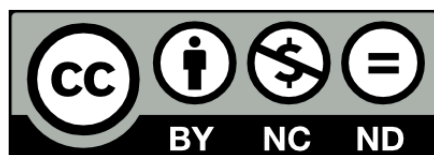


EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS DIAZOTRÓFICAS
EN UN SUELO DEL PIEDEMONTE LLANERO CONTAMINADO ARTIFICIALMENTE
CON DIÉSEL.



CRISTIAN CAMILO GONZÁLEZ MARTÍNEZ
NATHALY XIMENA MORA ALONSO



UNIVERSIDAD SANTO TOMÁS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
VILLAVICENCIO

2019

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE CRECIMIENTO DE BACTERIAS
DIAZOTRÓFICAS EN UN SUELO DEL PIEDEMONTES LLANERO CONTAMINADO
ARTIFICIALMENTE CON DIÉSEL.

CRISTIAN CAMILO GONZÁLEZ MARTÍNEZ
NATHALY XIMENA MORA ALONSO

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

Asesor

MARÍA ALEXANDRA MÉNDEZ LEAL

Microbióloga Industrial

MSc. Comunicación Social de la Investigación Científica

UNIVERSIDAD SANTO TOMAS
FACULTAD DE INGENIERÍA AMBIENTAL
VILLAVICENCIO

2019

Autoridades Académicas

P JUAN UBALDO LÓPEZ SALAMANCA, O.P.

Rector General

P MAURICIO ANTONIO CORTES GALLEGO, O.P.

Vicerrector Académico General

P JOSÉ ARTURO RESTREPO RESTREPO, O.P.

Rector Sede Villavicencio

P FERNANDO CAJICÁ GAMBOA, O.P.

Vicerrector Académico Sede Villavicencio

Adm. JULIETH ANDREA SIERRA TOBÓN

Secretaria de División Sede Villavicencio

Ing. YÉSICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN

Decana Facultad de Ingeniería Ambiental

Notas de Aceptación

YÉSICA NATALIA MOSQUERA BELTRÁN

Decana de la facultad de Ingeniería Ambiental

MARÍA ALEXANDRA MÉNDEZ LEAL

Director trabajo de grado

CESAR AUGUSTO RIVEROS ROMERO

Jurado

VERÓNICA DUQUE PARDO

Jurado

Villavicencio, abril de 2019

Dedicatoria

*A Dios por haberme permitido llegar hasta este punto.
A mi madre por ser el pilar fundamental en mi vida, por apoyarme en todos mis proyectos, por
su esfuerzo y dedicación para salir adelante.*

Camilo

*A mis padres, por su apoyo, amor incondicional,
e incentivarme a lograr mis sueños.*

Nathaly

Agradecimientos

Esta investigación fue desarrollada gracias a la financiación del Fondo de investigación de la Universidad Santo Tomás de Villavicencio (FODEIN) a través de la sexta convocatoria interna, donde se apoyó el 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)*” del cuál fuimos partícipe.

Para nosotros es de gran orgullo y satisfacción culminar nuestros estudios de pregrado en la Universidad Santo Tomás de Villavicencio, a la cual agradecemos toda la formación y experiencia que nos ha brindado durante estos años. Igualmente, a la planta docente de la facultad de Ingeniería ambiental de la universidad Santo Tomás, en especial a nuestra directora María Alexandra Méndez Leal por su valioso apoyo y orientación.

A Carolina Méndez Leal, coordinadora de laboratorios y a todo su equipo de trabajo por el apoyo y la paciencia durante el desarrollo de este proyecto.

Contenido

	Pág.
Resumen	13
Introducción	15
1. Planteamiento del problema	17
1.1 Formulación en torno al problema	19
2. Objetivos	20
2.1 Objetivo general	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. Justificación	21
4. Alcance	22
5. Antecedentes	23
6. Marco de referencias	25
6.1 Marco teórico	25
6.1.1 Generalidades del piedemonte llanero.	25
6.1.2 Suelos del piedemonte llanero.	25
6.1.3 Derrames de hidrocarburos en el suelo.	26
6.1.4 Ciclo del nitrógeno.	27
6.1.5 Fijación del nitrógeno.	28
6.1.6 Fijación biológica del nitrógeno.	29
6.1.7 Microorganismos hidrocarbonoclastas.	31
6.2 Marco conceptual	31
6.2.1 Suelo.	31
6.2.2 Diésel.	31

Potencial de crecimiento de bacterias diazotróficas

6.2.3	Fijación de nitrógeno atmosférico.	31
6.2.4	Fijación biológica de nitrógeno atmosférico.	32
6.2.5	Bacterias diazotróficas.	32
6.2.6	Bacterias de vida libre.	32
6.2.7	Bacterias hidrocarbonoclastas.	32
6.3	Marco legal	33
7.	Metodología	35
7.1	Toma de muestra del suelo	35
7.2	Contaminación ex situ con Diésel	35
7.3	Características físicas del suelo	36
7.4	Características químicas del suelo	37
7.5	Recuento y viables de bacterias Fijadoras de Nitrógeno	37
7.5.1	Recuento de bacterias Fijadoras de Nitrógeno en Medio de cultivo Rennie Modificado.	37
7.5.2	Aislamiento y caracterización de cepas en medio de cultivo Rennie Modificado.	38
7.6	Caracterización fenotípica de las cepas aisladas	38
7.6.1	Caracterización macroscópica.	38
7.6.2	Caracterización microscópica.	39
7.7	Caracterización bioquímica	39
7.7.1	Prueba de la Oxidasa.	39
7.7.2	Prueba de la Catalasa.	39
7.7.3	Prueba de Citrato de Simmons.	40
7.7.4	Prueba agar triple azúcar hierro (TSI).	40
7.7.5	Prueba de Agar Lisina Hierro (LIA).	40
7.7.6	Prueba de Sulfuro indol y movilidad SIM.	41

Potencial de crecimiento de bacterias diazotróficas

7.7.7	Prueba de Tioglicolato.	41
7.7.8	Prueba Rojo Metilo y Voges-Proskauer (RM-VP).	41
7.8	Identificación molecular de bacterias	42
7.9	Potencial bacterias libres fijadoras de nitrógeno (Prueba nitritos y amonio)	42
7.10	Diseño experimental y Análisis estadístico	42
8.	Resultados y análisis de los resultados	44
8.1	Contaminación ex-situ con Diésel	44
8.2	Características físicas del suelo	44
8.2.1	Textura.	44
8.2.2	Densidad aparente.	45
8.2.3	Densidad real.	45
8.2.4	Porosidad.	46
8.3	Características químicas del suelo.	46
8.4	Recuento de Bacterias Libres Fijadoras de Nitrógeno en Medio de Cultivo Rennie Modificado	49
8.5	Caracterización fenotípica de las cepas aisladas	53
8.6	Caracterización bioquímica	56
8.7	Identificación molecular de bacterias	57
8.8	Potencial de bacterias libres fijadoras de nitrógeno (Prueba nitritos y amonio)	58
9.	Conclusiones	61
10.	Discusión de Resultados y Recomendaciones	62
11.	Referencias bibliográficas	65
12.	Apéndices	75

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Normatividad asociada al recurso suelo.	33
Tabla 2. Concentraciones de diésel aplicadas a los diferentes tratamientos.	44
Tabla 3. Resultados de textura por sedimentación.	44
Tabla 4. Resultados de los parámetros químicos.	46
Tabla 5. Caracterización macro y microscópica de las cepas aisladas en medio de cultivo Rennie Modificado.	54
Tabla 6. Caracterización bioquímica de las cepas aisladas en medio de cultivo Rennie Modificado.	56
Tabla 7. Resultados análisis de producción de nitritos y amoníaco reportados por el laboratorio TECNO Ambiental s.a.s para las BLFN con potencial hidrocarbonoclasta.	59

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Ciclo del nitrógeno	28
Figura 2. Microorganismos que llevan a cabo la fijación biológica del nitrógeno	30
Figura 3. Toma de muestras del suelo	35
Figura 4. Reactores con muestra de suelo contaminada con diésel	36
Figura 5. Prueba de densidad real por el método de picnómetro y densidad aparente por el método de anillos	36
Figura 6. Método diluciones seriadas utilizado en el caso de estudio	38
Figura 7. Diseño experimental características microbiológicas y diseño experimental parámetros físico-químicos	43
Figura 8. Biplot simple para propiedades químicas con los diferentes tratamientos	48
Figura 9. Densidad microbiana en UFC gr^{-1} de suelo en concentraciones 0, 2500, 6100 y 9800 mg kg^{-1} Diésel, a través del tiempo	50
Figura 10. Comparativa densidad microbiana en UFC g^{-1} entre muestra testigo y concentración de 2500 mg kg^{-1}	51
Figura 11. Comparativa densidad microbiana en UFC gr^{-1} entre muestra testigo y concentración de 6100 mg kg^{-1}	52
Figura 12. Comparativa densidad microbiana en UFC gr^{-1} entre muestra testigo y concentración de 9800 mg kg^{-1}	52
Figura 13. Efecto de la densidad de BLFN sobre el nitrógeno total en los diferentes tratamientos durante el mes 1	60

Lista de apéndices

	Pág.
Apéndice A. Ubicación geográfica del Instituto Agrícola de Guacavía.	75
Apéndice B. Matriz de correlaciones de Pearson de las propiedades químicas.	76
Apéndice C. Prueba estadística Tukey para diferencias significativas entre tratamientos.	77
Apéndice D. Coeficiente de correlación de Pearson para nitrógeno total y densidad microbiana- mes 1.	79
Apéndice E. Árbol filogenético aislamiento RM_D_05.	80
Apéndice F. Árbol filogenético aislamiento RM_D_09.	81
Apéndice G. Árbol filogenético aislamiento RM_D_16.	82
Apéndice H. Árbol filogenético aislamiento RM_D_22.	83

Resumen

Los derrames de hidrocarburos afectan las poblaciones de microorganismos del suelo, por tanto, el presente proyecto de investigación tuvo como objetivo, evaluar el potencial de crecimiento de las bacterias libres fijadoras de nitrógeno (BLFN), en un suelo de piedemonte llanero extraído de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía (IEAG) en el municipio de Cumaral (Meta), contaminado artificialmente con diésel. El diseño experimental de la investigación se compone de tratamientos por triplicado con concentraciones de diésel de 2500, 6100 y 9600 mg kg⁻¹, más un control (testigo) y la caracterización fisicoquímica.

El suelo en estudio tiene una textura Franco arcillo arenosa (FArA), densidad real de 2,28 gr/cm³, porosidad de 51,75%, pH de 5,37, materia orgánica de 1,69%, nitrógeno total de 0,08% y capacidad de intercambio catiónico de 5,73 cmol/kg. Se midieron las poblaciones de BLFN a los 30, 60 y 90 días después de la adición del diésel, estas fueron reportadas en UFC g⁻¹ de suelo, la población fluctuó de 2,9x10⁵ UFC gr⁻¹ de suelo en el testigo hasta 2,4x10⁶ UFC gr⁻¹ de suelo en la concentración 6100 mg kg⁻¹, no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, P ≤ 0.05).

Se obtuvieron 27 cepas bacterianas, en su mayoría Gram positivas, debido a la capacidad de crecer en el medio selectivo Rennie modificado para aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno atmosférico, se seleccionaron e identificaron cuatro cepas mediante ARNr 16S, correspondiendo a la clase actinomicetos del género *Kribbella* sp. y *Amycolatopsis* sp. con una identidad del 99 y 98,7%, respectivamente.

Se determinó que la densidad de BLFN es responsable del 65% de la variabilidad del Nitrógeno total en el suelo de los diferentes tratamientos (r= 0,809; P ≤ 0.05). Finalmente, se determinó que las BLFN están presentes, aún bajo condiciones adversas, como es la presencia de diésel, por lo tanto, se recomienda para futuras investigaciones realizar pruebas directas tanto de la capacidad de fijación biológica de este nutriente, como de la efectividad en la biodegradación de hidrocarburos e incluso la capacidad de actuar como consorcio microbiano para la degradación de hidrocarburos.

Palabras Clave: Bacterias libres fijadoras de nitrógeno, diésel, nitrógeno, piedemonte llanero, suelos contaminados.

Abstract

Oil spills affect the soil microorganism populations; therefore, this research project aims to evaluate the growth potential of nitrogen-fixing bacteria (BLFN), in a soil of the Piedemonte Llanero extracted from the Agricultural Educational Institution Guacavia (IEAG) in the municipality of Cumaral (Meta), artificially contaminated with diesel. The experimental design of the research consists of treatments in triplicate with 2500, 6100 and 9600 mg kg⁻¹ diesel concentrations, plus one control and physicochemical characterization of the soil.

The soil in studio has a sandy clay loam texture, bulk density of 1.10 g/cm³, porosity of 51.75%, pH of 5.37, organic matter of 1.69%, total nitrogen of 0.08% and cation exchange capacity of 5.73 cmol/kg. The populations of BLFN were measured at 30, 60 and 90 days after the addition of the diesel, these were reported in CFU g⁻¹ soil, these populations fluctuated from 2.9x10⁵ CFU g⁻¹ (control soil) to 2.4x10⁶ CFU g⁻¹ (6100 mg kg⁻¹ diesel concentration), there were no significant differences between treatments (Tukey, P≤0.05).

27 bacterial strains, mostly gram positive, were obtained, due to the ability of growing in the Rennie modified selective medium for atmospheric nitrogen fixers microorganism insolation. Four strains were selected and identified, using 16S rRNA, matching to the class actinomycetes of the genus *Kribbella* sp. and *Amycolatopsis* sp. with an identity of 99 and 98.7% respectively.

It was determined that the density of BLFN is responsible of 65% total nitrogen variability in the soil of the different treatments (r=0.809; P≤0.05). Finally, it was determined that the BLFN are present, even under adverse conditions, such as the presence of diesel, therefore, it is recommended for future research to assess directly the capacity of biological fixation of N, the effectiveness in hydrocarbons degradation and even the ability to act as a microbial consortium for the degradation of hydrocarbons.

Key words: Nitrogen fixing bacteria, diesel, nitrogen, piedemonte llanero, contaminated soils.

Introducción

El nitrógeno (N_2) es uno de los elementos indispensables para el desarrollo de todos los organismos, se encuentra en aproximadamente el 80% de la atmósfera y por medio de distintos procesos de fijación es incorporado al suelo, donde más del 90% del nitrógeno es orgánico, proporcionado por la biodegradación de plantas y animales muertos (Manahan, 2006, p.321; Navarro y Navarro, 2003, p.183). Por ende, no puede ser aprovechado directamente por la mayoría de los seres vivos, debido al triple enlace entre los dos átomos (Núñez, 2016, p.5), requiriendo ser transformado y liberado en compuestos más sencillos de asimilar como amonio o nitrato. En las plantas, el N participa en la estructura de las moléculas de proteína, aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas y fosfolípidos, además, está involucrado en el proceso de la fotosíntesis al hacer parte de la formación de la clorofila (Núñez, 2016, p.13).

El proceso de fijación del nitrógeno es principalmente biológico, es decir, tan sólo, un selecto grupo de microorganismos especializados como algas, bacterias y actinomicetos pueden aprovecharlo, dado que poseen un complejo enzimático compuesto por nitrogenasas, que les permite realizar la reducción de este a una forma asimilable como el amonio, y así, estar disponible para otros organismos en suelo, permitiendo revertir o reducir la degradación del mismo (Allan y Graham, 2002; Parsons, 2004; citado por Mayz-Figueroa, 2004, p.1). Las bacterias libres fijadoras de nitrógeno (BLFN) o diazotróficas habitan en partículas de suelo rizosférico (bacterias de vida libre) o están asociadas al interior de la raíz, donde forman estructuras especializadas llamadas nódulos (bacterias simbióticas) (Cruz et al., 2017, p.213).

Los suelos estudiados se caracterizan por presentar baja fertilidad, debido a la alta acidez y los niveles tóxicos de hierro y aluminio, sin embargo, en el piedemonte llanero existe un nivel de fertilidad mayor comparado con los demás paisajes de los llanos orientales, razón por la cual han aumentado las actividades agropecuarias de ganadería y agricultura (Viloria, 2009, p.8-10). Además, el departamento del Meta fue el mayor productor de crudo de petróleo en el 2018 con una producción promedio de 420.000 barriles/día (Descubren crudo en el Meta, 2019), así mismo, la zona de piedemonte presenta la mayor población en relación a las demás zonas del departamento (Curvelo y Acosta, 2006, p.44); teniendo en cuenta lo anterior, estos suelos se encuentran

intervenidos por maquinaria agrícola y las vías de esta zona son transitadas por vehículos de carga y de pasajeros, aumentando el riesgo de vertimientos accidentales de crudo de petróleo y derivados.

Cabe mencionar, que esta investigación hace parte 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)*” aportando insumos para el desarrollo del primer y segundo objetivo, mediante el análisis de la relación existente entre suelos contaminados con diésel y el comportamiento de bacterias libres fijadoras de nitrógeno (BLFN). En este sentido, esta investigación busca indagar sobre la presencia de las BLFN en un suelo del piedemonte llanero y así mismo, evaluar su comportamiento ante la alteración de su entorno mediante la adición de dicho contaminante.

1. Planteamiento del problema

En el suelo se realizan los procesos de transformación del nitrógeno, como menciona Rodríguez (2014) existen relaciones entre plantas y microorganismos que constan del intercambio de materia y energía, siendo las bacterias fijadoras de nitrógeno las encargadas de dichos procesos. El N en el suelo se encuentra en forma de nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) y amonio (NH_4^+). Estos compuestos son indicadores de la calidad y fertilidad, al ser nutrientes esenciales para los organismos presentes (p.3). El suelo tiene diferentes maneras de fijar biológicamente el nitrógeno presente en el medio, en el caso de la asociación con bacterias fijadoras de nitrógeno, no se requiere que el nitrógeno se encuentre en el suelo. El nitrógeno atmosférico (N_2) es reducido a NH_4^+ , mediante la acción del complejo enzimático nitrogenasa, para así, poder ser utilizado por la planta (Moya, 1997, p.74).

El nitrógeno inorgánico como nitrato o amonio es uno de los principales nutrientes en las plantas, dado que contribuye a su crecimiento y al rendimiento de los cultivos siendo directamente proporcional a la presencia de este compuesto en el suelo. Por lo que fertilizar se convierte en una actividad necesaria que permite adecuar los suelos a las características nutricionales de los cultivos.

En Colombia, aproximadamente el 80% de los productores agrícolas utilizan fertilizantes nitrogenados, entre ellos urea (46% de nitrógeno), sulfato de amonio (21% de nitrógeno) y nitrato de amonio (34% de nitrógeno), las aplicaciones de estos productos nitrogenados han aumentado con el paso de los años, dado que en 1990 se utilizaban 100 kg/ha mientras que en 2001 se aplicaban 250 kg/ha (DANE, MADR y Sistema de Información de Precios y Abastecimiento del Sector Agropecuario, 2012, p.1), este aumento además se refleja según el Banco Mundial (s.f) en el consumo de fertilizantes en Colombia que para el 2016 fue de 659,45 kg/ha.

