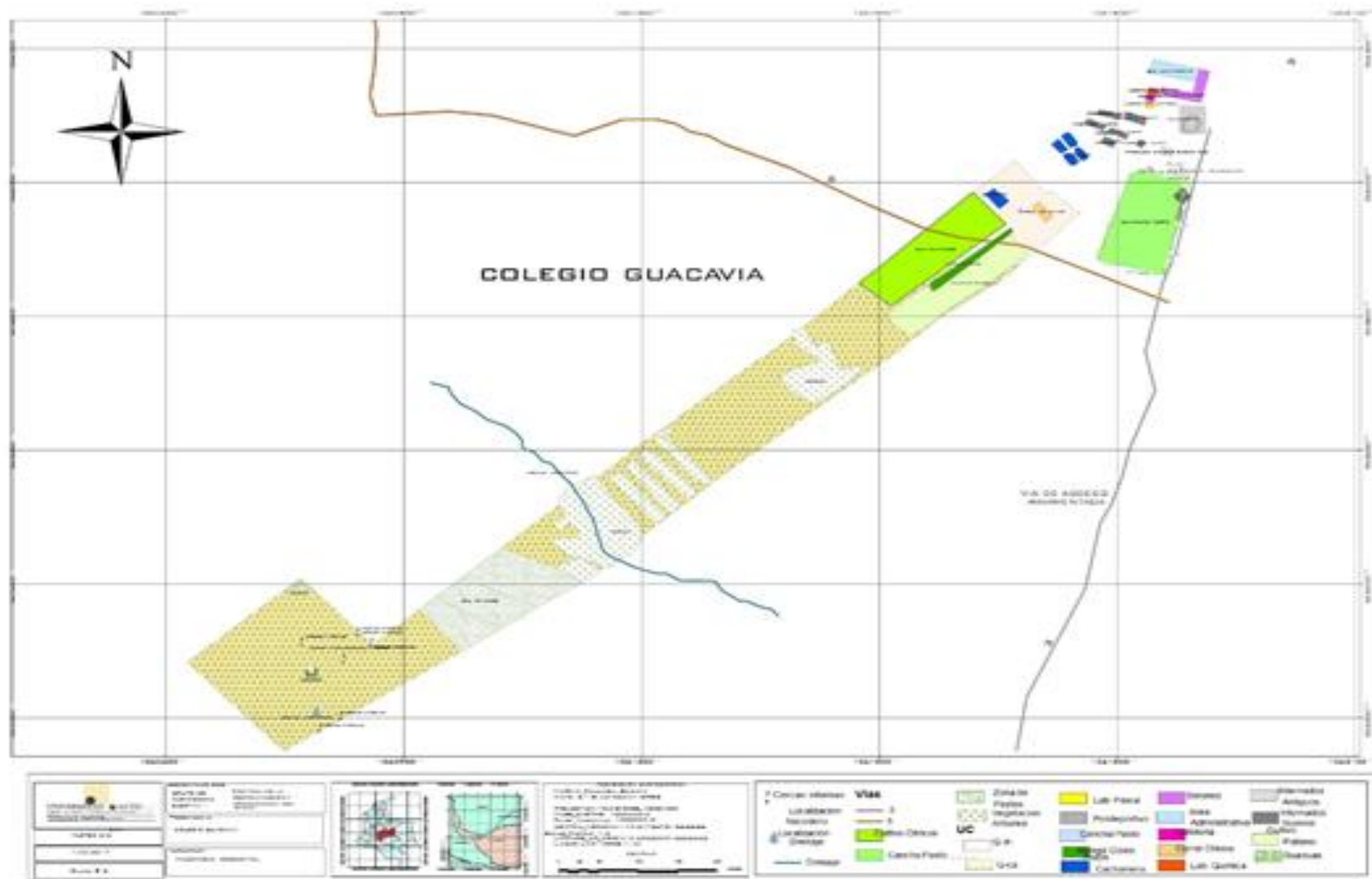
Anexo 5. Precipitación en zonas del Piedemonte Llanero. Por José Salinas, 2018.