En los suelos del piedemonte llanero se ha reportado la presencia de nitrógeno en 0,11% y 0,12% (Rincón, 2007; Rincón y Ligarreto, 2010), valores que indican la deficiencia de este elemento. Pese a ello, estos suelos poseen gran importancia agrícola y ganadera, requiriendo el uso de maquinaria agrícola (tractores, combinadas, rastrillos, cosechadoras, sembradoras, entre otras), con el fin de garantizar el óptimo rendimiento de los cultivos, mejorando así, la producción y la productividad. Según Fedearroz (2017) en el 2016 el departamento del Meta contaba con 825

tractores y 253 combinadas, con una edad promedio de 10 y 14 años respectivamente. Dicha maquinaria utiliza diésel como combustible dado que es más rentable y eficiente que la gasolina, ya que permite transportar grandes cargas al comprimir y aprovechar por más tiempo la mezcla de aire y combustible (Unidad de Planeación Minero Energética, 2013, p.129). Figurando como una causa de los vertimientos de derivados de hidrocarburos, ya sea por la antigüedad o por el inadecuado manejo y mantenimiento, provocando desgaste en la maquinaria y por ende mayor probabilidad de derrame.

Sin embargo, son otras las situaciones que generan mayor aporte de este tipo de contaminantes en el suelo. Los llanos orientales son considerados como el gran depósito de petróleo, teniendo en cuenta que departamentos como Meta y Casanare concentran el 69% de la producción de crudo del país (Arcila, 2018), razón por la cual, se ha incrementado el tránsito de vehículos de carga de hidrocarburos, y así mismo, el riesgo de vertimientos accidentales.

Por ejemplo, en el año 2013 en las vías del Meta, Casanare y Arauca se reportaron 46 accidentes relacionados con el transporte de hidrocarburos (Méndez, 2013). Tan sólo en Casanare se registró en el 2013 por lo menos 6 derrames de petróleo y en el 2014 ocurrió una emergencia cercana a 20 barriles de crudo por la ruptura de un tubo (Llano 7 días, 2014). Igualmente, en el 2015 un carro de carga pesada que transportaba 220 barriles de petróleo se volcó en la vía Cumaral (Volcamiento vía a Cumaral, 2015).

Los derrames de diésel pueden generar impactos tanto a nivel económico y social, como ambiental en las zonas cercanas al sitio del incidente (Pardo, Perdomo y Benavides, 2004, p.41), puesto que, las cosechas presentes en el lugar del derrame no van a poder ser aprovechadas, lo que representa pérdidas económicas y al mismo tiempo, no se pueden realizar actividades agrícolas y ganaderas en esta zona, también puede causar la disminución en la calidad de vida de las personas que residan en las zonas aledañas al lugar del derrame, dado que se aumenta el riesgo tóxico y por tanto, de afectación a la salud pública.

De igual forma, aumenta la contaminación tanto al suelo, aire y agua dependiendo de la cantidad del derrame y las características del lugar. En suelos que han sido contaminados por diésel se puede apreciar *“la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal en el lugar del derrame, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y contaminación por infiltración a cuerpos de agua subterráneos”* (Pardo et al., 2004, p.41). Es decir, afecta las propiedades físicas, químicas y

biológicas del suelo y, por ende, altera las poblaciones de microorganismos que se encuentren en el lugar.

Por lo tanto, el presente estudio determino el potencial de crecimiento, aislamiento e identificación de BLFN a partir de reactores con suelo proveniente de la IEAG, artificialmente contaminado con diferentes concentraciones de diésel.

1.1 Formulación en torno al problema

Se generó la siguiente pregunta problema: ¿Cómo varía el potencial de crecimiento de las bacterias libres fijadoras de nitrógeno en un suelo proveniente de la Institución Educativa Agrícola de Guacavía del municipio de Cumaral-Meta contaminado artificialmente con diferentes volúmenes de diésel (0, 200, 500, 800 ml), en un periodo de 3 meses? Se estableció, la siguiente hipótesis de investigación: la presencia de diésel afecta positivamente el potencial de crecimiento de las BLFN en el suelo, aumentando la densidad poblacional de estas en los diferentes tratamientos con respecto al suelo sin contaminante.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Evaluar el potencial de crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno en un suelo agrícola de piedemonte del municipio de Cumaral – Meta, simulando un derrame accidental con diésel a diferentes volúmenes (0, 200, 500 y 800 ml), que permita determinar el comportamiento del suelo por la exposición a este contaminante.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar las características físicas y químicas *ex situ*, a partir de suelo artificialmente contaminado con diésel.
- Estimar la capacidad de crecimiento (recuento y viables) de bacterias libres fijadoras de nitrógeno atmosférico ante diferentes volúmenes de diésel.
- Analizar el potencial de bacterias diazotróficas o fijadoras de nitrógeno de vida libre en un suelo del Piedemonte Llanero.

3. Justificación

En Colombia la investigación sobre la fijación biológica del nitrógeno se ha enfocado en las bacterias simbióticas, particularmente, la relación de rizobios – leguminosa, sin tener en cuenta las bacterias de vida libre. Sin embargo, las BLFN mediante la fijación biológica de nitrógeno aportan anualmente entre 22 y 56 kg/ha, representando el 50% del nitrógeno necesario por las plantas, además, reduce tanto el uso de fertilizantes como los costos de producción agrícola (Cardona y Sánchez, 1998, p.44).

En ese sentido, las investigaciones realizadas en el país sobre las BLFN por Gaviria et al. (2018), Moya (1997) y Venegas (2012) se relacionan con la actividad promotora de crecimiento vegetal en diversos cultivos como zanahoria, arroz y caña de azúcar; mientras que son escasos los estudios acerca de su crecimiento en un suelo contaminado con diésel.

Por tanto, se realizó el presente estudio, con el propósito de determinar los efectos que tiene el diésel en el suelo como la alteración de su estructura y la reducción del contenido de materia orgánica y nutrientes como nitrato, potasio, fosfato y sodio (Serrano et al., 2003; citado por Velásquez, 2017, p.156). En efecto, Bossert y Bartha (1984) informaron que en suelos contaminados crónicamente con petróleo crudo se encuentran abundantes poblaciones de BLFN (citado por Hernández, Ferrera y Rodríguez, 2003, p.82).

Según Sorkhoh et al. (2010) en suelos contaminados con petróleo se estima que la población de microorganismos fijadores de nitrógeno se encuentra en 1×10^8 UFC/g de suelo, además, “*son capaces de utilizar hidrocarburos alifáticos y/o aromáticos como fuente de carbono y energía (hidrocarbonoclastas)*” (citado por Cruz et al., 2017, p.213). Igualmente, facilitan el intercambio de los nutrientes y minerales presentes en el suelo, evitando procesos erosivos y la reducción de la fertilidad de los suelos (Mahecha, 2011, p.5).

Teniendo en cuenta lo anterior, se planteó que las BLFN pueden utilizarse como una alternativa para la descontaminación de suelos (Hernández et al., 2003, p.88), brindando relevancia e importancia a este estudio, ya que estas podrían ser parte de la solución ante un posible derrame de hidrocarburo (diésel) en un suelo de piedemonte, siendo uno de los estudios pioneros en determinar el comportamiento de las BLFN ante derrames de diésel, en suelos del piedemonte llanero.

4. Alcance

El presente proyecto se encuentra en el marco del macro-proyecto “*Comportamiento de las características físicas, químicas y microbiológicas en suelos de vocación agrícola artificialmente contaminados con Gasolina y Diésel en el piedemonte llanero del Municipio de Cumaral (Meta)*”, apoyando el desarrollo de los objetivos específicos uno y dos, mediante el análisis de las características físicas y químicas de un suelo contaminado artificialmente con diésel y la evaluación de la densidad microbiana de las bacterias asociadas al ciclo biogeoquímico del nitrógeno en un suelo contaminado con diésel. Con el fin de generar información documentada que pueda ser utilizada como referencia del comportamiento de las BLFN o diazotróficas, debido a la importancia del nitrógeno como componente esencial para el desarrollo de la vida.

Espacialmente, las muestras de suelo fueron tomadas del predio de la IEAG, localizado en el municipio de Cumaral-Meta, cuyas coordenadas geográficas son latitud 4°15'05.08"N y longitud 73°19'59.72"O (Apéndice A). El municipio se encuentra a 452 msnm, con una temperatura promedio de 21°C, precipitaciones de 2500 mm a 3500 mm al año que van desde abril hasta octubre y la humedad relativa es de 84%. Además, presenta una topografía plana y paisaje de piedemonte llanero (Alcaldía de Cumaral, s.f, p.33).

El alcance de este proyecto de investigación fue evaluar el potencial de crecimiento de las bacterias libres fijadoras de nitrógeno en un suelo de área agrícola contaminado mediante un vertimiento artificial con diferentes volúmenes de diésel (0, 200, 500 y 800 ml). Para esto, se realizaron recuentos bacterianos una vez al mes durante tres meses, y así mismo, se midieron los parámetros fisicoquímicos del suelo, dichas actividades se llevaron a cabo en los laboratorios de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio. El tiempo de ejecución fue de 8 meses, comprendidos desde el mes de mayo hasta el mes de diciembre de 2018.

5. Antecedentes

La presencia de las BLFN en el suelo proporciona algunos beneficios, tales como la incorporación de nitrógeno en suelos con baja presencia de este macronutriente, fomentar el crecimiento vegetal y así mismo, pueden ser involucradas en procesos de biodegradación de hidrocarburos.

Por su parte, en América Latina, se ha estudiado el crecimiento y comportamiento de las BLFN en el suelo. Tal es el caso de Hernández et al. (2003) donde se usaron cuatro concentraciones de queroseno (0, 500, 2500 y 5000 mg kg⁻¹), siendo 2500 mg kg⁻¹ la que obtuvo mayores poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno con 4x10⁶ UFC g⁻¹ de suelo, además, determinaron que la adición de este hidrocarburo al suelo no limitó el número de poblaciones. Por lo tanto, sugieren utilizar este grupo microbiano en la biorremediación de suelos afectados por queroseno y al mismo tiempo, estos pueden incorporar nitrógeno al suelo.

En la Patagonia, Argentina se informó que la cantidad de microorganismos diazótrofos degradadores de hidrocarburos fue de 3,7x10⁵ UFC g⁻¹. Se caracterizaron tres microorganismos de los géneros *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Gordonia* sp, los cuales fueron capaces de biodegradar casi en su totalidad hidrocarburos alifáticos y aromáticos, además, se adaptaron a diferentes tipos de estrés como cambios de pH, temperatura y salinidad. Por consiguiente, consideran de gran importancia estos microorganismos, dado que pueden realizar fijación biológica del nitrógeno y ser incorporados en la degradación de los hidrocarburos (Acuña, G. Pucci y O. Pucci, 2010).

En un estudio realizado en México se usaron cinco concentraciones de petróleo (1200, 3500, 10,000, 20,000 y 40,000 mg kg⁻¹ en peso seco) y se establecieron las poblaciones bacterianas en cada una. Se presentó un incremento exponencial de colonias altamente significativo de 2 a 3,5 veces más abundantes que en el testigo. Concluyeron que estas bacterias se pueden adaptar a condiciones adversas, por lo tanto, podrían ser útiles para el saneamiento de zonas impactadas con hidrocarburo (M. Vázquez, Montiel, D. Vázquez y Herrera, 2011).

A nivel nacional, se han desarrollado investigaciones desde la academia acerca de las bacterias diazotróficas en el suelo, que coinciden en la necesidad de conocer el comportamiento de estas bacterias y su aporte a los cultivos. Tal es el caso de Risaralda (Salas, 2011) donde se informó una densidad de 8,4x10⁴ UFC g⁻¹ para cultivos de cebolla, 7,5x10⁴ UFC g⁻¹ para plantaciones forestales

y $9,6 \times 10^4$ UFC g^{-1} para bosques subandinos, demostrando que no hay diferencias significativas entre los tres usos de suelo.

Después, se realizó en Pereira el aislamiento de microorganismos fijadores de nitrógeno, donde se identificaron Actinomicetos fijadores de nitrógeno presentes en el suelo del Jardín Botánico de los géneros *Streptomyces* sp. y *Nocardia* sp; las cepas obtenidas mostraron potencial como promotores de crecimiento vegetal (Salazar y Ordóñez, 2013).

Posteriormente, en Cundinamarca se determinó la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos en agroecosistemas cafeteros (ecológicos y convencionales) determinando que existen mayores UFC en las fincas ecológicas, posiblemente por el uso de agroinsumos en las fincas convencionales, también, reportaron mayores UFC en época de sequía. Además, establecieron que su presencia no está relacionada de manera relevante con las propiedades fisicoquímicas del suelo analizadas en este estudio (Fernandez y Perdomo, 2015).

Por último, Gaviria, Restrepo, Galeano y Hernández (2018) establecieron que las bacterias diazotróficas aisladas en su investigación tienen potencial para elaborar inoculantes microbianos para el cultivo de zanahoria, con diferentes características de promoción del crecimiento vegetal, por consiguiente, consideran pertinente realizar pruebas de campo con el propósito de validar su comportamiento real.

Los trabajos de investigación mencionados anteriormente son pertinentes en el desarrollo de este estudio, dado que contemplan el comportamiento de las BLFN en el suelo ante una perturbación del entorno como lo es la adición de hidrocarburos (Hernández et al., 2003; Vázquez et al., 2011; Acuña et al., 2010) y coinciden en la viabilidad de incorporar esos microorganismos en la degradación de hidrocarburos. Así mismo, la investigación de Salazar y Ordóñez (2013) permitió realizar la caracterización e identificación de las cepas de actinomicetos obtenidas.

En cuanto a los trabajos nacionales se han realizado investigaciones enfocadas al uso de las BLFN en la agricultura, pero no se ha tenido en cuenta su comportamiento ante hidrocarburos. Sin embargo, se implementaron algunas consideraciones de la metodología descrita por Fernandez y Perdomo (2015) y Gaviria et al. (2018) como la cantidad de diluciones y el tiempo de incubación.

El presente trabajo se estima como el primer documento base que se realiza en zona de piedemonte llanero sobre bacterias diazotróficas en el municipio de Cumaral, Meta, siendo un importante insumo y base de datos para investigaciones futuras.

6. Marco de referencias

6.1 Marco teórico

6.1.1 Generalidades del piedemonte llanero.

El piedemonte llanero colombiano se encuentra en la región de la Orinoquía, ubicado en la base de la cordillera oriental, iniciando en el municipio de Uribe y terminando en Barranca de Upía, ampliándose hasta el oriente hacia el río Metica y Guayabero, abarcando alturas entre los 200 y 700 msnm (Álvarez de León et al., 2007, p.24). Posee una extensión cercana a 2'010.000 hectáreas (ha), ocupando el 7,6% de la región Orinoquía y 120.000 ha se encuentran en el departamento del Meta, significando el 12% de la superficie total del departamento (Rincón et al., 2010, p.10). Esta es una zona de transición entre los bosques montanos y las sabanas de altillanuras, la cual ofrece mayor fertilidad que los suelos que se encuentran Orinoquía adentro, puesto que es abastecida por cuerpos hídricos provenientes de la vertiente oriental, generando suelos sedimentarios (IGAC, 2003; citado por Briceño, 2015, p.133).

También se caracteriza por registrar temperaturas entre los 18 y 24°C, precipitaciones anuales que oscilan entre 2.800 y 5.000 mm, con un régimen monomodal, es decir, lluvias que comprenden desde abril hasta noviembre y sequía entre diciembre a marzo. Además, se encuentra en piso térmico cálido, permitiendo ser más productivo económicamente y más favorable para el desarrollo de actividades agrícolas y pecuarias que otras zonas de la región. Cabe mencionar, que en el piedemonte se encuentra la mayor concentración poblacional del departamento del Meta (Álvarez de León et al., 2007, p.25; Curvelo y Acosta, 2006, p.44; Rincón, 2007, p.15).

6.1.2 Suelos del piedemonte llanero.

Los suelos del piedemonte normalmente presentan altos contenidos de arcillas, variaciones de la densidad aparente entre 1,2 y 1,7 gr/cm³, bajos niveles de pH (indicando que son suelos ácidos o ligeramente ácidos), contenido medio de las bases intercambiables, mientras que la capacidad de intercambio catiónico y la saturación de aluminio tiende a ser alta (Rincón et al., 2010, p.15).

Igualmente, poseen bajos contenidos en materia orgánica y de nutrientes como fósforo, calcio, magnesio y nitrógeno (Rincón y Ligarreto, s.f, p.5; Rincón y Ligarreto, 2008; p.74; Rincón y Ligarreto, 2010, p.123). Son suelos recientes, razón por la cual son relativamente fértiles y poco lixiviados, teniendo en cuenta que reciben nutrimentos de la zona alta de la cordillera (Rincón et al., 2010, p.15). En el caso del municipio de Cumaral, estos suelos se encuentran clasificados taxonómicamente en su mayoría como Inceptisoles, seguidos por Entisoles y Oxisoles (Pulido, Venegas, Jaime, Gómez y Ostos, 1999, p.17).

Rincón y Ligarreto (s.f) reportaron que después de analizar 170 muestras de suelo en diferentes fincas del Piedemonte Llanero, encontraron que el 70% de éstas presentaban contenido de materia orgánica entre 1,2 y 2,7% (p.2), indicando bajo contenido de nitrógeno. La materia orgánica cumple un rol importante en el suelo al relacionarse con la fertilidad, ya que es una fuente de nutrientes para las plantas y los microorganismos (Velandia, 2016, p.48).

6.1.3 Derrames de hidrocarburos en el suelo.

Debido a creciente demanda energética en el mundo se ha utilizado el petróleo y sus derivados como principal fuente de abastecimiento, donde se encuentra el diésel, la gasolina y el jet fuel como los productos de la canasta energética con mayor participación, representando el 48%, 24% y 8% respectivamente (Rodríguez, 2017, p.53). Sin embargo, el aumento de la explotación del petróleo ha traído consigo el aumento de las fuentes de contaminación, tal es el caso de los derrames, los cuales en Colombia han ocurrido por diversas circunstancias, principalmente de tipo voluntario, accidental o por atentados efectuados por grupos al margen de la ley (Velásquez, 2017, p.154), ocasionando que estas sustancias entran en contacto con el suelo.

Los derrames de diésel deterioran la calidad del ambiente, afectando principalmente las propiedades del suelo y agua, como resultado de las alteraciones a la estabilidad química intrínseca y a la pérdida de capacidad de degradación de los diferentes microorganismos presentes en estos medios. Así mismo, pueden causar variaciones en la diversidad microbial (Serrano, Torrado y Pérez, 2013, p.237). Velásquez (2017) expresa que *“los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración”* (p.152), sin embargo, no todos los derrames son iguales, por lo que se debe tener en cuenta el tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad

vertida, dado que pueden variar los tiempos de los procesos ocasionando diferente nivel de toxicidad; generando de esta manera graves consecuencias ambientales tanto en la flora como en la fauna.

6.1.4 Ciclo del nitrógeno.

El nitrógeno (N_2) es un elemento esencial para el crecimiento de todos los organismos, necesario para la composición de proteínas, material genético, clorofila y otros componentes de las células (Cubillos, 2009, p.13). La mayor cantidad de nitrógeno está en la atmósfera (aproximadamente el 80%), mientras que la corteza terrestre contiene 0,03% y en los océanos es escaso. En el suelo el 98% del nitrógeno se encuentra en la materia orgánica, por lo cual se da una relación entre materia orgánica y nitrógeno total del suelo, sin embargo, no puede ser asimilado por las plantas y debe ser transformada a compuestos inorgánicos como nitratos, nitrito y amonio (Fournier, 2003, p.60; Gómez, 2015, p.13).

Este elemento posee un triple enlace, el cual que genera que sea casi inerte y difícilmente sea aprovechado cualquier forma viviente, solo un pequeño grupo de microorganismos especializados entre los que se incluyen algas, bacterias y actinomicetos puede cumplir la función de hacerlo disponible (Mayz-Figueroa, 2004, p.1). Además, según Rojas (2008) el nitrógeno es limitante para el crecimiento tanto de las plantas como de los animales y los microorganismos (p.28).

Ahora bien, el ciclo del nitrógeno (Figura 1) ha sido uno de los ciclos biogeoquímicos más estudiados, tanto por su importancia en la producción agrícola como ambiental (Valencia y Peña, 2001; citado por Fernandez y Perdomo, 2015, p.36). En gran medida son los microorganismos los encargados del movimiento del nitrógeno a través de los distintos ecosistemas (Gómez, 2008, p.18). En este ciclo las etapas principales son: la fijación, mineralización o amonificación, nitrificación y desnitrificación.

Inicialmente el nitrógeno de la atmósfera (N_2) pasa por el proceso de fijación, donde es reducido a amoniaco, luego es transformado a amonio (NH_4^+) siendo asimilado por las plantas o tomando la vía oxidativa de la nitrificación para convertirse en nitrito (NO_2^-) y posteriormente en nitrato (NO_3^-), los cuales pueden pasar por el proceso de asimilación por plantas, microorganismos y macro organismos, o también ser reducidos de nuevo asimilativamente por acción microbiana hasta NH_4^+ , o pasar por el proceso de

desnitrificación en donde se reduce el nitrato (NO_3^-) hasta N_2 gaseoso y se generan subproductos gaseosos como el N_2O y el NO (Melo, 2006; Nieder y Benbi, 2008; citado por Mahecha, 2011, p.8).

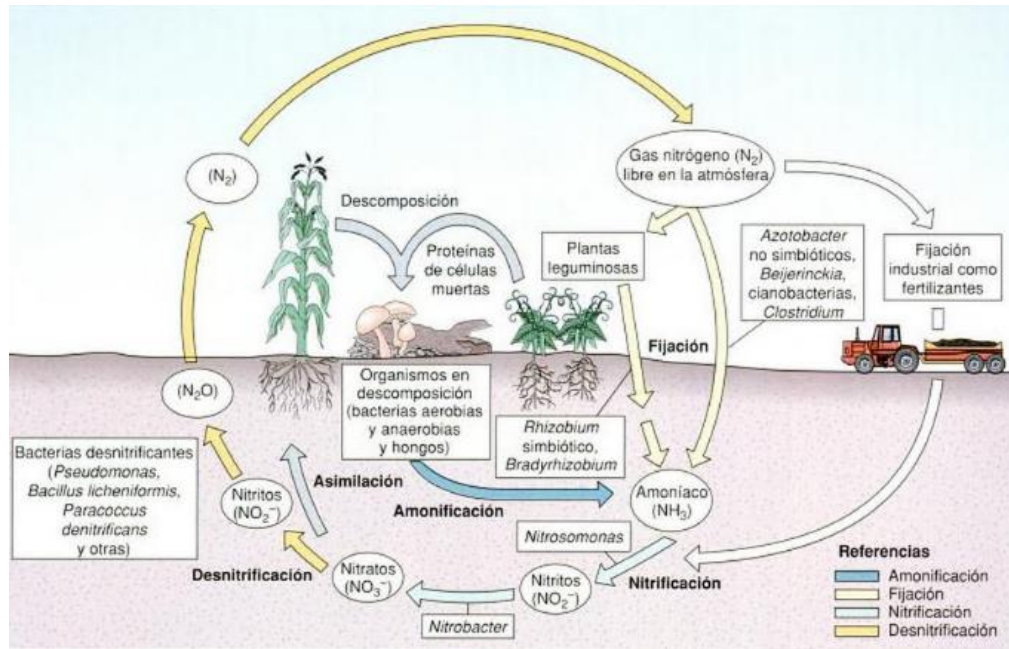


Figura 1. Ciclo del nitrógeno. Por: Tortora, Funke y Case (2007).

6.1.5 Fijación del nitrógeno.

La fijación del nitrógeno puede ocurrir de diferentes maneras, una es abiótica, es decir, por “procesos químicos espontáneos como la oxidación de nitrógeno atmosférico por acción de rayos solares, descargas eléctricas o por combustión de compuestos orgánicos y por medio de aguas lluvia son arrastrados hacia la biosfera” (Salazar y Ordóñez, 2013, p.35). Otra es de forma biológica, llevada a cabo únicamente por procariontes capaces de reducir el N_2 de la atmósfera a amonio (NH_4), denominados como microorganismos fijadores de nitrógeno (bacterias, cianobacterias y actinomicetos), los cuales contienen el complejo enzimático nitrogenasa. También, el nitrógeno puede ser fijado de manera industrial, mediante el proceso Haber-Bosch donde se acelera la fijación espontánea de N_2 utilizando temperaturas entre 400 y 500°C y presiones entre 150 y 300 atmósferas, con el fin de producir amoníaco y producir fertilizantes nitrogenados (Covelli, 2013, p.7).

De Felipe et al. (2006) estima que en el suelo se fijan 275 millones de toneladas métricas de N_2 al año, de las cuales 10,9% se fijan por causas naturales como las descargas eléctricas de tormentas y erupciones volcánicas, 27,27% por fijación industrial y el 63,64% por la fijación biológica de nitrógeno (p.5). Concordando con la afirmación de Rodríguez-Sevillano (2009) sobre el aporte superior al 60% de la fijación biológica, lo cual, lo acredita como el proceso más importante (citado por Salazar y Ordóñez, 2013, p.36).

6.1.6 Fijación biológica del nitrógeno.

La fijación biológica del nitrógeno es un proceso en el que las bacterias fijadoras de nitrógeno o diazotróficas reducen el nitrógeno gaseoso de la atmósfera a amonio, cuya característica principal es poseer el complejo nitrogenasa. Estas bacterias se encuentran en mayor abundancia y diversidad en la rizósfera, dado que pueden sobrevivir en ambientes con alto contenido de carbono, baja presencia de nitrógeno y son capaces de crecer sin fuentes externas de nitrógeno, dado que son fijadoras de nitrógeno atmosférico (Cruz et al., 2017, p.213; Esquivel, Ferrera y Alarcón, 2018, p.207). Son muy importantes en el suelo y poseen una amplia diversidad taxonómica, con diferentes estilos de vida y de asociación con los vegetales, aunque, no todas las especies tienen la capacidad de fijar nitrógeno y formar asociaciones, se han identificado 87 especies en dos géneros de Arquibacterias, 38 géneros de bacterias y 20 géneros de cianobacterias como diazótrofos (Rodríguez, 2014, p.9).

Se clasifican en dos grupos (Figura 2), los primeros son aquellos que pueden fijar nitrógeno en vida libre (se encuentran adheridos a las partículas de suelo) y el segundo son los que establecen asociaciones simbióticas (ligados al interior de la raíz formando nódulos) para realizar dicho proceso (Cruz et al., 2017, p.213).

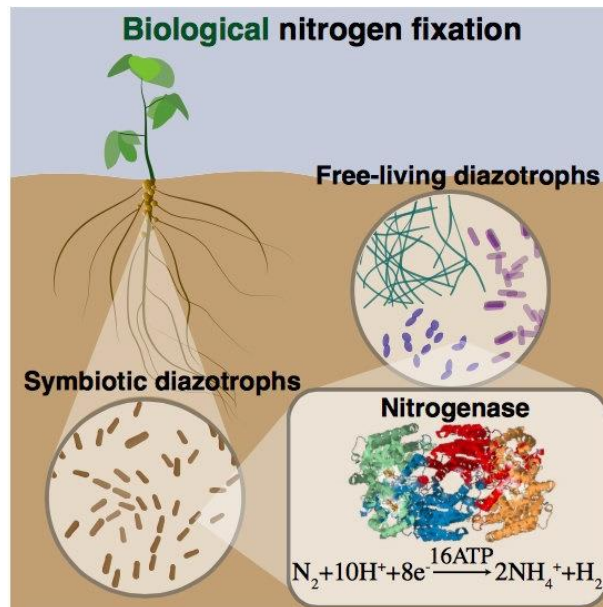


Figura 2. Microorganismos que llevan a cabo la fijación biológica del nitrógeno. Por: Tantillo (2018).

Cerón y Aristizábal (2012) manifiestan que las bacterias diazótroficas puede ser simbióticas (obligadas, asociativas o endófitas) y de vida libre, las obligadas están representadas por *Rhizobium* y *Frankia*, las asociativas o endófitas por *Cyanobacterias*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus* y la no simbióticas por *Achromobacter*, *Acetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Azomonas*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Herbaspirillum*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas* y *Xanthobacter* (p.287). También, se puede encontrar diversas bacterias de vida libre como: anaeróbicas obligadas o facultativas (*Clostridium pasteurianum*, *Desulfovibrio sp.*, *Klebsiella spp.*), aerobias obligadas (*Azotobacter spp.*, *Beijerinckia sp.*) y fotosintéticas (bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas y bacterias verdes sulfurosas) (Mayz-Figueroa, 2004, p.2).

La fijación de nitrógeno por bacterias diazotróficas de vida libre hace referencia a las bacterias que no realizan una relación simbiótica con las plantas, por lo cual es una entrada de nitrógeno importante para muchos ecosistemas terrestres, en especial los que no cuentan con plantas para el desarrollo de asociaciones con fijadores simbióticos (Reed et al., 2011; citado por Velandia, 2016, p.18).

6.1.7 Microorganismos hidrocarbonoclastas.

Los microorganismos hidrocarbonoclastas, son un grupo relativamente nuevo de bacterias, hongos y algas con la particularidad de alimentarse exclusivamente de hidrocarburos, utilizando este como única fuente de carbono y energía. Estos microorganismos están involucrados en la transformación parcial o mineralización total de los hidrocarburos contaminantes, lo cual, les da un papel muy importante como herramienta indispensable en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo o derivados de este (Esquivel et al., 2018, p.204).

6.2 Marco conceptual

6.2.1 Suelo.

El suelo es el material mineral no consolidado en la capa superficial de la corteza terrestre, resultado de un largo proceso de meteorización. Está compuesto por minerales, microorganismos, materia orgánica, aire y agua. Constituye un medio natural para el crecimiento de diversos organismos, en el caso de las plantas, les proporciona nutrientes y les sirve de sustrato sobre el cual crecer (Hernández, 2011, p.27).

6.2.2 Diésel.

El diésel, también es conocido como gasóleo o gasoil, es un producto resultante de la destilación del petróleo a una temperatura que oscila entre los 200°C y 380°C (Comisión Nacional para el Uso Eficiente de la Energía, s.f, p.2). Es un hidrocarburo líquido con 10 a 22 átomos de carbono, contiene compuestos parafínicos, naftalénicos y aromáticos, con una densidad de aproximada de 0,832g/cm³ (Rodríguez, 2017, p.50).

6.2.3 Fijación de nitrógeno atmosférico.

La fijación del nitrógeno atmosférico es un proceso bioquímico que permite incorporar el nitrógeno gaseoso a la biósfera y de esta manera, estar disponible para los organismos vivos

(Covelli, 2013, p.6), puede ocurrir de manera abiótica, es decir, por medio de “*procesos químicos espontáneos como la oxidación de nitrógeno atmosférico por acción de rayos solares, descargas eléctricas o por adsorción de N orgánico en partículas de polvo*” o biológicos (Pellegrini, 2017, p.5).

6.2.4 Fijación biológica de nitrógeno atmosférico.

La fijación biológica de nitrógeno atmosférico ocurre principalmente en el suelo y está asociado a la capacidad metabólica de algunos procariontes (diazótrofos), que logran fijar N_2 mediante su transformación a una molécula orgánica, a partir de la utilización de adenina trifosfato (ATP) (Covelli, 2013, p.7).

6.2.5 Bacterias diazotróficas.

Las bacterias diazotróficas son bacterias que poseen la capacidad de reducir el nitrógeno de la atmósfera, donde se encuentra de manera ilimitada como nitrógeno elemental a amonio para que pueda ser utilizado para el desarrollo de los cultivos (Hernández et al., 2014, p.2). Por lo tanto, son importantes en la promoción del crecimiento vegetal al aportar nitrógeno a la planta para su crecimiento y al mismo tiempo, consiguen nutrientes para su desarrollo (Velandia, 2016, p.17).

6.2.6 Bacterias de vida libre.

Estas bacterias no están asociadas con plantas ni animales, por lo tanto, viven libres en el suelo y realizan la fijación del nitrógeno para beneficio propio, aunque este nitrógeno generalmente llega a estar disponible para las plantas hasta el momento de su muerte (Rojas, 2008, p.27).

6.2.7 Bacterias hidrocarbonoclastas.

Las bacterias hidrocarbonoclastas son capaces de utilizar los hidrocarburos alifáticos y/o aromáticos como fuente de carbono y energía (Cruz et al., 2017, p.213), sin embargo, deben existir

proporciones adecuadas de elementos como carbono, hidrógeno, nitrógeno y fósforo (Castro-Mancilla et al., 2013, p.222).

6.3 Marco legal

En Colombia no existe una legislación específica que aborde los problemas por hidrocarburos o específicamente del diésel, aunque en la Tabla 1 se pueden apreciar algunos apartados asociados a la conservación y uso del suelo que igualmente deben ser tenidos en cuenta.

Tabla 1.

Normatividad asociada al recurso suelo.

Normas internacionales	
Declaración de Río de Janeiro sobre el medio ambiente y el desarrollo de 1992	Regida a nivel mundial dónde se formularon 27 principios básicos sobre el desarrollo sostenible, la dignidad humana, el medio ambiente y las obligaciones de los Estados en materia de preservación de la conservación de un medio ambiente digno para la vida de los seres humanos.
Protocolo de Lousiana 29B	Presenta los límites permisibles para parámetros fisicoquímicos referentes a la calidad del suelo.
Constitución política de Colombia	
Artículo 8	El estado y las personas están obligados a proteger las riquezas culturales y naturales de la nación.
Artículo 80	El estado está encargado de la planificación del manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, dónde se garantice el desarrollo sostenible, conservación, restauración o sustitución del mismo. Además, debe prevenir y controlar el deterioro ambiental.
Artículo 95	Las personas tienen el deber de proteger los recursos naturales del país y velar por la conservación de un medio ambiente sano.
Normas nacionales	
Ley 23 de 1973	El objeto de esta es la prevención y el control de la contaminación del medio ambiente, como también buscar el mejoramiento, la conservación y la restauración de recursos naturales renovables, con el fin de mantener la salud y bienestar de la población nacional.

Tabla 1. (Continuación).

Ley 99 de 1993	Se crea el Ministerio de medio ambiente y el Sistema nacional ambiental (SINA).
Ley 491 de 1999	Se crearon los seguros ecológicos para permitir cubrir los perjuicios económicos cuantificables a determinadas personas como parte o consecuencia de daños ambientales y los recursos naturales, también se hace una reforma en lo relativo a los delitos ambientales.
Decreto 2811 de 1974	Artículo 39: Las instalaciones que deban construirse, en las explotaciones de hidrocarburos y gases naturales, y las precauciones para que los derrames de petróleo y escapes gaseosos no dañen los contornos terrestres o acuáticos.
Decreto 2811 de 1974	Artículo 180: Las personas que realizan actividades agrícolas, pecuarias, forestales o de infraestructura, que afecten o puedan afectar los suelos, están obligados a llevar a cabo prácticas de conservación y recuperación de los suelos.
Decreto 050 de 2018	Artículo 182: Estarán sujetos a adecuación y restauración de los suelos que se encuentren sujetos a limitaciones fisicoquímicas o biológicas que afecten la productividad del suelo.
Decreto 050 de 2018	Artículo 2.2.3.3.4.14. Todos los usuarios que exploren, explote, manufacturen, refinen, transporten, procesen o que almacenen hidrocarburos o sustancias que sean nocivas para la salud, deberán tener un plan de contingencia para el manejo de derrames.
Decreto 050 de 2018	Artículo 2: Formular políticas y expedir normas, directrices e impulsar planes, programas y proyectos dirigidos a la conservación, protección, restauración, recuperación y rehabilitación de los suelos.
Resolución 0170 de 2009	Artículo 3: el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y demás entidades del SINA, deberán promover e impulsar acciones tendientes a la reducción que genera el impacto de las actividades productivas sobre los suelos, a fin de luchar contra la desertificación y los efectos que esta causa a los recursos naturales, el medio ambiente y a las comunidades de base.

Nota: Por: González y Mora.

7. Metodología

7.1 Toma de muestra del suelo

Para la toma de la muestra del suelo se utilizó la metodología propuesta por Corpoica “*Guía toma de muestras de suelo*” de acuerdo con la NTC 4113-2 del 2007.

Se realizaron muestras de un suelo dentro del predio del IEAG, utilizados para distintos cultivos (plátano, yuca, cítricos).

Se eligió un total de cuatro puntos de muestreo por triplicado para la evaluación de los procesos microbianos y una cantidad aleatoria de puntos de muestreo en zigzag para las pruebas físicas y químicas, se rotuló cada una de las muestras con fecha, hora y número de muestra (Figura 3).



Figura 3. Toma de muestras del suelo. Por: González y Mora.

7.2 Contaminación ex situ con Diésel

De acuerdo con Hernández et al. (2003), se determinó emplear los siguientes volúmenes 0 ml, 200, 500 y 800 ml de diésel, vertidos a reactores, conteniendo 7 kg de suelo (Figura 4) y una muestra testigo sin contaminar, todas por triplicado, para un total de 12 reactores.



Figura 4. Reactores con muestra de suelo contaminada con diésel. Por: González y Mora.

7.3 Características físicas del suelo

El procesamiento de las características físicas del suelo se llevó a cabo en el laboratorio de suelos de la Universidad Santo Tomás, sede Villavicencio, empleando las siguientes metodologías: textura por el método de sedimentación, densidad aparente por método de cilindro, densidad real por método del picnómetro (Figura 5) y porosidad. La interpretación de los datos se realizó de acuerdo con la clase textural del suelo.

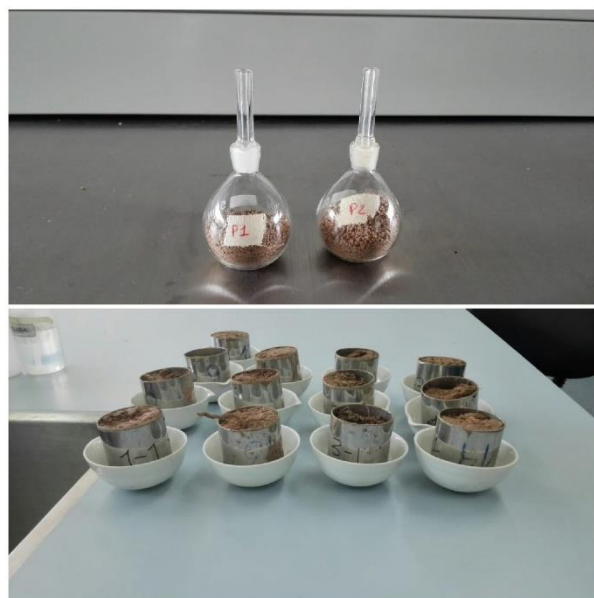


Figura 5. Prueba de densidad real por el método de picnómetro y densidad aparente por el método de anillos. Por: González y Mora.

7.4 Características químicas del suelo

Las características químicas fueron procesadas en el laboratorio de química de suelos, aguas y plantas de la corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA) en el centro de investigación Tibaitata, empleando las siguientes metodologías: pH (VC_R_004 versión 03), materia orgánica (MO) (Walkey & black) fósforo disponible Bray II (VC_R_007 versión 02), azufre disponible (Fosfato monobásico de calcio), conductividad eléctrica en suelos (NTC 5596:2008), cationes cambiabiles en suelo calcio, magnesio, potasio y sodio (ID_R_072 versión 5), micronutrientes en suelo por Olsen modificado hierro, manganeso, cobre y zinc (NTC 5526:2007).