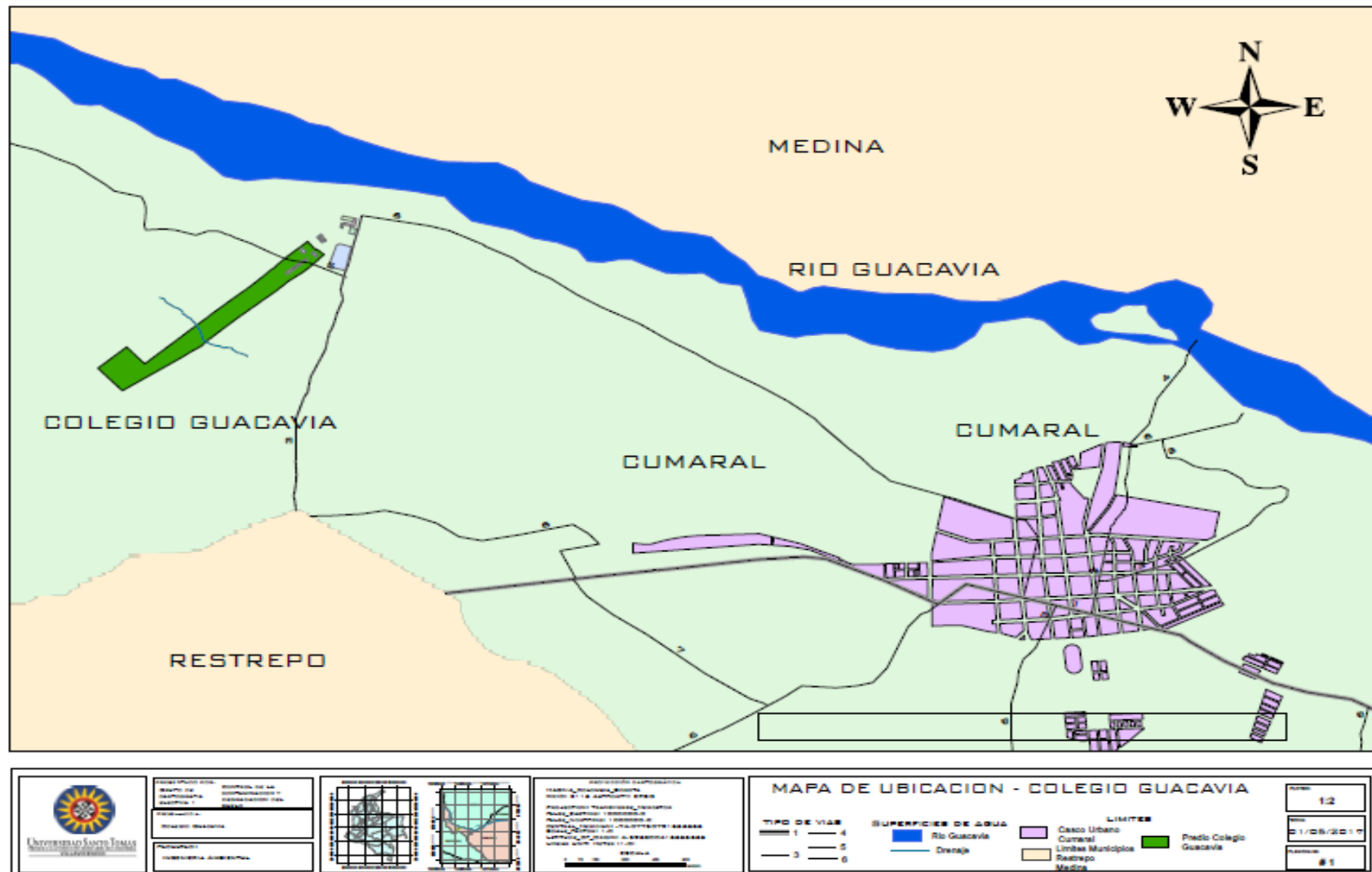
Anexo 6. Histograma de precipitación de la estación APTO VANGUARDIA. Por José Salinas, 2018.



Anexo 7. Instituto Agrícola Guacavía en el Municipio de Cumaral (Meta). Por Cesar Riveros, 2017.



Anexo 8. Cercanía del Instituto Agrícola Guacavía al Municipio de Cumaral (Meta). Por Cesar Riveros, 2017



Anexo 9. Anexo normativo. Por José Salinas, 2018.