7.5 Recuento y viables de bacterias Fijadoras de Nitrógeno

Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Santo Tomás sede Villavicencio y se dividió en dos partes:

7.5.1 Recuento de bacterias Fijadoras de Nitrógeno en Medio de cultivo Rennie Modificado.

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó el medio de cultivo Rennie Modificado (0.8 g K_2HPO_4 (Biopack), 0.2 g KH_2PO_4 (Merck), 0.1 g NaCl (Merck), 0.028 g EDTA Na $2H_2O$ (Biopack), 0.025 g $MoNa_2O_4 \cdot 2H_2O$ (Biopack), 15 g Agar (SIGMA-ALDRICH) y 900 ml Agua destilada, sugerido por Hernández, et al, en 2003, al no poseer nitrógeno en su composición, este medio de cultivo selectivo, permite la identificación de colonias con potencial para la fijación de nitrógeno atmosférico (Salazar y Ordoñez, 2013, p. 43).

A partir de una muestra de 10 gr de suelo resuspendida en 100 ml de solución salina 0.85% y homogenizada en un rotador orbital durante 30 minutos, se procedió a realizar diluciones seriadas desde 10^0 hasta 10^{-5} por triplicado, en solución salina, y sembradas en superficie en medio de cultivo Rennie Modificado (Figura 6). Incubando durante 8 días a una temperatura de $35^\circ C$ en un horno Thermo Scientific® referencia HeraTherm. El proceso se realiza una vez cada mes durante tres meses a las cuatro muestras de cada uno de los reactores.

El recuento de la población microbiana se realizó una vez concluido el periodo de incubación, informado como Unidades Formadoras de Colonia por gramo de suelo (UFC g^{-1} suelo), siguiendo la NTC 4092 apartado 10.3.2.2 para el recuento de colonias totales. Seguidamente, se identifican macroscópicamente cuáles de las colonias tienen mayor crecimiento en el medio selectivo y se procede a realizar siembras por agotamiento en el medio de cultivo Rennie Modificado hasta obtener cultivos puros.

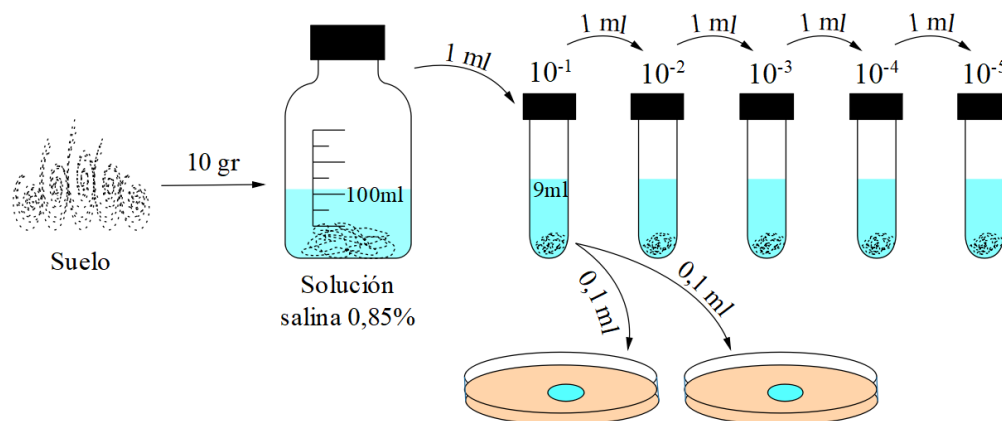


Figura 6. Método diluciones seriadas utilizado en el caso de estudio. Por: González y Mora.

7.5.2 Aislamiento y caracterización de cepas en medio de cultivo Rennie Modificado.

Se continúa el aislamiento y la caracterización de los microorganismos empleando el agar Rennie Modificado, por medio del método de siembra por agotamiento hasta obtener cepas puras, siendo el criterio de selección las colonias que presenten mayor crecimiento en el medio durante todas las diluciones.

7.6 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas

7.6.1 Caracterización macroscópica.

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

7.6.2 Caracterización microscópica.

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

7.7 Caracterización bioquímica

MacFaddin, (2000) menciona en el libro *Biochemical Test for identification of medical bacteria*, que los ensayos bioquímicos son pruebas empleadas para identificar de forma clara y precisa, la presencia o ausencia de una enzima, de grupos enzimáticos o vías metabólicas en los microorganismos. A partir de la aplicación de estas pruebas, se logra la identificación en género o especie de un microorganismo (Salazar y Ordóñez, 2013).

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

7.7.1 Prueba de la Oxidasa.

Esta prueba determina si hay presencia de enzimas oxidasas. Se impregnó una tira de papel filtro con una masa de colonias bacterianas y añadió reactivo de Kovacs (este se oxida por la citocromo-oxidasa). Si la zona impregnada se torna color azul-violeta es oxidasa positiva, si hay ausencia de color es oxidasa negativa (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014, p.74).

7.7.2 Prueba de la Catalasa.

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

de catalasa por la producción de burbujas (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014, p.74).

7.7.3 Prueba de Citrato de Simmons.

Determina si el microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y crecimiento, provocando su alcalinidad, se toma una colonia aislada en el medio y se inocula en estría sobre la superficie en pico de flauta, se incuba durante 48 horas, si el medio se torna color azul es positivo y si se mantiene de color verde es negativo (Bailón, González y Cervantes, 2003, pg. 42-47).

7.7.4 Prueba agar triple azúcar hierro (TSI).

Aunque es un medio para enterobacterias, es una prueba que se usa comúnmente para la fermentación de la glucosa, lactosa, sacarosa y la producción de H₂S. La siembra se realizó en un medio sólido en pico de flauta haciendo una inoculación por picadura y estría, se incubó durante 24 horas, si el medio es totalmente rojo no hay fermentación de glucosa, pico rojo/fondo amarillo el microorganismo solo fermenta glucosa, pico amarillo/fondo amarillo el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa, la presencia de burbujas indica que el microorganismo produce gas y por último el ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce H₂S (Bailón, González y Cervantes, 2003, p.102-111).

7.7.5 Prueba de Agar Lisina Hierro (LIA).

Determina la capacidad enzimática de un organismo para la descarboxilación de un aminoácido (lisina y arginina) para formar una amina. La siembra se realizó en medio sólido en pico de flauta haciendo una inoculación por picadura y estría, se incubó 24 horas, si el pico del medio es violeta y el fondo también hay descarboxilación de la lisina, si el pico es rojizo y el fondo amarillo hay desaminación de la lisina y por último si hay ennegrecimiento del medio hay producción de H₂S (Bailón, González y Cervantes, 2003, p.112-115).

7.7.6 Prueba de Sulfuro indol y movilidad SIM.

Permite determinar si un organismo tiene movilidad, libera ácido sulfhídrico por acción enzimática de los aminoácidos que contienen azufre y posee la capacidad de desdoblar el indol de la molécula triptófano. Mediante la inoculación por punción recta central, la movilidad es positiva si se observa turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra, H₂S positivo si hay ennegrecimiento del medio y por último se añade 3 gotas de reactivo de ovacs si el medio se torna rojo en la superficie es indol positivo (Bailón, González y Cervantes, 2003, p.92-101).

7.7.7 Prueba de Tioglicolato.

Esta prueba favorece el crecimiento de gran variedad de microorganismos, incluidos los nutricionalmente exigentes. El escaso contenido de agar le permite ser un medio semi-sólido y que retarda la dispersión de CO₂ y O₂, por lo que se desarrollan microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y estrictos. Se toma el inóculo se suspende en solución salina estéril al 0,85%, posteriormente se transfieren 2 gotas al medio de cultivo y se incuba durante 24 horas. Los microorganismos aerobios crecen en la superficie del medio, los anaerobios facultativos crecen en todo el medio y por último los anaerobios estrictos crecen en las profundidades del medio de cultivo (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014, p.60-64).

7.7.8 Prueba Rojo Metilo y Voges-Proskauer (RM-VP).

Determina la capacidad de los organismos de fermentar glucosa por vía butilglicólica o butanodiólica con producción de acetoína como un compuesto intermedio, por medio de difusión se sembró en medio líquido, se incubó durante 48 horas, luego se dividió el contenido en dos tubos. Para la Prueba rojo metilo (RM) se utilizó dos gotas del reactivo rojo metilo, si el medio se torna color rojo es positivo y si no cambia de color o se torna amarillo el resultado es negativo. Para la prueba Voges-Proskauer se utiliza 2 gotas de KOH y 2 gotas de α -naftol que permite detectar la acetoína producto de la fermentación del butilén-glicolina, si el medio se torna color rojo es positivo y si se torna amarillo o no cambia de color es negativo (Bailón, González y Cervantes, 2003, p.73-81).

7.8 Identificación molecular de bacterias

Las identificaciones moleculares de bacterias fueron procesadas en los laboratorios de la Corporación CorpoGen en Bogotá, aplicando el protocolo de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa –PCR-, de la región genética que codifica para la subunidad 16s del RNA ribosomal de procariotas, que permitió la clasificación taxonómica de la secuencia consenso.

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

Las pruebas de producción de nitritos y amonio fueron procesadas en los laboratorios de TECNO Ambiental S.A.S. en el municipio de Villavicencio empleando las siguientes metodologías: Amoniaco (SM 4500-NH₃ B C) y Nitritos (SM 4500 NO₂ B).

Para realizar dicha actividad, se sembraron las cepas puras en frascos de vidrio con capacidad de 500ml, los cuales contenían 150 ml de medio de cultivo Rennie Modificado (en estado líquido) y 2 ml Diésel como fuente de carbono, se tuvo en cuenta el 0.5 de McFarland y se llevó a incubación durante 8 días, seguidamente la muestra se diluyó con agua destilada hasta llegar a 1500 ml de muestra (por requerimiento del laboratorio).

7.10 Diseño experimental y Análisis estadístico

El diseño experimental de la investigación se compone de 3 tratamientos, más uno de control (testigo). El cual es dividido en dos por las diferencias metodológicas desarrolladas entorno a las características fisicoquímicas y microbiológicas. Las características fisicoquímicas se componen de un tamaño de 4 muestras y el diseño experimental para las características microbiológicas contiene tiene un tamaño de 12 unidades muestrales (Figura 7).

El diseño experimental se realizó de acuerdo con el utilizado en la investigación de Hernández et al. (2003). Se realizaron tres muestreos a cada tratamiento durante el experimento para evaluar la densidad microbiana a 1, 2 y 3 meses después de la contaminación. Para el caso de parámetros fisicoquímicos se realizó un muestreo en el primer mes de la contaminación, con respecto a la identificación se realizó un muestreo al inicio y al final del proceso.

Se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las variables evaluadas, la comparación entre medias se llevó a cabo de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), el grado de covariación entre distintas variables relacionadas linealmente se llevó a cabo por medio del coeficiente de correlación de Pearson comprobándose su nivel de significancia mediante la prueba t Student, se elaboró una matriz de correlación de Pearson para las características químicas del suelo, y luego, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) por último, los datos fueron procesados mediante la herramienta Microsoft office Excel.

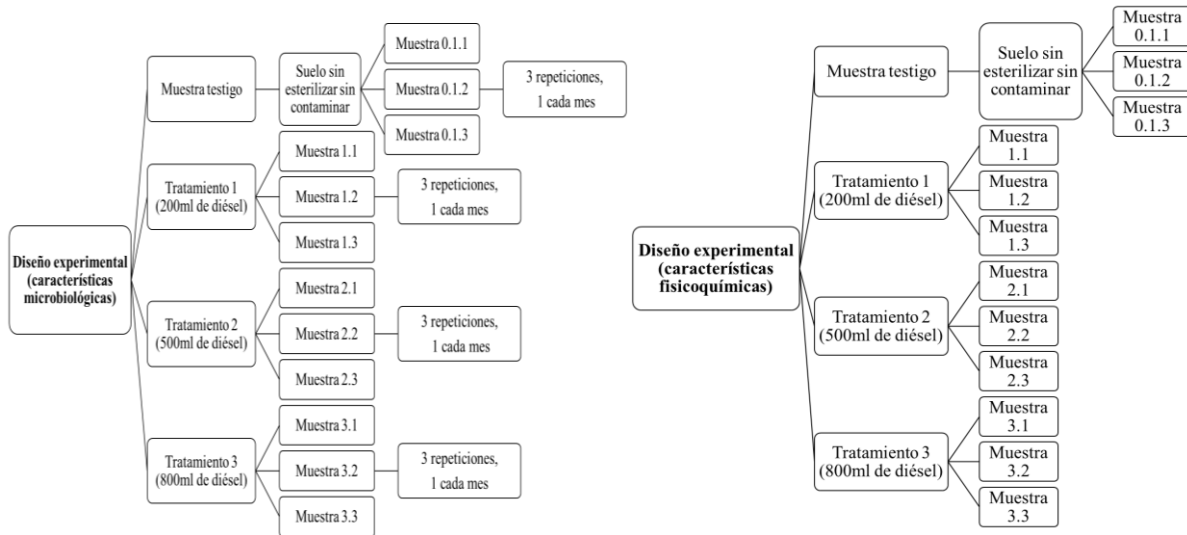


Figura 7. Diseño experimental características microbiológicas y diseño experimental parámetros físico-químicos. Por: González y Mora.

8. Resultados y análisis de los resultados

8.1 Contaminación ex-situ con Diésel

El volumen de diésel correspondió a 0, 200, 500 y 800 ml por triplicado en reactores de polipropileno cada uno con 7 kg de suelo; para establecer la relación existente entre miligramos de diésel por cada kilogramo de suelo se determinó la concentración, como se observa en Tabla 2.

Tabla 2.

Concentraciones de diésel aplicadas a los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Diésel adicionado (ml)	Concentración de diésel (mg kg ⁻¹ de suelo)
Testigo	0	0
1	200	2500
2	500	6100
3	800	9800

Nota: Por: González y Mora.

8.2 Características físicas del suelo

8.2.1 Textura.

La técnica empleada para determinar la textura por sedimentación fue el método de Bouyoucos, con el fin de determinar los porcentajes de los diferentes separados del suelo (arena, limo y arcilla) (Tabla 3).

Tabla 3.

Resultados de textura por sedimentación.

Separado	Unidad	Resultado
Arcilla (< 0,002 mm)	%	22,72
Limo (0,05 - 0,002 mm)	%	2,73
Arena (2 - 0,05 mm)	%	74,55

Tabla 3. (Continuación).

Textura Franco arcillo arenoso (FArA)

Nota: Porcentajes de la distribución de las partículas minerales en el suelo. Por: González y Mora.

Los valores dispuestos en la tabla 3 se ubicaron en el esquema triangular de las texturas de la USDA, lo cual indicó que la clase textural era Franco arcillo arenoso (FArA), considerando que los resultados se encontraban entre el rango de arena (45-80%), limo (0-28%) y arcilla (20-35%) (Jaramillo, 2002). Por su parte, Jamioy (2011), Villegas (2012) y Marín (2017) también reportaron textura FArA en suelos del piedemonte llanero. Cabe mencionar que la textura se relaciona con otras propiedades del suelo, como la porosidad, la aireación y el movimiento del agua.

8.2.2 Densidad aparente.

La densidad aparente se estableció por el método del cilindro, esta arrojó un resultado de 1,10 gr/cm³, siendo menor al rango de valores normales (1,2 a 1,4 gr/cm³) mencionado por Murillo (s.f.) para suelos de textura FArA. En el caso de Villegas (2012) reportó una densidad aparente de 1,37gr/cm³, mientras que Jamioy (2011) indicó rangos de densidad aparente entre 1,44 y 1,58 g/cm³ en suelos del piedemonte llanero clasificados como FArA. El valor de la densidad aparente puede variar por diversos factores como la textura, la estructura y el contenido de materia orgánica (Marín, 2017). Además, se relaciona con la porosidad, ya que a menor densidad aparente mayor espacio poroso.

8.2.3 Densidad real.

La densidad real se determinó con el método del picnómetro, como resultado se obtuvo un valor de 2,28 gr/cm³, el cual es inferior al rango dado por Ibáñez (2007) de 2,58 a 2,66 g/cm³ para suelos con textura FArA. Por su lado, Jamioy (2011) reportó densidad real entre los rangos 2,42 a 2,66 g/cm³, mientras que Villegas (2012) informó 2,69 gr/cm³ en suelos del piedemonte llanero clasificados como FArA.

8.2.4 Porosidad.

La porosidad se determinó teniendo en cuenta la relación de la densidad aparente y la densidad real, dando como resultado una porosidad de 51,75%, valor que según Jaramillo (2002) se clasifica como satisfactorio, además, se encuentra dentro del rango de valores normales (47 a 54%) proporcionado por Murillo (s.f) para suelos de textura FArA. Igualmente, en suelos del piedemonte llanero clasificados como FArA Villegas (2012) reportó la porosidad en 53,2%, mientras que Jamioy (2011) encontró rangos de 36,22% a 42,79%. Cabe mencionar que la porosidad está relacionada con la textura, la densidad aparente y la estructura (RucksL, 2004; citado por Marín, 2017).

8.3 Características químicas del suelo.

Los resultados obtenidos de los parámetros químicos en los cuatro tratamientos (Tabla 4), indican que algunos parámetros se vieron afectados rápidamente por la presencia de diésel mientras que otros no variaron su nivel. En particular, el pH se mantuvo en fuerte a extremadamente ácido, al igual que la conductividad eléctrica como no salino y la capacidad de intercambio catiónico en nivel bajo, sin embargo, la cantidad de materia orgánica incrementó a medida que aumentaban las concentraciones de diésel. Con respecto a la relación de los macroelementos con el aumento en estas concentraciones, en los primarios, tanto Potasio como Fósforo disminuyeron, mientras que Nitrógeno aumentó, y por su parte, los secundarios sostuvieron sus niveles, dado que Azufre y Calcio se mantuvieron en nivel medio y Magnesio en nivel bajo. Mientras, que en los microelementos Hierro, Manganeso y Zinc conservaron su nivel alto, Cobre presento una leve reducción y Boro un leve incremento.

Tabla 4.

Resultados de los parámetros químicos.

Determinación Analítica	Unidad	Método	Testigo	T1	T2	T3
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 (MO)	%	Walkey & Black	1,69	2,66	3,1	3,54

Tabla 4. (Continuación).

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 de intercambio catiónico (CIC)	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
Hidrocarburos Totales (TPH)	%	Ultrasonido NMX-AA-145 SCFI-2008 IR SM 5520C.F	0,004	3,7	5,26	6,6

Nota: Por: González y Mora.

El suelo no contaminado, usado como testigo presentó un pH de 5,37 similar al pH de 5,3 reportado por Venegas (2012) y se encuentra dentro del rango dado por Jamioy (2011) de 4,03 a 5,88. El contenido de materia orgánica fue de 1,69%, el cual es inferior al rango informado por Villegas (2012) de 2 a 3,1% y al de Rincón et al. (2010) entre 1,9 y 3%. El nitrógeno fue de 0,08%

mayor al 0,03% indicado por Venegas (2012). Se obtuvo una capacidad de intercambio catiónico de 5,73 cmol/kg y manganeso de 32,04 mg/kg valores similares al 5,02 cmol/kg y 33,7 mg/kg reportados por Venegas (2012) respectivamente.

Para comprender a modo general el comportamiento de los tratamientos se elaboró una tabla de correlación de Pearson (Apéndice B), demostrando la relación e influencia entre estas variables químicas, encontrando relaciones positivas con altos valores significativos entre MO y N (1) y TPH con MO y N (0,999), indicando que al incrementar una de estas variables, la otra también aumenta, correlación que es acertada, debido a la acumulación de N en la MO del suelo (Mahecha, 2011), por lo cual, la MO es considerada como la principal fuente de N (Garzón y Perdomo, 2015). Por su parte, el TPH se relaciona con la MO, dado que el diésel contiene pocos compuestos volátiles y al determinar la MO por el método Walkey & Black se oxida en su mayor parte, aumentando el contenido de MO (Martínez y López, 2001).