Norma	Tema
Tratados Internacionales	
Declaración de Río de Janeiro sobre Medio Ambiente y Desarrollo 1992.	Constitución ambiental mundial que define, a partir de 27 principios básicos, los derechos y responsabilidades de las naciones en la búsqueda del progreso y el bienestar de la humanidad. Insiste, sobre todo, en el desarrollo humano, la protección de los recursos naturales, así como en la necesidad de actuar en favor de la paz y en contra de la pobreza.
Convenio RAMSAR	Para la protección de los humedales.
Convenio de Basilea	Regula el tránsito transfronterizo de sustancias tóxicas y peligrosas.
CONPES 2750 de 1994	Políticas sobre manejo de residuos sólidos
Constitución Nacional	
Artículo 8º	Es obligación del Estado y de las personas proteger las riquezas culturales y naturales de la Nación.
Artículo 49	La atención de la salud y el saneamiento ambiental son servicios públicos a cargo del Estado.
Artículo 67	La educación formará al colombiano en el respeto a los derechos humanos, a la paz y a la democracia; y en la práctica del trabajo y la recreación, para el mejoramiento cultural, científico, tecnológico y para la protección del ambiente.
Artículo 79	Derecho colectivo al Ambiente Sano y a participar en las decisiones que puedan afectarlo.
Artículo 80	El Estado planificará el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución. Además, deberá prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental.
Artículo 95	Son deberes de la persona y del ciudadano: ... 7: Proteger los recursos culturales y naturales del país y velar por la conservación de un ambiente sano.
Leyes	
Ley 23 de 1973	Principios fundamentales sobre prevención y control de la contaminación del aire, agua y suelo y otorgó facultades al Presidente de la República para expedir el Código de los Recursos Naturales
Ley 9ª. de 1979	Por la cual se establecen normas que regulan la protección de la salud pública y el Medio Ambiente.
Ley 29 De 1990	Es deber del Estado promover y orientar el adelanto científico y tecnológico y, por lo mismo, está obligado a incorporar la ciencia y la tecnología a los planes y programas de desarrollo económico y social del país y a formular planes de ciencia y tecnología tanto para el mediano como para el largo plazo.
Ley 99 de 1993	Crea el Ministerio del Medio Ambiente y la estructura del Sistema Nacional Ambiental –SINA-
Ley 430 de 1998	Por la cual se dictan normas prohibitivas en materia ambiental referentes a los desechos peligrosos y se dictan otras disposiciones.

Ley 491 de 1999	Define el seguro ecológico y delitos contra los recursos naturales y el ambiente y se modifica el Código Penal
Ley 685 de 2001	Código Minero
Ley 1333 de 2009	Procedimiento Sancionatorio Ambiental y crea el Comparendo Ambiental.
Ley 1382 de 2010	Reforma al Código de Minas (Inexequible)
Decretos 2811	
Decreto 1594 de 1984	Procedimiento Sancionatorio por daños al medio ambiente
Decreto 1865 de 1994	Reglamenta las funciones de las Corporaciones Autónomas Regionales
Decreto 605 de 1996	Reglamenta la ley 142 de 1994. En cuanto al manejo, transporte y disposición final de residuos sólidos
Decreto 1521 de 1998	Manejo, transporte y Distribución de Combustibles líquidos derivados del petróleo para estaciones de Servicio
Decreto 321 de 1999	Por el cual se adopta el Plan Nacional de Contingencia contra derrames de Hidrocarburos, Derivados y Sustancias Nocivas.
Decreto 1602 de 2002	Por el cual se modifica la Tabla de Clasificación de Actividades Económicas para el Sistema General de Riesgos Profesionales y se dictan otras disposiciones.
Decreto 1609 de 2002	Por el cual se reglamenta el manejo y transporte terrestre automotor de mercancías peligrosas por carretera.
Decreto 4741 de 2005	Por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y manejo de los residuos o desechos peligrosos generados en el marco de la gestión integral
<u>Decreto 2041 de 2014</u>	Todo lo referente a las licencias y trámites ambientales de hidrocarburos transporte.
Resoluciones	
<u>Resolución 2309/1986.</u>	Para manejo de Residuos especiales. Establece las normas sobre la identificación, almacenamiento, tratamiento, transporte, disposiciones sanitarias, control y vigilancia de residuos especiales.
Resolución 1433 de 2004 MAVDT	Ordena la formulación de los Planes de Saneamiento y Manejo de Vertimientos (PSMV) en los municipios.

Anexo 10. Parámetros, métodos y unidades de los datos químicos.

Determinación Analítica	Unidad	Método
pH	pH	VC R 004 Versión 03
Conductividad Eléctrica	dS/m	NTC 5596:2008
Materia Orgánica	g/100g	Walkey & Black
Fósforo Disponible (P) Bray II	mg/kg	VC-R-007 Versión 02
Azufre Disponible (S)	mg/kg	Fosfato Monobásico de Calcio
Acidez Intercambiable (Al+H)	cmol(+)/kg	KCl
Aluminio Intercambiable (Al)	cmol(+)/kg	KCl
Calcio Intercambiable (Ca)	cmol(+)/kg	ID-R-072_Versión_5
Magnesio Intercambiable (Mg)	cmol(+)/kg	ID-R-072_Versión_5
Potasio Intercambiable (K)	cmol(+)/kg	ID-R-072_Versión_5
Sodio Intercambiable (Na)	cmol(+)/kg	ID-R-072_Versión_5
Capacidad Intercambio Catiónico (CICE)	cmol(+)/kg	Suma de Cationes
Hierro Disponible (Fe) Olsen	mg/kg	NTC_5526:2007
Manganeso Disponible (Mn) Olsen	mg/kg	NTC_5526:2007
Zinc Disponible (Zn) Olsen	mg/kg	NTC_5526:2007
Cobre Disponible (Cu) Olsen	mg/kg	NTC_5526:2007
Boro Disponible (B)	mg/kg	Fosfato Monobásico de Calcio
Saturación Calcio	-	
Saturación Magnesio	-	
Saturación Potasio	-	<u>Saturación de bases</u>
Saturación Sodio	-	
Saturación Aluminio	-	
Relación Ca/Mg	-	
Relación (Ca+Mg)/K	-	
Relación Mg/K	-	<u>Relación iónica</u>
Relación Ca/B	-	

Nota. Parámetros, métodos y unidades de los parámetros químicos. Por Agrosavia, 2018.

Anexo 11. Datos obtenidos de los parámetros químicos por el laboratorio de suelos de Agrosavia.

Determinación Analítica	Unidad	Método	0 g/kg (Testigo)	Diésel 2,5 g/kg	Diésel 6,1 g/kg	Diésel 9,8 g/kg
pH	pH	VC R 004 Versión 03	5,37	5,3	5,2	5,28
Conductividad Eléctrica	dS/m	NTC 5596:2008	0,65	0,36	0,26	0,25
Materia Orgánica	g/100g	Walkey & Black	1,69	2,66	3,1	3,54
Fósforo Disponible (P) Bray II	mg/kg	VC-R-007 Versión 02	34,35	13,93	7,19	12,93
Azufre Disponible (S)	mg/kg	Fosfato Monobásico de Calcio	26,86	15,35	12,72	13,31
Acidez Intercambiable (Al+H)	cmol(+)/kg	KCl	0,05	0,16	0,21	0,21
Aluminio Intercambiable (Al)	cmol(+)/kg	KCl	0	0,08	0,02	0
Calcio Intercambiable (Ca)	cmol(+)/kg	ID-R-072_Versión_5	4,28	3,48	3,38	3,05
Magnesio Intercambiable (Mg)	cmol(+)/kg	ID-R-072_Versión_5	0,79	0,58	0,61	0,63
Potasio Intercambiable (K)	cmol(+)/kg	ID-R-072_Versión_5	0,46	0,35	0,33	0,35
Sodio Intercambiable (Na)	cmol(+)/kg	ID-R-072_Versión_5	0,15	<0,14	<0,14	<0,14
Capacidad Intercambio Catiónico (CICE)	cmol(+)/kg	Suma de Cationes	5,73	4,71	4,67	4,38
Hierro Disponible (Fe) Olsen	mg/kg	NTC_5526:2007	123,02	97,41	66,2	74,36
Manganeso Disponible (Mn) Olsen	mg/kg	NTC_5526:2007	32,04	48,58	47,73	60,21
Zinc Disponible (Zn) Olsen	mg/kg	NTC_5526:2007	4,32	3,92	3	3,71
Cobre Disponible (Cu) Olsen	mg/kg	NTC_5526:2007	1,39	1,25	<1	<1
Boro Disponible (B)	mg/kg	Fosfato Monobásico de Calcio	0,33	0,25	0,38	0,45
Saturación Calcio	-		<u>75</u>	<u>74</u>	<u>72</u>	<u>70</u>
Saturación Magnesio	-		14	12	13	14
Saturación Potasio	-	<u>Saturación de bases</u>	8	7	7	8
Saturación Sodio	-		3	3	3	3
Saturación Aluminio	-		0	2	0	0
Relación Ca/Mg	-		<u>5,4</u>	<u>6</u>	<u>5,6</u>	<u>4,9</u>
Relación (Ca+Mg)/K	-		10,9	11,7	12,2	10,4
Relación Mg/K	-	<u>Relación iónica</u>	1,7	1,7	1,9	1,8
Relación Ca/B	-		2570	2767	1779	1369