Posteriormente, se elaboró el ACP, con el fin de reducir el número de variables originales a un conjunto mínimo de datos y así, seleccionar los componentes que garanticen la mayor variabilidad. De acuerdo con los valores propios, se utilizaron los componentes 1 y 2, dado que explican el 94,34% de la variación total de los datos, es decir, el 81,26% y el 13,07% respectivamente. Seguidamente, se elaboró el biplot correspondiente con las variables químicas y las observaciones activas, en este caso, los diferentes tratamientos de diésel (Figura 8).

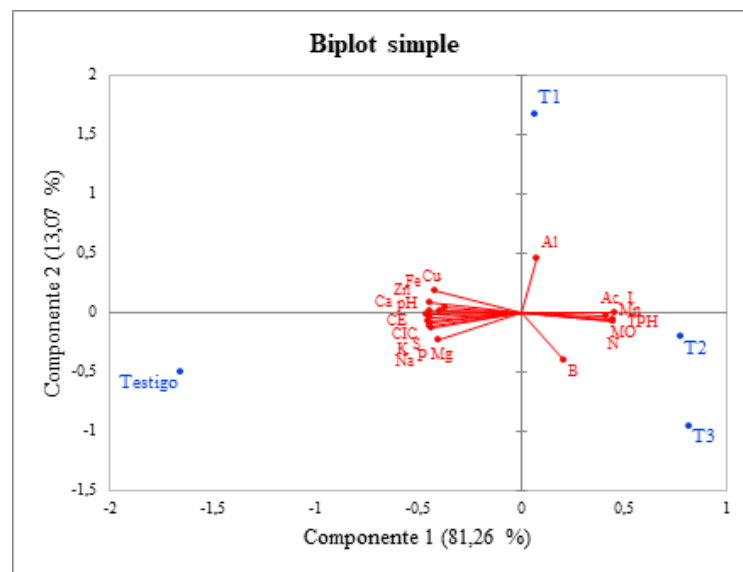


Figura 8. Biplot simple para propiedades químicas con los diferentes tratamientos. Por: González y Mora.

En la figura 8 se puede observar que los tratamientos están ubicados en diferentes cuadrantes (con excepción de T2 y T3), estos puntos alejados entre sí, representan diferencias entre los tratamientos. La distribución de los vectores permite distinguir cada tratamiento, igualmente indica que todas las propiedades son importantes, mientras que los ángulos entre ellos representan la posible relación de las variables, dado que ángulos agudos (menor de 90°) significan correlación positiva, ángulos rectos (90°) tienen correlación nula y ángulos obtusos (mayor de 90°) la correlación es negativa. La ubicación positiva de la variable Al incide en el T1, las variables negativas próximas a -1, como TPH, MO, N, Ac. I. y Mn inciden en los tratamientos con mayores concentraciones de diésel, es decir, T2 y T3, presentando una correlación positiva, aunque, T3 se ve influenciado por B. El testigo se relaciona de manera directa con CE, CIC, S, P, K, Na y Mg, indicando una correlación positiva, los cuales a su vez se relacionan de manera negativa con el otro grupo de variables.

8.4 Recuento de Bacterias Libres Fijadoras de Nitrógeno en Medio de Cultivo Rennie Modificado

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

Se evaluó las poblaciones de BLFN en un suelo proveniente del piedemonte del municipio de Cumaral-Meta contaminado con diferentes concentraciones de diésel (0, 2500, 6100 y 9800 $mg\ kg^{-1}$) durante un periodo de (3) tres meses. Se observó que no existen diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$); la mayor densidad poblacional se presentó en el tercer mes con $2,4 \times 10^6$ UFC g^{-1} a una concentración de 6100 $mg\ kg^{-1}$, mientras que la población menor se presentó en la muestra testigo durante el primer mes con una densidad de $2,9 \times 10^5$ UFC g^{-1} de suelo (Figura 9).

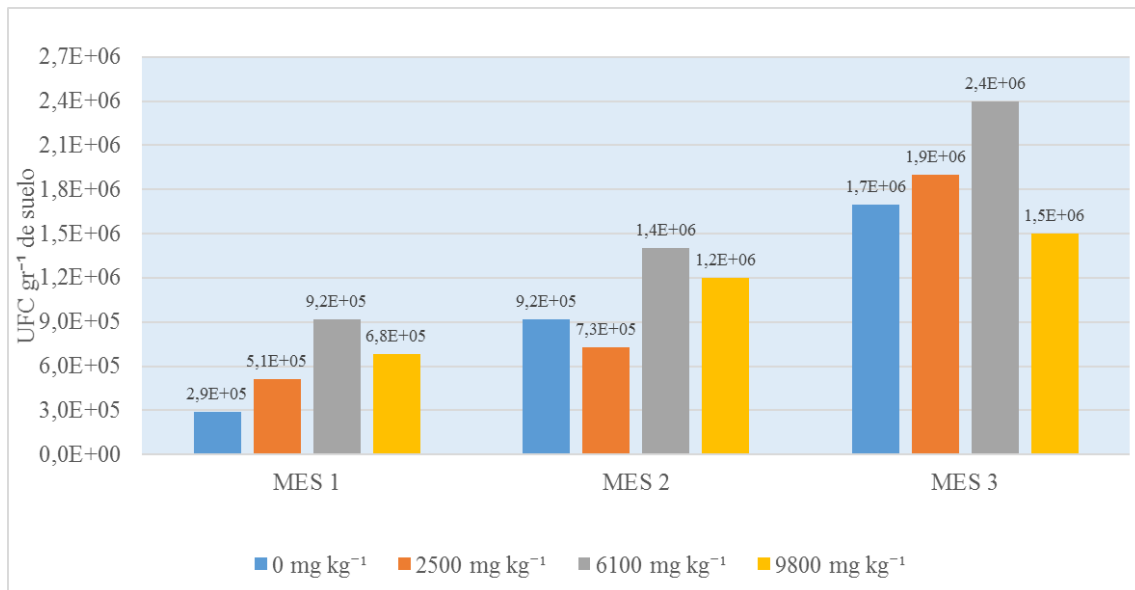


Figura 9. Densidad microbiana en UFC gr⁻¹ de suelo en concentraciones 0, 2500, 6100 y 9800 mg kg⁻¹ Diésel, a través del tiempo. Por: González y Mora.

La presencia del diésel aumentó la densidad microbiana en los 3 tratamientos con respecto al testigo, lo que concuerda con Freedman (1989) que hace referencia a que algunos microorganismos aumentan su población cuando hay presencia de hidrocarburos (Vázquez-Luna et al., p 520). Mohamad et al (2004) aporta que, para la degradación de los hidrocarburos, se requiere más de una especie microbiana, debido a que cada microorganismo puede solo degradar una pequeña parte de las moléculas que lo conforman, transformando estas en subproductos que pueden ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos naturales (Arrieta et al., 2012, p. 28), como en este caso, donde los microorganismos estudiados se encargan de fijar nitrógeno atmosférico utilizando el diésel como única fuente de carbono y energía.

Con el fin de contrastar los efectos del contaminante en las poblaciones de BLFN, se presenta un comparativo donde se asocia la muestra testigo con cada uno de los tratamientos teniendo en cuenta la varianza entre datos.

El análisis de varianza no mostró diferencias significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) entre la concentración 2500 mg kg⁻¹ y la muestra testigo (Figura 10). En los meses uno (1) y tres (3) la densidad microbiana fue mayor en presencia de diésel, caso contrario al mes dos (2), donde la población mayor estuvo en el suelo sin contaminante, es decir, el aumento total promedio con

respecto a la testigo fue del 3,09%. Lo que permite inferir que a esta concentración no hay mayor impacto en las poblaciones de BLFN.

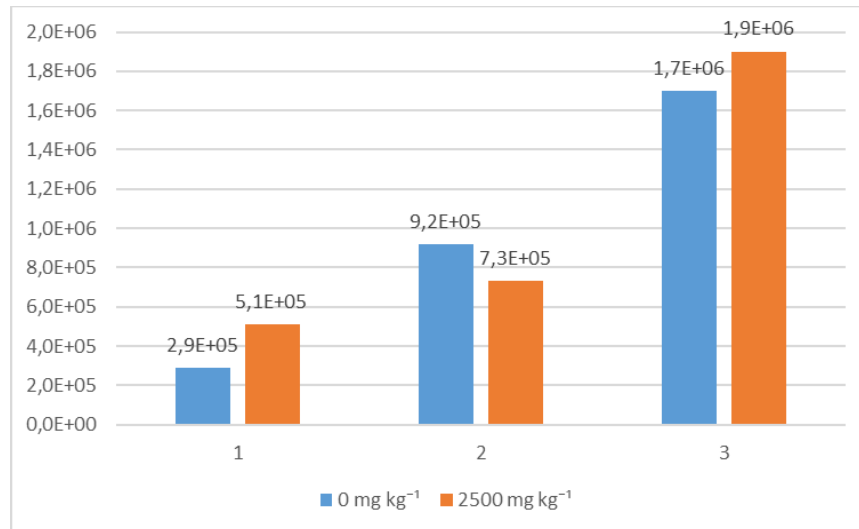


Figura 10. Comparativa densidad microbiana en UFC g⁻¹ entre muestra testigo y concentración de 2500 mg kg⁻¹. Por: González y Mora.

Por otra parte, el comportamiento en la densidad poblacional de las BLFN durante el tratamiento con 6100 mg kg⁻¹ de diésel con respecto al testigo fue exponencial, evidenciado en un aumento total promedio del 64,94%, aunque sin diferencia significativa (Tukey, $P \leq 0.05$) como se observa en la Figura 11. Tal como lo afirman Hernández et al. (2003), puesto que la presencia de hidrocarburo no afecta drásticamente el crecimiento y la función fijadora de nitrógeno de las BLFN, por el contrario, se encontró que las bacterias podían llevar a cabo dicha función elevando su población con respecto al suelo sin contaminante. Durante la evaluación obtuvieron poblaciones microbianas fijadoras de nitrógeno de hasta 4×10^6 UFC g⁻¹ con una concentración de hidrocarburo de 2500 mg kg⁻¹ y 3×10^6 UFC g⁻¹ en el suelo sin contaminar.

Entre tanto, Castro et al. (2013) afirma en su investigación que un balance entre carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P) en el suelo favorece el aprovechamiento de hidrocarburos por diferentes poblaciones microbianas, entre ellas las BLFN, los resultados obtenidos muestran que el suelo sin contaminante tiene una población total de 1×10^5 UFC g⁻¹, mientras que el suelo con diésel, más nitrógeno y fósforo alcanzó una población de 1×10^8 UFC g⁻¹, por otro lado el suelo con solo la adición de diésel alcanzó valores de 1×10^7 UFC g⁻¹.

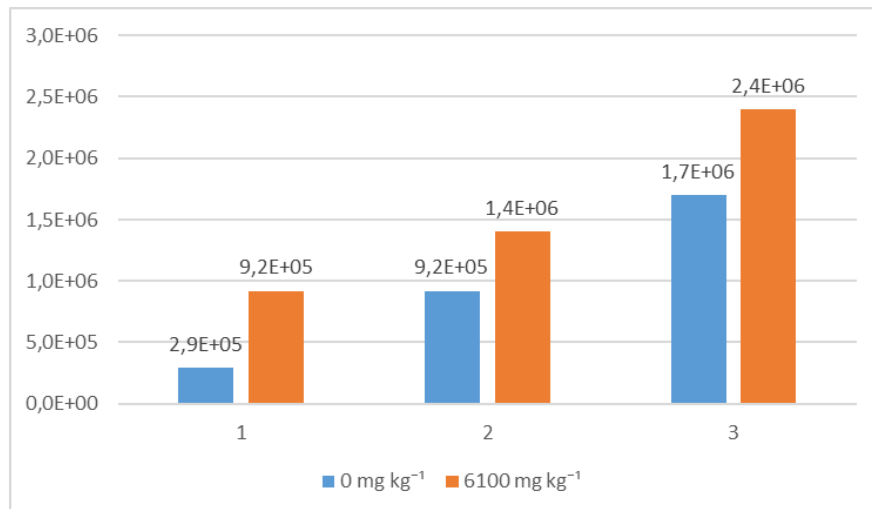


Figura 11. Comparativa densidad microbiana en UFC gr⁻¹ entre muestra testigo y concentración de 6100 mg kg⁻¹. Por: González y Mora.

Por último, la Figura 12 muestra el comparativo efectuado para la concentración 9800 mg kg⁻¹ donde se observa un aumento del 16,15% en el promedio total de las densidades con respecto a la muestra testigo, también se evidencia que los meses uno (1) y dos (2) presentan densidades superiores en la muestra contaminada, comportamiento contrario al mes tres, donde se registra un menor recuento microbiano. Sin embargo, según el análisis de varianza efectuado la diferencia entre estas no es significativa (Tukey, $P \leq 0.05$).

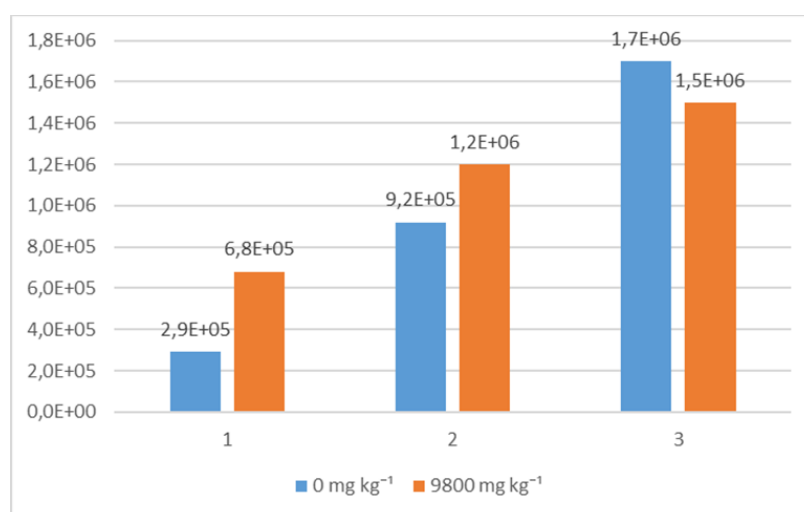


Figura 12. Comparativa densidad microbiana en UFC gr⁻¹ entre muestra testigo y concentración de 9800 mg kg⁻¹. Por: González y Mora.

En las concentraciones 2500 mg kg^{-1} y 9800 mg kg^{-1} se presenciaron poblaciones menores que en el testigo durante el mes dos (2) y tres (3) respectivamente, este comportamiento de disminución e incremento de poblaciones microbianas está asociado a lo expresado por investigadores como Frois-Duarte et al., (2001) que indican que las poblaciones microbianas responden ante la contaminación con hidrocarburos, cambiando su estructura a una que le permita a los organismos sobrevivir bajo estas nuevas condiciones del suelo a expensas de otros microorganismos (Vázquez-Luna et al., p.515-516).

En la región de piedemonte llanero no se encuentran estudios similares, aunque Vanegas (2012) reportó poblaciones promedio de $1,2 \times 10^7 \text{ UFC g}^{-1}$ de bacterias fijadoras de nitrógeno en diferentes zonas del departamento del Meta dedicadas a los cultivos de arroz seco y de $2,2 \times 10^7 \text{ UFC g}^{-1}$ para cultivos de arroz inundados, que son significativamente superiores a los obtenidos en la muestra sin contaminante de este estudio, donde la población máxima fluctuó en $9,7 \times 10^5 \text{ UFCg}^{-1}$, se infiere que la diferencia en los recuentos bacterianos es debido a que los cultivos requieren de ciertas cantidades de nutrientes y como menciona Castro et al. (2013) la adición de fertilizantes químicos aumenta la densidad poblacional de microorganismos presentes en el suelo.

8.5 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas

A partir de los recuentos en placa en el medio de cultivo Rennie modificado (medio de cultivo libre de Nitrógeno que permite el aislamiento de microorganismos con capacidad de fijar Nitrógeno de la atmósfera) para los tratamientos evaluados, se aislaron un total de 27 cepas, seleccionadas por ser presuntivamente las que más se encontraban a lo largo de dichos recuentos. Estos aislamientos fueron realizados utilizando el método de siembra por agotamiento hasta obtener cepas puras, a las que luego se les realizó una caracterización macroscópica (descripción de la colonia) y microscópica (tinción de Gram) como se observa en la Tabla 5.

Tabla 5

Caracterización macro y microscópica de las cepas aisladas en medio de cultivo Rennie Modificado.

Cepa	Código cepa	Características macroscópicas	Características microscópicas	Selección
1	RM_D_01	Colonia cremosa, color transparente, forma redondeada.	Cocos Gram +	NO
2	RM_D_02	Colonia cremosa, color rojo opaco, forma redondeada.	Levadura	NO
3	RM_D_03	Colonia cremosa, color blanco, forma irregular.	Cocos Gram +	NO
4	RM_D_04	Colonia cremosa, color blanco, forma irregular	Cocos Gram -	NO
5	RM_D_05	Colonia seca, color blanco y centro amarillo claro, forma redonda y con filamentos, olor a tierra húmeda.	Bacilos Gram +	SÍ
6	RM_D_06	Colonia seca, adherida al medio, color blanco, forma irregular y centro elevado.	Cocos Gram +	NO
7	RM_D_07	Colonia cremosa, color transparente, forma redonda, tamaño puntilliforme.	Cocos Gram -	NO
8	RM_D_08	Colonia cremosa, color blanco, forma redonda.	Cocos Gram +	NO
9	RM_D_09	Colonia seca, color blanco y centro amarillo claro, forma redonda y con filamentos, olor a tierra húmeda.	Bacilos Gram +	SÍ
10	RM_D_10	Colonia seca, color blanco y centro amarillo claro, forma redonda y con filamentos, olor a tierra húmeda.	Bacilos Gram +	SÍ
11	RM_D_11	Colonia seca, color blanco y centro amarillo claro, forma redonda y con filamentos, olor a tierra húmeda.	Bacilos Gram +	SÍ
12	RM_D_12	Colonia cremosa, color rojo opaco, forma redondeada.	Levadura	NO
13	RM_D_13	Colonia cremosa, color transparente, forma redondeada.	Cocos Gram +	NO

Tabla 5. (Continuación).

13	RM_D_13	Colonia cremosa, color transparente, forma redondeada.	Cocos Gram +	NO
14	RM_D_14	Colonia cremosa, color transparente, forma redondeada.	Cocos Gram +	NO
15	RM_D_15	Colonia seca, adherida al agar, color blanco, forma irregular y centro elevado	Bacilos Gram -	NO
16	RM_D_16	Colonia seca, adherida al agar, color blanco, forma irregular y con filamentos, olor a tierra húmeda.	Bacilos Gram +	SÍ
17	RM_D_17	Colonia cremosa, color rojo opaco, forma redondeada.	Levadura	NO
18	RM_D_18	Colonia cremosa, color azulado con transparencia, forma redonda, tamaño puntilliforme.	Cocos Gram +	NO
19	RM_D_19	Colonia cremosa, color azulado con transparencia, forma redonda, tamaño puntilliforme.	Cocos Gram +	NO
20	RM_D_20	Colonia cremosa, color blanco, forma redonda, adherida al agar.	Cocobacilos Gram +	NO
21	RM_D_21	Colonia cremosa, color azulado con transparencia, forma redonda, tamaño puntilliforme.	Cocos Gram +	NO
22	RM_D_22	Colonia seca, adherida al agar, color blanco, forma irregular y con filamentos, olor a tierra húmeda.	Bacilos Gram +	SÍ
23	RM_D_23	Colonia cremosa, color blanco, forma redonda, adherida al agar.	Cocobacilos Gram +	NO
24	RM_D_24	Colonia cremosa, color azulado con transparencia, forma redonda, tamaño puntilliforme.	Cocos Gram +	NO
25	RM_D_25	Colonia cremosa, color azulado con transparencia, forma redonda, tamaño puntilliforme.	Cocos Gram +	NO
26	RM_D_26	Colonia cremosa, color blanco, forma redonda, adherida al agar.	Cocobacilos Gram +	NO

Tabla 5. (Continuación).

27	RM_D_27	Colonia cremosa, color blanco, forma redonda, adherida al agar.	Cocobacilos Gram +	NO
----	---------	---	--------------------	----

Nota: SÍ, selección por crecimiento en el medio, NO, Colonias descartadas por bajo crecimiento. Por: González y Mora.

8.6 Caracterización bioquímica

De los 27 aislamientos, se seleccionaron 6 cepas (RM_D_05, RM_D_09, RM_D_10, RM_D_11, RM_D_16 y RM_D_22) (Tabla 6), por demostrar mayor capacidad de crecimiento, y por ende, formación de biomasa en medio Rennie modificado, a las cuales se les realizó la caracterización bioquímica, permitiendo obtener una identificación preliminar del género comparando los resultados obtenidos en cada prueba con resultados referencia reportados para diferentes géneros en prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN) y methods for the taxonomic description of the Actinobacteria.

Tabla 6.

Caracterización bioquímica de las cepas aisladas en medio de cultivo Rennie Modificado.

PRUEBA BIOQUÍMICA	Oxidasa	Catalasa	Citrato de Simmons	TSI	LIA	Sulfuro	Indol	Movilidad	Tioglicolato	Prueba Rojo Metilo	Voges-Proskauer
CEPA											
RM_D_05	+	+	+	A/A	K/K	+	-	-	AE	-	-
RM_D_09	-	+	-	A/A	K/K	+	-	-	ANAF	-	-
RM_D_10	-	+	-	A/A	K/K	+	-	-	ANAF	-	-
RM_D_11	-	+	-	A/A	K/K	+	-	-	ANAF	-	-
RM_D_16	-	+	-	A/A	K/K	+	-	-	AE	-	-
RM_D_22	-	+	-	A/A	K/K	-	-	-	AE	-	-

Nota: Positivo: +, Negativo -, A/A Consumo de glucosa, lactosa, sacarosa, K/K no desaminación de Lisina, AE aerobio, ANAF anaerobio facultativo. Por: González y Mora.

La cepa RM_D_05 se trata de un bacilo Gram positivo aerobio inmóvil, catalasa y oxidasa positiva. Microorganismo capaz de utilizar como fuente de carbono y energía citrato, glucosa, lactosa y sacarosa, produce sulfuro de hidrógeno, pero no lisina decarboxilasa e indol.

Las cepas RM_D_09, RM_D_10 y RM_D_11 son bacilos Gram positivos no móviles, anaerobios facultativos, catalasa positiva, oxidasa negativa. No usan citrato como fuente de carbono, fermentan glucosa, lactosa y sacarosa. Presentan producción negativa de indol y lisina decarboxilasa, y positiva de ácido sulfhídrico. Estas tres cepas coinciden en todas sus características bioquímicas, como también lo hacen en las macroscópicas y microscópicas, por lo que se descartan RM_D_10 y RM_D_11 debido a que se puede tratar del mismo microorganismo.

La cepa RM_D_16 es un bacilo Gram positivo aerobio, no móvil, catalasa positiva y oxidasa negativa. Utiliza glucosa, lactosa y sacarosa como fuente de carbono. Producción positiva de ácido sulfhídrico, y negativa de indol y lisina decarboxilasa.

RM_D_22 es un bacilo Gram positivo aerobio, no móvil, catalasa positiva y oxidasa negativa. Usa como fuente de carbono glucosa, lactosa y sacarosa. No genera producción de indol, ácido de hidrógeno y lisina decarboxilasa.

8.7 Identificación molecular de bacterias

La identificación molecular se llevó a cabo con las 4 cepas (RM_D_05, RM_D_09, RM_D_16 y RM_D_22) finalmente seleccionadas a partir de la caracterización bioquímica, eligiendo la cepa RM_D_09, que coincidía en todas las capacidades bioquímicas, macroscópicas y microscópicas con las cepas RM_D_10 y RM_D_11, se enviaron a procesamiento al laboratorio de la Corporación CorpoGen en la ciudad de Bogotá D.C., obteniendo los siguientes resultados:

El aislamiento RM_D_05 según el clasificador RDP, y tras la generación del árbol de distancias construido a través de la base de datos NCBI RefSeq_RNA con las treinta secuencias de microorganismos más cercanas, determinó que este corresponde a un microorganismo del género *Kribbella* spp. Indicando que tiene un 99% de identidad en el 98% de su longitud, con secuencias del gen ribosomal 16S de las especies *Kribbella albertanoniae*, *Kribbella sandramycini* o *Kribbella yunnanensis*. Sin embargo, no se asigna la especie, aunque se destaca la alta similitud a nivel secuencial con los microorganismos anteriormente mencionados.

Yong-Ha Park et al. (1999) describieron taxonómicamente el género *Kribbella* spp. como una bacteria que muestra hifas ampliamente ramificadas, adheridas al agar, a menudo tienen forma de bastón a cocoide Gram variable, las colonias son pastosas, tienen formas liquenosas, bordes irregulares y son estrictamente aeróbicas, catalasa, oxidasa y urea positivas, en concordancia con los resultados de las pruebas bioquímicas anteriormente mencionadas para dicha cepa.

Las comparaciones de los aislamientos RM_D_09, RM_D_16, RM_D_22, contra las secuencias de 16S de RDP, indican que tienen mayor homología con secuencias del género *Amycolatopsis* spp. Igualmente los árboles de distancia construidos a partir de la base de datos NCBI RefSeq_RNA, con las treinta secuencias de microorganismos más cercanas, arrojan que estas se agrupan con secuencias de dicho género. El análisis taxonómico de los tres aislamientos contra la base de datos ref_seq del NCBI, muestra que tienen en promedio un 98,7% de identidad en el 98,5% de su longitud con secuencias del gen ribosomal 16S de 5 especies de este género: *Amycolatopsis echigonensis*, *Amycolatopsis albidoflavus*, *Amycolatopsis niigatensis*, *Amycolatopsis halotolerans* y *Amycolatopsis circi*.

Lechevalier, Prauser, Labeda y Ruan (1986) describieron taxonómicamente el género *Amycolatopsis* spp. como un actinomiceto formado por hifas vegetativas ramificadas, no siempre cuenta con micelios aéreos, son bacterias Gram positivas, mesófilas, aerobias, catalasa positiva y no móviles, características similares a las observadas en las pruebas bioquímicas de estas cepas.

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

Las pruebas de producción de nitritos y amonio dieron como resultado para todos los ensayos fuera de los límites de detección (Tabla 7), esto debido posiblemente a la dilución practicada en la muestra para el análisis de laboratorio, ya que inicialmente esta contenía 150 ml y el requerimiento mínimo era de 1500 ml, lo que significó diluir 9 veces la concentración inicial.

Tabla 7.

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

Cepa	Código Cepa	Amoníaco	Nitritos
5	RM_D_05	<1,2	<0,07
9	RM_D_09	<1,2	<0,07
16	RM_D_16	<1,2	<0,07
22	RM_D_22	<1,2	<0,07

Nota: Los resultados indicados como < (menor que) corresponden a los límites de detección de los métodos de ensayo.

Por: González y Mora.

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

En la figura 13, se observa que la nube de puntos es alargada apuntando a la recta y ascendente, por lo que según la naturaleza de los datos es apta la aplicación de este coeficiente lineal. El grosor de la dispersión de los datos es estrecho lo que implica una mayor correlación, por lo tanto, menor es el margen de variación en Y para los valores en X, presentándose una correlación directa alta ($r=0,809$) y diferencias no significativas ($P \leq 0.05$) entre el nitrógeno total del suelo y la población de BLFN. Las dos variables aumentan una dependiendo directamente de la otra; la muestra testigo presenta la menor densidad microbiana ($2,9 \times 10^{-5}$ UFC g^{-1}) y el menor contenido de Nitrógeno (0,0845%), mientras que el mayor aumento de nitrógeno (0,177%) se evidenció en el tratamiento 2 donde la densidad microbiana fue de $6,8 \times 10^{-5}$ UFC g^{-1} , interpretándose así, que la densidad microbiana es responsable del 65% de la variabilidad del Nitrógeno total en el suelo de los diferentes tratamientos.

Autores como Córdova-Bautista et al. (2009) afirman para su investigación que la densidad microbiana y el Nitrógeno total tienen una correlación positiva ($r=0,723$), dado que a mayor población de bacterias fijadoras de nitrógeno ($3,7 \times 10^4$ UFC g^{-1}), mayor es el contenido de Nitrógeno total (4,45%), de manera que, al disminuir el contenido de Nitrógeno total (0,39%) también disminuye la densidad de bacterias fijadoras de nitrógeno ($2,2 \times 10^3$ UFC g^{-1}).

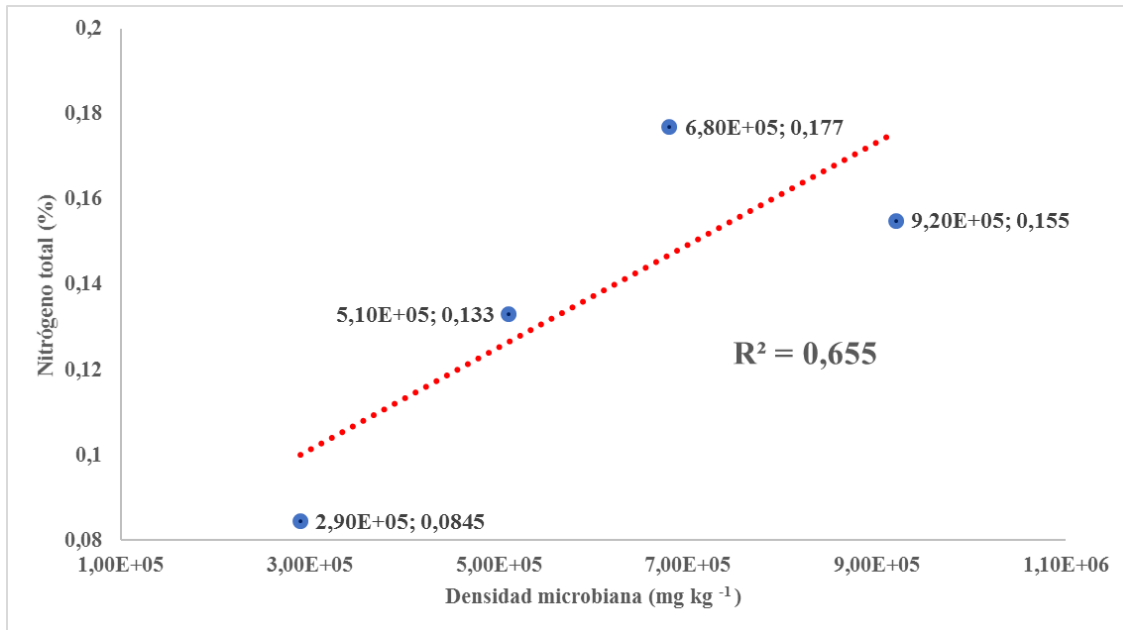


Figura 13. Efecto de la densidad de BLFN sobre el nitrógeno total en los diferentes tratamientos durante el mes 1. Por: González y Mora.

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

9. Conclusiones

En el marco 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)*” se aportó insumos para el desarrollo del primer y segundo objetivo, mediante el análisis de la relación existente de suelos contaminados con diésel y el comportamiento de bacterias libres fijadoras de nitrógeno (BLFN).

Las características físicas y químicas permitieron conocer el estado del suelo en estudio, este presentó textura Franco arcillo arenosa (FArA), baja densidad aparente, pH ácido, bajo contenido de materia orgánica y de nitrógeno total y baja capacidad de intercambio catiónico. En los diferentes tratamientos se evidenciaron alteraciones en algunos de estos parámetros, según la matriz de Pearson la materia orgánica presentó la relación más significativa con el TPH, dado que pasó de nivel bajo en el testigo a nivel alto en la mayor concentración de diésel, incrementando 2 veces aproximadamente.

El diésel afectó positivamente las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en el suelo, ya que, se observa un aumento de los microorganismos encontrados en presencia del contaminante con respecto al suelo sin contaminar, inclusive en la concentración más alta del hidrocarburo los recuentos fueron mayores, por tanto, las BLFN tienen capacidad de adaptación ante condiciones adversas como un derrame de hidrocarburo.

Las cepas RM_D_05, RM_D_09, RM_D_16 y RM_D_22 presentan potencial fijación de nitrógeno al desarrollar crecimiento de la masa bacteriana en el medio selectivo Rennie modificado libre de nitrógeno, lo que indica que poseen actividades metabólicas que permiten hacer uso del nitrógeno atmosférico para suplir esta necesidad. Por lo tanto, se genera una correlación directa entre la densidad microbiana y el nitrógeno total de los diferentes tratamientos del suelo agrícola de piedemonte llanero del municipio de Cumaral-Meta, siendo esta responsable del 65% de la variabilidad de este nutriente.

10. Discusión de Resultados y Recomendaciones

Características físico-químicas. El suelo testigo se caracterizó por poseer un pH fuerte a extremadamente ácido, altos contenidos de Fe y Mn y bajas concentraciones de CIC y Mg, siendo en algunos parámetros similares a lo reportado por Rincón y Ligarreto (s.f), Jamioy (2011) y Venegas (2012). Los parámetros físicos determinaron que este suelo del piedemonte llanero poseía una textura Franco arcillo arenosa, teniendo en cuenta la textura se estableció que presentaban niveles bajos para la densidad aparente ($1,10 \text{ gr/cm}^3$) y la densidad real ($2,28 \text{ gr/cm}^3$) al encontrarse por debajo de los rangos indicados por Ibáñez (2007), Jamioy (2011) y Villegas (2012), mientras, que la porosidad fue de 51,75%, valor superior a los reportados por Jamioy (2011), demostrando la relación inversa entre la densidad aparente y la porosidad. Por otra parte, las características químicas variaron al comparar el testigo con los suelos contaminados, los parámetros que se relacionaron significativamente con los TPH, fueron la MO y el N, aunque este incremento de MO está compuesto por materia petrogénica, posibilitando un riesgo ecotóxico por la presencia de hidrocarburos aromáticos polinucleares presentes en el diésel (Martínez y López, 2001).

Bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos contaminados con hidrocarburos: El potencial de crecimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno en un suelo del piedemonte llanero, contaminado con diésel a concentraciones de 2500 mg kg^{-1} , 6100 mg kg^{-1} y 9800 mg kg^{-1} , posee una variación exponencial positiva, estimulando un aumento en la densidad microbiana para las muestras que recibieron el tratamiento con respecto al control, llegando a presentarse un incremento de hasta 8.26 veces, siendo este el mayor registro durante el periodo de muestreo. Lo que coincide con lo reportado por Vázquez-Luna et al. (2011), que evaluaron el impacto del petróleo crudo en suelo sobre este tipo de bacterias y reportaron incrementos entre 2 a 3,5 veces respecto al testigo, con concentraciones de hasta 40000 mg kg^{-1} . Asimismo, Castro-Mancilla et al. (2013), reportaron poblaciones que fluctúan de $1 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$ del suelo testigo hasta $1 \times 10^8 \text{ UFC g}^{-1}$ en un suelo con diésel más nitrógeno y fósforo. También, Hernández et al. (2004), reportó aumento en las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno en suelos con cultivos de frijol contaminados con queroseno, ya que se encontró una población de $4,1 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$ en el rizoplano con una concentración de 2500 mg kg^{-1} , mientras que en el testigo se reportó $3 \times 10^6 \text{ UFC g}^{-1}$. Sin embargo, Rivera et al. (2002), reportó que las poblaciones de bacterias rizosféricas fijadoras de N

se vieron afectadas por el petróleo acumulado en el suelo, observándose una reducción de hasta 20 veces la población con respecto al mismo suelo sin contaminación. Aunque igualmente, reporta el aumento significativo de 33 veces las poblaciones de bacterias rizosféricas fijadoras degradadoras de petróleo. Este último dato concuerda con los resultados de la investigación, lo que indica que las bacterias aisladas tienen la capacidad de crecimiento y fijación de Nitrógeno cuando hay presencia de diésel, al presentar una tendencia positiva bajo el efecto del contaminante.

Durante el tiempo de muestreo se registraron datos contradictorios al comportamiento principalmente enmarcado, la densidad en las concentraciones 2500 mg kg^{-1} y 9800 mg kg^{-1} para los meses 2 y 3 respectivamente fueron menores a la muestra control, pues los microorganismos resienten el impacto ocasionado por la contaminación, proyectado en la disminución de la densidad microbiana ante el estrés ambiental (Atlas et al., 1991; citado por Rivera et al., 2002). Por lo que como mecanismo de respuesta tienden a cambiar su estructura, desarrollando un potencial genético que les permita utilizar el hidrocarburo como fuente de carbono y energía en sus procesos metabólicos (Rivera et al., 2002).

Los géneros aislados *Kribbella* y *Amycolatopsis* hacen parte de la división *Actinobacteria*, coincidiendo con la investigación de Vanegas (2012) donde informó poblaciones de actinomicetos en suelos de piedemonte llanero, con valores promedio de $5,5 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$ en cultivos de arroz seco y de $5,9 \times 10^5 \text{ UFC g}^{-1}$ en cultivos de arroz inundados. Por su parte Villegas (2012) reportó poblaciones de actinomicetos hasta de $5,9 \times 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$ en suelos de explotación pastoril en el piedemonte llanero.

El crecimiento exponencial de diferentes microorganismos como las cepas aisladas de actinomicetos se da ante las nuevas condiciones generadas por los tratamientos, pues a mayor concentración de diésel, mayor fue el porcentaje de materia orgánica presente en el suelo, factor que figura como importante para la estimulación del crecimiento, al ser un aspecto que controla la densidad de este tipo de microorganismos (González, 2010). La materia orgánica de un suelo contaminado se compone de la materia biogénica y petrogénica, esta última aportada por el diésel, ante la presencia de hidrocarburos aromáticos (Martínez, y López, 2001).

Los actinomicetos poseen la capacidad de desarrollarse bajo ambientes contaminados por este tipo de hidrocarburos, pues degradan alcanos, (hidrocarburos alifáticos) y naftaleno (hidrocarburos aromáticos), presentes en un 64% y 25% del diésel respectivamente (U.S Department of Health And Human Service, 1995). A través de la presencia de genes catabólicos como el catecol 1,2-

dioxigenasa implicada en la ruptura del anillo aromático y por tanto en la biodegradación de compuestos tóxicos como el naftaleno, detectado en géneros de este grupo (Soler, A., 2012), Además (Ribbe et al., 1997 y Gadkari et al., 1992; citado por Ibarra, 2010) del reporte de la capacidad de fijar nitrógeno, ya que cuentan con un complejo enzimático de nitrogenasa alternativo.