Nota. Resultados, parámetros, métodos y unidades de los parámetros químicos. Por Agrosavia, 2018.

Anexo 12. Tabla de las cepas de hongos encontradas.

Cepas de Hongos					
Testigo		Diésel 200 mL		Diésel 800 mL	
10 -	A B C	10 -	A B C	10 -	A B C
1	C -*	3	A *	3	B -1
3	A -1	3	A*2	3	B -3
3	A *1	3	B *	3	C -1
4	A *	3	B -*	4	A *
4	A 1*	3	B -2	4	A *3
4	A *1	4	A *	4	A *4
4	A -1	4	C *	4	B *_*
4	B *	5	A *	4	C -
5	A***2	5	A *_*	5	A -1
5	A***3	5	A -	5	A -3
5	B *	5	B -1	4	B *
6	A *			4	B *1
				4	B *2
				4	B*3
				4	B ***
				4	B *_*

Anexo 13. Tabla de las cepas Bacterianas.

Cepas Bacterianas														
Diésel 0 g/kg (Testigo)			Diésel 2,5 g/kg			Diésel 6,1 g/kg			Diésel 9,8 g/kg Mes 1			Diésel 9,8 g/kg Mes 2		
Cod	10 -	A B C	Cod	10 -	A B C	Cod	10 -	A B C	Cod	10 -	A B C	Cod	10 -	A B C
1A	1	B - 2	1B	1	B - 3	1C	2	B -	1D	2	C -	1E	1	C -
2A	3	B -	2B	2	B -2	2C	3	C *	2D	2	C -1	2E	1	C -1
3A	3	C -1	3B	3	C *	3C	4	A -	3D	2	C-1.2	3E	2	B *1
4A	3	C -1.1	4B	5	A *	4C	4	B -	4D	3	B -	4E	2	B *2
5A	3	C -1.2	5B	5	B *	5C	4	B -1	5D	3	B -1	5E	2	B *2.1
6A	6	C *	6B	5	B -2	6C	4	C *	6D	3	C -3	6E	3	A -
			7B	6	A *	7C	4	C -	7D	3	C -4	7E	3	A - 1
			8B	6	B *	8C	4	C - 1	8D	3	C -4.1	8E	3	A -1.1
			9B	6	C *	9C	5	C -	9D	4	A *	9E	3	C -1
						10C	6	A *	10D	4	A *2	10E	3	C -2
									11D	4	A *3	11E	3	C -3
									12D	4	A -4	12E	4	A *
									13D	4	A -7	13E	4	A -
									14D	4	B *	14E	5	A -
									15D	4	B *3	15E	5	B -1
									16D	4	B *3.1	16E	5	B -1.1

									17D	4	B -3	17E	5	B -1.2
									18D	5	A - 2	18E	6	A -
									19D	5	B *	19E	6	B *
									20D	5	B * 1	20E	6	C *
									21D	5	B -1			
									22D	5	B -1.1			
									23D	5	B -1.2			
									24D	5	C *			
									25D	5	C -3			
									26D	5	C -3.1			
									27D	5	C -3.2			
									28D	6	A -			
									29D	6	B -			
									30D	6	B-1			
									31D	6	C *			
									32D	6	C *1			
									33D	6	C -1			
									34D	6	C -1.1			
									35D	6	C -1.2			

Nota. Cod. Código.