Se contribuye así, a aportar información acerca de la diversidad microbiana existente en los suelos del piedemonte llanero, tratándose de microorganismos capaces de crecer y fijar nitrógeno en presencia de diésel, ofreciendo la posibilidad de uso para procesos de biorremediación en la región. Sin embargo, es pertinente para futuras investigaciones realizar pruebas directas tanto de la capacidad de fijación biológica de este nutriente, como de la efectividad en la biodegradación de hidrocarburos e incluso la capacidad de actuar como consorcio microbiano para la degradación de estos.

11. Referencias bibliográficas

- Acuña, A. J., Pucci G. N., & Pucci O. H. (2010). Caracterización de tres cepas bacterianas capaces de fijar nitrógeno y biodegradar hidrocarburos aisladas de un suelo de la Patagonia. *Ecosistemas*, 19 (2), 125-136. Recuperado de <https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/viewFile/392/378>
- Alcaldía de Cumaral. (Sin fecha). Esquema de Ordenamiento Territorial 2000-2009. *Cdim*. Recuperado de <https://goo.gl/N4M3BG>
- Álvarez de León et al. (2007). *Fundamentos biofísicos y socioeconómicos para la formulación de propuestas productivas para la Orinoquia alta colombiana*. Villavicencio, Colombia: Corpoica. Recuperado de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/1155>
- Arcila, A. (19 de noviembre de 2018). ¿Dónde está el petróleo en Colombia? Las 2 orillas. Recuperado de <https://www.las2orillas.co/donde-esta-el-petroleo-en-colombia/>
- Arrieta Ramírez, O., Rivera Rivera, A., Arias Marín, L., Alberto Rojano, B., Ruíz, O., & Cardona Gallo, S. (2012). Biorremediación de un suelo con diésel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente*, 15 (1), 27-40. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/gestion/article/view/30815/39299>
- Bailón, L., González, R. C., & Cervantes, A. (2003). Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias. Recuperado de http://www.academia.edu/4858992/Atlas_de_pruebas_bioquimicas_para_identificar_bacterias
- Banco Mundial. (Sin fecha). Consumo de fertilizantes (kilogramos por hectárea de tierras cultivables), Recuperado de <https://datos.bancomundial.org/indicador/AG.CON.FERT.ZS?view=chart>
- Briceño, G. (2015). Evolución de la integridad estructural de ecosistemas lóticos del piedemonte llanero frente a la intervención antrópica. *Acta Biológica Colombiana*, 20 (2), 133-144. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v20n2.42307>
- Cardona, S. & Sánchez, M. (1998). Bacterias de vida libre fijadoras de N₂ en dos suelos del Valle del Cauca. *Acta Agronómica*. 48 (3), 43-54. Recuperado de https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/viewFile/48011/49219

- Castro-Mancilla, Y., Castro-Meza, B., de la Garza-Requena, F., Rivera-Ortiz, P., Heyer-Rodríguez, L., & Ortiz-Carrizales, Y. (2013). Variación de las poblaciones microbianas del suelo por la adición de hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*, 31 (3), 221-230.
- Cerón, L. E & Aristizábal, F. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14 (1), 285-295. Recuperado de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77624081026>
- Comisión Nacional para el Uso Eficiente de la Energía (CONUEE). (Sin fecha). Derivados del petróleo: El diésel. Recuperado de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/241728/DieseIFT.pdf>
- Córdova-Bautista, Y., Rivera-Cruz, M., Ferrera-Cerrato, R., Obrador-Olán, J., & Córdova-Ávalos, V. (2009). Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Musa AAA Simmonds*) cultivar 'Gran enano' y su potencial para integrar un biofertilizante. *Universidad y Ciencia*, 25 (3), 253-265.
- Covelli, J. M. (2013). Biofertilización con *Bradyrhizobium japonicum* para la agricultura sustentable: aspectos ecofisiológicos del problema de la competencia para la nodulación. (Tesis de posgrado), Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. Recuperado de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/27577/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Cruz, A., Esquivel, R., Delgadillo, J., Sánchez, G., Alarcón, A., & Ferrara, R. (2017). Microorganismos de vida libre y simbióticos: alternativa biotecnológica para restaurar ambientes contaminados. En M. L. Arena & F. X. Chiappa (comp), *Microbiología ambiental en México: Diagnóstico, tendencias en investigación y áreas de oportunidad*. (pp.212-233). Yucatán, México.
- Cubillos, A. M. (2009). Identificación taxonómica de bacterias cultivables asociadas a los ciclos del carbono y nitrógeno en las cuencas de los ríos La vieja y Otún (eje cafetero – Colombia). (Tesis de pregrado), Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/14577/CubillosCardenasAnaMaria2009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Curvelo, Y. E. & Acosta, R. Y. (2006). Estudio de profundización sobre el sistema productivo agropecuario del Departamento del Meta. (Tesis de pregrado), Universidad de los Llanos. Villavicencio, Colombia. Recuperado de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6560/1/098.pdf>
- Departamento Administrativo Nacional de Estadística (DANE), Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) y Sistema de Información de Precios y Abastecimiento del Sector Agropecuario (SIPSA). (2012). Insumos y factores asociados a la producción agropecuaria. Recuperado de: <https://goo.gl/dSnSA6>
- Descubren crudo liviano en el Meta (7 de enero de 2019). Recuperado de <https://www.portafolio.co/economia/descubren-crudo-liviano-en-pozo-del-meta-524975>
- Esquivel, R., Ferrera, R., & Alarcón, A. (2018). El papel de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. En Brutti, L., Beltrán, M., & García, I. (Eds.). *Biorremediación de los Recursos Naturales*. (pp.200-231). Buenos Aires: Ediciones INTA. Recuperado de https://inta.gob.ar/sites/default/files/libro_biorremediacion_de_los_recursos_naturales_1.pdf
- Federación Nacional de Arroceros (Fedearroz). (2017). IV Censo Nacional Arroceros 2016. Recuperado de http://www.fedearroz.com.co/doc_economia/Libro%20Censo%20General.pdf
- Fernandez, A. & Perdomo L. P. (2015). Grupos funcionales de microorganismos (fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfato y celulolíticos) en suelos de agroecosistemas cafeteros (ecológicos y convencionales) en Anolaima, Cundinamarca. (Tesis de pregrado), Universidad Libre. Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/11255/Proyecto%20Final%20Andrea%20Fernandez%20y%20Laura%20Perdomo%20Enero%202015.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Fournier, L. A. (2003). Recursos Naturales. (2 ed.). Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia. Recuperado de <https://bit.ly/2OH1eiP>
- Gaviria, J., Restrepo, G. M., Galeano, N. F., & Hernández, A. (2018). Bacterias diazotróficas con actividad promotora del crecimiento vegetal en *Daucus carota* L. *Ciencia y agricultura*, 15 (1), 19-27. doi: 10.19053/01228420.v15.n1.2018.7753

- Gómez, F. Z. (2015). Emisión de Gases de Efecto Invernadero y Contenidos de Carbono y Nitrógeno del Suelo en un Agroecosistema Ganadero Altoandino en Tenerife, Valle del Cauca. (Tesis de posgrado), Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/47566/7/1114873570.2015.pdf>
- Gómez, M. M. (2008). Efecto de usos de suelo en la ecorregión cafetera sobre la densidad de bacterias nitrificantes y desnitrificantes. (Tesis de posgrado), Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://siete.risaralda.gov.co/biodiversidad/phocadownloadpap/Investigaciones-academicas/EFECTO%20DE%20USOS%20DE%20SUELO%20EN%20LA%20ECORREGION%20CAFETERA%20SOBRE%20LA%20DENSIDAD%20DE%20BACTERIAS%20NITRIFICANTES%20Y%20DESNITRIFICANTES.pdf>
- González, Y. T. (2010). Los actinomicetos: una visión como promotores de crecimiento vegetal. (Tesis de pregrado), Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8665/tesis618.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Hernández, A. E., Ferrera, R., & Rodríguez, R. (2003). Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra Latinoamericana*, 21 (1), 81-89. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/573/57321110.pdf>
- Hernández-Acosta, E., Gutiérrez-Castorena, M., Rubiños-Panta, J., & Alvarado-López, J. (2006). Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*, 24 (4), 463-470.
- Hernández, J. A. (2011). Bio recuperación de suelos salinos con el uso de materiales orgánicos. (Tesis de posgrado), Universidad Politécnica de Madrid. Madrid, España. Recuperado de http://oa.upm.es/14869/1/JACQUELINE_HERNANDEZ_ARAUJO.pdf
- Hernández, A., Rives, N., Acebo, Y., Diaz, A., Heydrich M., & Divan, V. (2014). Potencialidades de las bacterias diazotróficas asociativas en la promoción del crecimiento vegetal y el control de *Pyricularia oryzae* (Sacc.) en el cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Protección Vegetal*, 29 (1), 1-10. Recuperado de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n1/rpv01114.pdf>

- Ibáñez, J. J. (2007). ¿Cuánto Pesa un Metro Cuadrado de la Capa Arable del Suelo?: ¿Qué es la Densidad Aparente? (por Régulo León Arteta). Recuperado de <http://www.madrimasd.org/blogs/universo/2007/05/16/65688>
- Ibarra, C. L. (2010). Diversidad de bacterias fijadoras de nitrógeno aisladas de suelo de Chinampa y su efecto en plantas de interés agrícola. (Tesis de maestría), Instituto Politécnico Nacional. México D.F., México. Recuperado de <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/9203/33.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jamioy, D. D. (2011). Propuesta de indicadores de calidad edafológicos para valorar la influencia de los sistemas productivos sobre algunas propiedades físicas y químicas en suelos oxisoles del piedemonte llanero colombiano. (Tesis de posgrado), Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/7169/1/7009004.2011.pdf>
- Jaramillo, D. F. (2002). Introducción a la ciencia del suelo. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/2242/1/70060838.2002.pdf>
- Lechevalier M.P., Prauser H., Labeda D.P. and Ruan J.S. (1986). Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1986, 36, 29-37.
- Llano 7 días. (1 de diciembre de 2014). Emergencia por derrame de crudo en el Casanare, El tiempo. Recuperado de <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-14917116>
- Mahecha, S. (2011). Comparación de la densidad y actividad bacteriana fijadora libre de nitrógeno entre tres usos de suelo (Cuenca del Otún, Risaralda). (Tesis de pregrado), Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8833/tesis778.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Manahan, S. E. (2006). Introducción a la química ambiental. Recuperado de <https://books.google.com.co/books?id=5NR8DIk1n68C&p=PA321&dq=nitrogeno+en+el+suelo&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwirvo3x1OLgAhXpzVkKHd6yCmAQ6AEIODAD#v=onepage&q=nitrogeno%20en%20el%20suelo&f=true>
- Marín, R. L. (2017). Diagnóstico de la Densidad aparente en relación con otras propiedades físicas del suelo en tres sistemas productivos y bosque nativo, en terrazas altas del piedemonte

- llanero. (Tesis de pregrado), Universidad Nacional Abierta y a Distancia "UNAD". Recuperado de <https://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/14992/1/40384545.pdf>
- Martínez, V. E. & López, F. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de un suelo arcilloso. *Terra Latinoamericana*, 19 (1), 9-17. Recuperado de <https://www.chapingo.mx/terra/contenido/19/1/art9-17.pdf>
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4 (1), 1-20. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/2221548.pdf>
- Méndez, C. (2013). Impacto mediático de los accidentes en carreteras, vinculados con transporte de hidrocarburos. Recuperado de <http://colombia.mmi-e.com/blog/impacto-medi%C3%A1tico-de-accidentes-en-carretera-vinculados-con-transportadores-de-hidrocarburos>
- Moya, L. A. (1997). Potencial de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el cultivo de la caña panelera. Recuperado de https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/20417/80702_23888.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Murillo, J. M. (Sin fecha). Propiedades físicas del suelo y relación con los sistemas de labranza. Recuperado de https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/21343/42503_46556.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Navarro, S. & Navarro, G. (2003). Química agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Recuperado de <https://books.google.com.co/books?id=HufLwjgjtWC&printsec=frontcover&dq=nitrogeno+en+el+suelo&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwirvo3x1OLgAhXpzVkJHd6yCmAQ6AEIMTAC#v=onepage&q=nitrogeno&f=true>
- Núñez, C. (2016). Efecto de la biofertilización con *Azotobacter chroococcum* en el crecimiento y rendimiento de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y pepino (*Cucumis sativus* L.) cultivados en condiciones de invernadero. (Tesis de posgrado), Centro de Investigación en Química Aplicada. Coahuila, México. Recuperado de <https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/103/1/Tesis%20MAP%20Claudia%20del%20Carmen%20Nu%C3%B1ez%20Gomez%20Ene%2005%202017.pdf>

- Pardo, J. L., Perdomo, M. C., & Benavides, J. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2 (2), 40-49. doi:10.22490/24629448.6
- Park Y.H., Yoon J.H., Shin Y.K., Suzuki K.I., Kudo T., Seino A., Kim H.J., Lee J.S. and Lee S.T. (1999) Classification of "*Nocardioides fulvus*" IFO (now NBRC) 14399 and *Nocardioides* sp. ATCC 39419 in *Kribbella* gen. nov., as *Kribbella flavida* sp. nov. and *Kribbella sandramycinis* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1999, 49, 743-752.
- Pellegrini, A. E. (2017). Nitrógeno del suelo. Recuperado de http://aula.virtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/35406/mod_resource/content/1/TEMA%2012%20-%20NITROGENO.pdf
- Pulido, S. X., Venegas, E., Jaime, W.E., Gómez, P. J., & Ostos, M. E. (1999). Caracterización de los sistemas de producción agropecuarios en los municipios de Granada y Cumaral – Meta. Recuperado de <https://bit.ly/2FOgWV8>
- Rincón, A. (2007). Asociación maíz-pastos para el establecimiento y renovación de praderas en los llanos orientales de Colombia. Villavicencio, Colombia: Corpoica. Recuperado de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/12680>
- Rincón, A., Bueno, G. A., Álvarez de León, M., Pardo, O., Pérez, O. & Caicedo, S. (2010). Establecimiento, manejo y utilización de recursos forrajeros en sistemas ganaderos de suelos ácidos. Villavicencio, Colombia: Corpoica. Recuperado de <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/12703>
- Rincón, A. & Ligarreto, G. (Sin fecha). Efecto del nitrógeno en la rehabilitación de pasturas de *Brachiaria decumbens* utilizando la asociación con maíz en el Piedemonte de los Llanos Orientales de Colombia. Recuperado de <https://docplayer.es/74187522-Efecto-de-l-nitrogeno-en-la-rehabilitacion-de-pasturas-de-brachiaria-decumbens.html>
- Rincón, A. & Ligarreto, G. (2008). Productividad de la asociación maíz-pastos en suelos ácidos del Piedemonte Llanero colombiano. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 9 (1), 73-80.
- Rincón, A. & Ligarreto, G. (2010). Relación entre el nitrógeno foliar y el contenido de clorofila, en maíz asociado con pastos del Piedemonte Llanero colombiano. *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 11 (2), 122-128. doi: https://doi.org/10.21930/rcta.vol11_num2_art:202
- Rodríguez, C.L. (2014). Enriquecimiento de microorganismos fijadores de nitrógeno de vida libre provenientes de sistemas de tratamiento de aguas residuales domésticas. (Tesis de

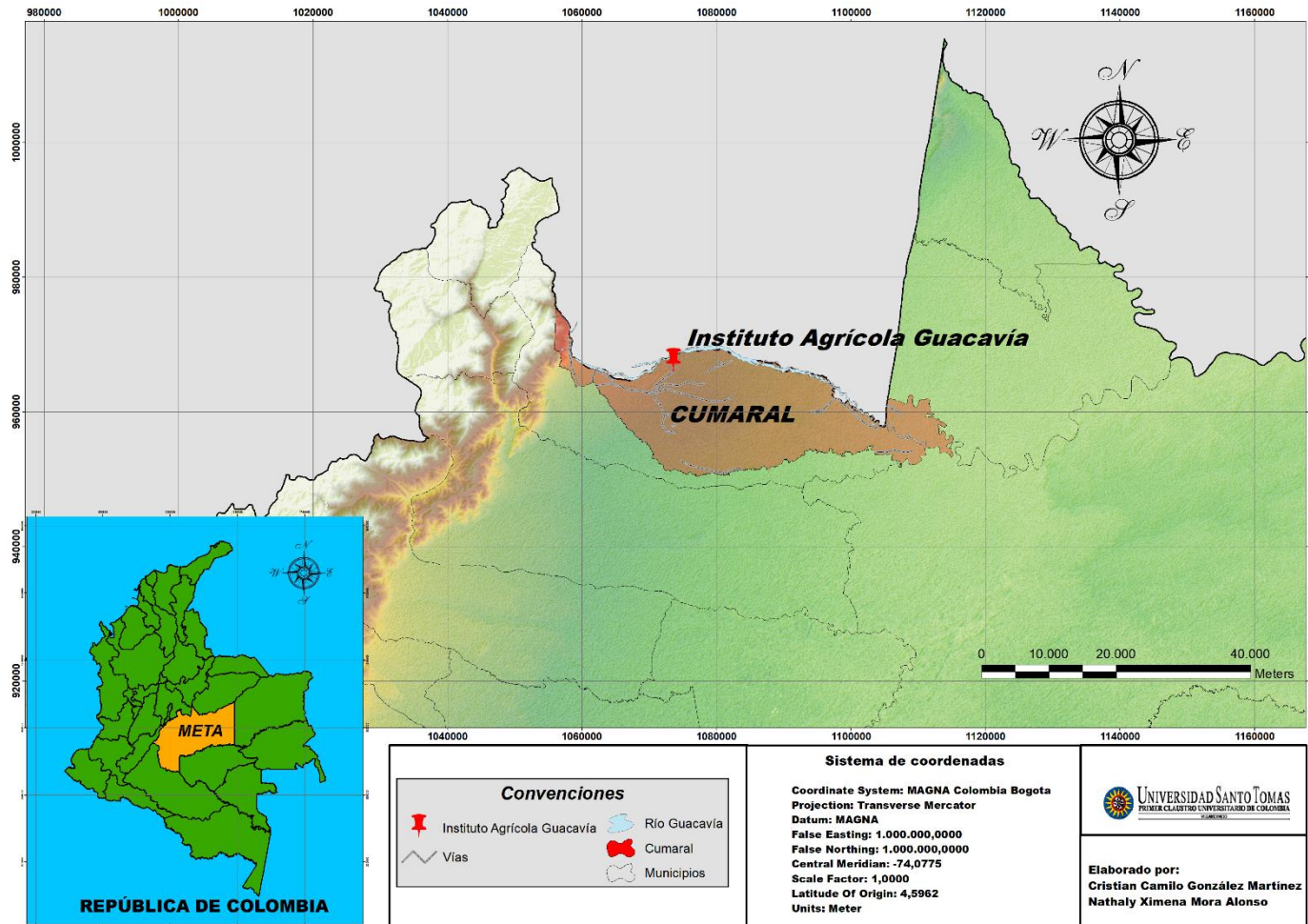
- pregrado), Universidad del Valle. Santiago de Cali, Colombia. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/317588694_ENRIQUECIMIENTO_DE_MICROORGANISMOS_FIJADORES_DE_NITROGENO_DE_VIDA_LIBRE_PROVENIENTES_DE_SISTEMAS_DE_TRATAMIENTO_DE_AGUAS_RESIDUALES_DOMESTICAS
- Rodríguez, L. S. (2017). Impacto geotécnico de los derrames de diésel en suelos finos. (Tesis de posgrado), Escuela Colombia de Ingeniería Julio Garavito. Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repositorio.escuelaing.edu.co/bitstream/001/546/1/Rodr%C3%ADguez%20Cuervo%2c%20Lady%20Sof%C3%ADa%20-%202017.pdf>
- Rojas, D. (2008). Estandarización de un medio de cultivo complejo para la multiplicación de la cepa C50 de *Rhizobium sp.* (Tesis de pregrado), Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Recuperado de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8216/tesis212.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Salazar, A. M. & Ordóñez, C. A. (2013). Aislamiento e identificación de actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. (Tesis de pregrado), Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia. Recuperado de <http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/tesisd/texto/anexos/58073S161.pdf>
- Serrano, M., Torrado, L. & Pérez, D. (2013). Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *General José María Córdova*, 11 (12), 233-244.
- Soler, A. (2012). Biodiversidad de actinomicetos aislados de plantas depuradoras de aguas residuales. Estudio de la capacidad de biodegradación de compuestos tóxicos. (Tesis doctoral). Universitat Politècnica de València. Valencia, España. Recuperado de <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/14982/tesisUPV3760.pdf?sequence...>
- Tantillo, A. (2018). Exploring greener approaches to nitrogen fixation. Available in <https://phys.org/news/2018-06-exploring-greener-approaches-nitrogen-fixation.html>
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2007). Introducción a la Microbiología. (9 ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Unidad de Planeación Minero Energética (UPME). (2013). Cadena del petróleo. Recuperado de http://www.upme.gov.co/Docs/CadenadeIPetroleo_sp.pdf

- Universidad Nacional Autónoma de México. (2014). Protocolos de prácticas de microbiología experimental. Recuperado de file:///D:/Copia%20Dic2017/UNIVERSIDAD/Documentos/TESIS/Protocolos2014_1_24195.pdf
- U.S Department of Health and Human Service. (1995). Toxicological profile for fuel oils. Recuperado de <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp75.pdf>
- Vanegas, J. (2012). Desarrollo de consorcios de diazótrofos con actividad promotora de crecimiento en plantas de arroz inundado y seco en los departamentos del Tolima y Meta. (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/8917/1/Javiervanegasguerrero.2012.pdf>
- Velásquez, J. A. (2017). Contaminación de suelos y aguas por hidrocarburos en Colombia. Análisis de la fitorremediación como estrategia biotecnológica de recuperación. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8 (1), 151-167. Recuperado de <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1846/2065>
- Vázquez-Luna, M., Montiel-Flores, A., Vázquez-Luna, D., & Herrera-Tenorio, M. (2011). Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13 (3), 511-523.
- Velandia, K. V. (2016). Aislamiento y caracterización de bacterias diazotróficas en cultivos de caña panelera de las regiones del occidente de Cundinamarca y la hoya del Río Suarez. (Tesis de posgrado), Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://bdigital.unal.edu.co/57092/7/karenavanesavelandiaprieto.2016.pdf>
- Villegas, Z. (2012). Caracterización de algunas propiedades del suelo como indicadores de sostenibilidad en sistemas de explotación ganadera en zona del Piedemonte llanero. (Tesis de pregrado). Universidad de los llanos. Colombia. Recuperado de <http://repositorio.unillanos.edu.co/bitstream/001/261/1/RUNILLANOS-AGR%200662%20EJ.1%20Caracterizacion%20de%20algunas%20propiedades%20del%20suelo%20como%20indicadores%20de%20sostenibilidad%20-Villegas%20Parra%20Zulma%20Milena.pdf>
- Viloria, J. (2009). Geografía económica de la Orinoquia. Recuperado de <http://www.banrep.gov.co/sites/default/files/publicaciones/archivos/DTSER-113.pdf>

Volcamiento por la vía a Cumaral. (18 de junio de 2015). Extra. Recuperado de <http://llano.extra.com.co/noticias/judicial/volcamiento-por-la-cumaral-143564>

12. Apéndices

Apéndice A. Ubicación geográfica del Instituto Agrícola de Guacavía.



Apéndice B. Matriz de correlaciones de Pearson de las propiedades químicas.

Variables	pH	CE	MO	N	P	S	Ac. I.	Al	Ca	Mg	K	Na	CICE	Fe	Mn	Zn	Cu	B	TPH
pH	1																		
CE	0,855	1																	
MO	-0,754	-0,968*	1																
N	-0,754	-0,968*	1,000**	1															
P	0,916	0,970*	-0,878	-0,878	1														
S	0,859	0,993**	-0,935	-0,935	0,987*	1													
Ac. I.	-0,873	-0,999**	0,969*	0,969*	-0,968*	-0,988*	1												
Al	-0,094	-0,189	0,001	0,001	-0,335	-0,297	0,146	1											
Ca	0,712	0,971*	-0,987*	-0,987*	0,892	0,953*	-0,964*	-0,148	1										
Mg	0,727	0,886	-0,771	-0,771	0,931	0,931	-0,864	-0,623	0,843	1									
K	0,873	0,970*	-0,880	-0,880	0,995**	0,991**	-0,963*	-0,395	0,907	0,959*	1								
Na	0,786	0,964*	-0,891	-0,891	0,968*	0,985*	-0,950	-0,440	0,936	0,976*	0,987*	1							
CICE	0,728	0,977*	-0,967*	-0,967*	0,921	0,972*	-0,966*	-0,254	0,994**	0,898	0,940	0,968*	1						
Fe	0,936	0,955*	-0,930	-0,930	0,931	0,931	-0,969*	0,032	0,887	0,746	0,903	0,856	0,876	1					
Mn	-0,568	-0,907	0,962*	0,962*	-0,790	-0,878	0,896	0,097	-0,981*	-0,767	-0,816	-0,870	-0,964*	-0,797	1				
Zn	0,992**	0,793	-0,696	-0,696	0,857	0,791	-0,818	-0,002	0,637	0,634	0,804	0,702	0,646	0,911	-0,486	1			
Cu	0,857	0,898	-0,928	-0,928	0,827	0,848	-0,919	0,247	0,860	0,598	0,793	0,749	0,823	0,973*	-0,798	0,845	1		
B	-0,355	-0,424	0,599	0,599	-0,247	-0,317	0,458	-0,800	-0,475	0,041	-0,203	-0,178	-0,377	-0,571	0,507	-0,392	-0,745	1	
TPH	-0,775	-0,979*	0,999**	0,999**	-0,899	-0,950*	0,979*	0,037	-0,989*	-0,797	-0,901	-0,909	-0,974*	-0,938	0,957*	-0,716	-0,926	0,568	1

Nota: CE=Conductividad eléctrica, MO=Materia orgánica, N=Nitrógeno, P=Fósforo, S=Azufre, Ac. I=Acidez intercambiable, Al=Aluminio, Ca=Calcio, Mg=Magnesio, K=Potasio, Na=Sodio, CICE=Capacidad de intercambio catiónico, Fe=Hierro, Mn=Manganeso, Zn=Zinc, Cu=Cobre, B=Boro, TPH=Hidrocarburos totales. **La correlación es significativa al nivel de 0,01. *La correlación es significativa al nivel 0,05.

Apéndice C. Prueba estadística Tukey para diferencias significativas entre tratamientos.

ANOVA: Single Factor

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

Anova

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

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

9800 mg kg ⁻¹	1,1E+06	3	3,4427E+11
		12	3,5988E+12
		8	4,529

Q TEST

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

Apéndice D. Coeficiente de correlación de Pearson para nitrógeno total y densidad microbiana - mes 1.

Datos densidad y nitrógeno reportados durante el mes 1 en los diferentes tratamientos

Concentración	N2	Densidad
0mg/kg	0,0845	2,90E+05
2500 mg/kg	0,133	5,10E+05
6100 mg/kg	0,155	9,20E+05
9800 mg/kg	0,177	6,80E+05

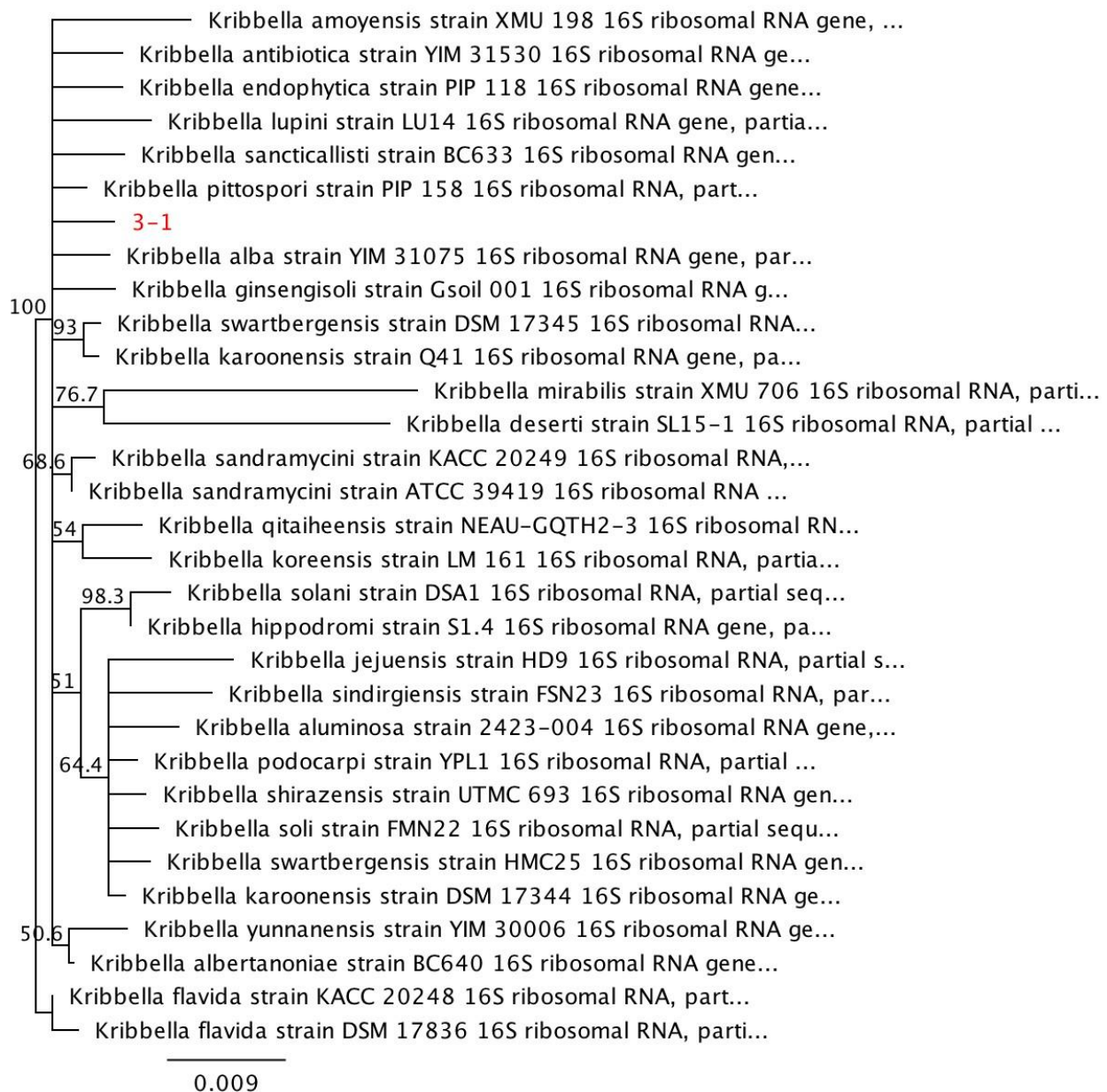
Coeficiente de correlación de Pearson entre variables

	Densidad	N2
Densidad	1	
N2	0,80931155	1

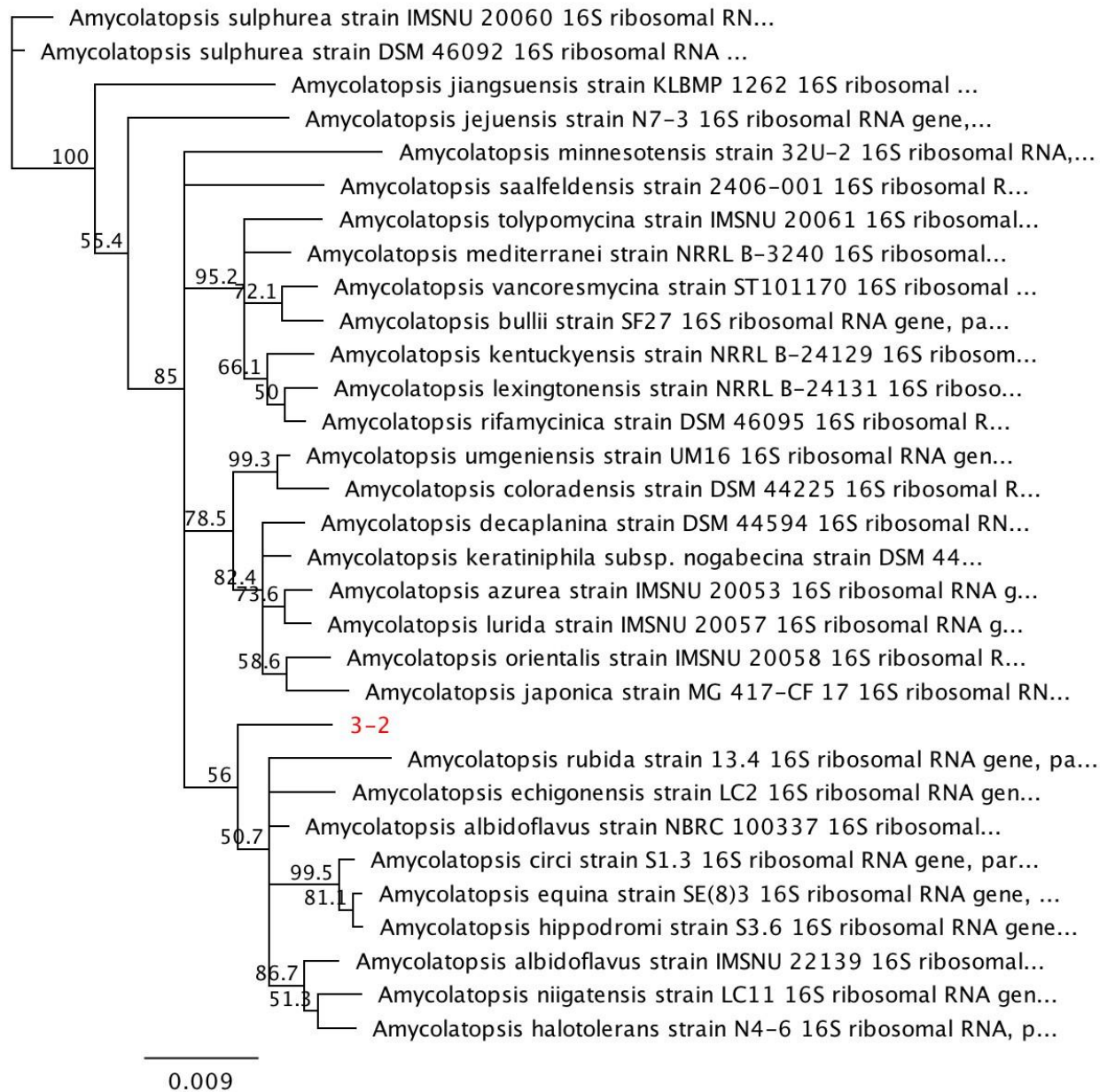
Prueba t para medias de dos muestras emparejadas

	Densidad	N2
Media	600000	0,137375
Varianza	7,1E+10	0,00156523
Observaciones	4	4
Coeficiente de correlación de Pearson	0,80931155	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	3	
Estadístico t	4,50351926	
P(T<=t) una cola	0,0102237	
Valor crítico de t (una cola)	2,35336343	
P(T<=t) dos colas	0,0204474	
Valor crítico de t (dos colas)	3,18244631	

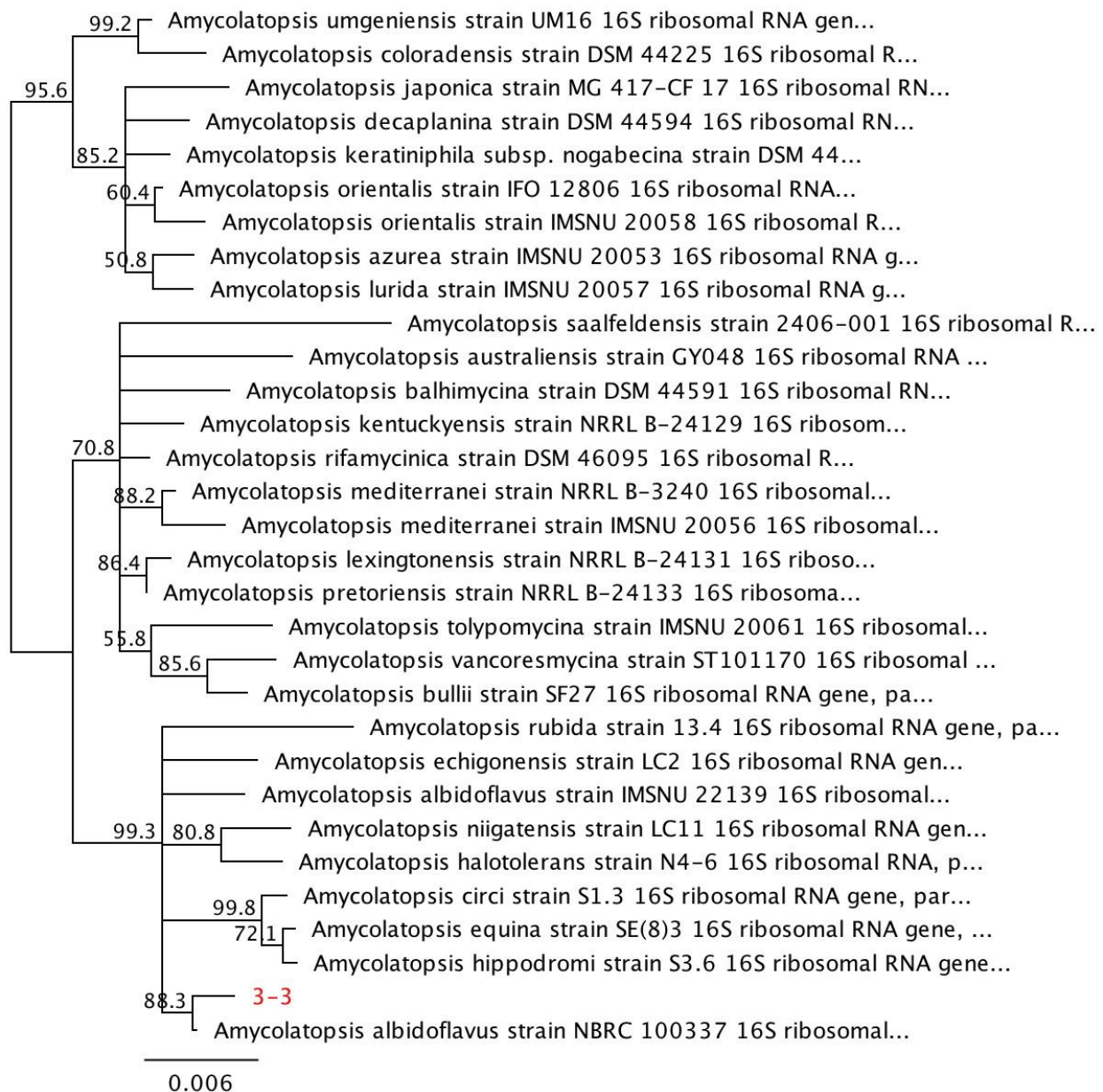
Apéndice E. Árbol filogenético aislamiento RM_D_05.



Apéndice F. Árbol filogenético aislamiento RM_D_09.



Apéndice G. Árbol filogenético aislamiento RM_D_16.



Apéndice H. Árbol filogenético aislamiento RM_D_22.

