

**DETERMINACION DE BACTERIAS CON POTENCIAL DEGRADADOR DE
GASOLINA AISLADAS A PARTIR DE SUELOS CONTAMINADOS EN
VILLANUEVA – GUAJIRA.**



AUTORES:

GUERRA RIVERA ALEJANDRA MARCELA

PUERTA AMAYA ANA ISABEL

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
DEPARTAMENTO DE INGENIERIAS Y TECNOLOGIAS
INGENIERIA MABIENTAL Y SANITARIA
VALLEDUPAR – CESAR**

2019

**DETERMINACION DE BACTERIAS CON POTENCIAL DEGRADADOR DE
GASOLINA AISLADAS A PARTIR DE SUELOS CONTAMINADOS EN
VILLANUEVA – GUAJIRA.**

Tesis de grado para optar el título de Ingeniero Ambiental y Sanitario

DIRECTOR:

ALEX ABIB TROYA TOLOZA

ASESORA:

ASLENIS EMIDIA MELO RIOS

**UNIVERSIDAD POPULAR DEL CESAR
DEPARTAMENTO DE INGENIERIAS Y TECNOLOGIAS
INGENIERIA MABIENTAL Y SANITARIA
VALLEDUPAR – CESAR**

2019

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	9
1. INTRODUCCION	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
2.1 FORMULACION DEL PROBLEMA	4
3. JUSTIFICACION	5
4. OBEJTIVOS	6
4.1 OBEJTIVO GENERAL	6
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	6
5. MARCO REFERENCIAL	7
5.1. ANTECEDENTES	7
5.2. MARCO TEORICO	9
5.3. MARCO CONCEPTUAL	18
5.4. MARCO CONTEXTUAL	20
5.4.1. Municipio de Villanueva guajira	20
5.4.2. Factores abióticos	20
5.4.3. Factores bioticos	20
5.5. MARCO LEGAL	22
6. MARCO METODOLOGICO	25
6.1. TIPO DE INVESTIGACION.	25
6.2. LÍNEA INVESTIGACIÓN	25
6.3 SUBLINEA	25
6.4 POBLACIÓN	25
6.5 MUESTRA	26
6.6. DESARROLLO METODOLÓGICO	26
6.6.1. Obtención de la información técnica e instrumentos de recolección de la información.	26
6.6.2. Etapa 1. Toma de muestra de suelo por el método de cuarteo y zigzag 26	

6.6.3. Etapa 2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del suelo	29
6.6.4. Etapa 3. Caracterización de bacterias en el suelo contaminado de Villanueva – guajira a escala laboratorio.....	32
6.6.5. Etapa 4. Rendimiento de microorganismos tolerantes a la gasolina	36
7. RESULTADOS Y ANALISIS	40
7.1. TOMA DE MUESTRA DE SUELO POR EL MÉTODO DE CUARTEO Y ZIGZAG.....	40
7.1.1. Aislamiento y conteo de bacterias degradadoras de gasolina por la técnica de dilución en placa.	40
7.1.2. Desarrollo De Las Diluciones	41
7.1.3. Aislamiento y purificación	45
7.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL SUELO	45
7.3. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS EN EL SUELO CONTAMINADO DE VILLANUEVA – GUAJIRA A ESCALA LABORATORIO.....	47
7.3.1. Caracterización microscópica y macroscópica del crecimiento de las cepas puras cultivadas	47
7.3.2 Tinción de Gram.....	48
7.3.3. Caracterización bioquímica de las bacterias	49
7.4. RENDIMIENTOS DE LAS BACTERIAS EN EL SUELO CONTAMINADO	53
7.4.1. Respirometria	53
7.4.2. Cinética de crecimiento	54
8. CONCLUSIONES	57
9. RECOMENDACIONES.....	59
10. BIBLIOGRAFIA.....	60
11. ANEXOS.....	63

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros a determinar en el suelo.....	29
Tabla 2. Resultado de cálculos de UFC	44
Tabla 3. Resultado de análisis fisicoquímicos	45
Tabla 4. Características macroscópicas de la colonia.....	48
Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas	51
Tabla 6. Resultado de identificación de género de la bacteria degradadora de gasolina	51
Tabla 7. Resultado de la titulación.....	53
Tabla 8. CO ₂ liberado en cada uno de los tratamientos.....	53
Tabla 9. Absorbancia obtenida en los tubos.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del municipio de Villanueva en el departamento de la Guajira	21
Figura 2. Mapa del municipio de Villanueva-Guajira	25
Figura 3. Técnica de dilución	28
Figura 4. Características macroscópicas	33
Figura 5. Identificación de cocos Gram positivo.....	34
Figura 6. Interpretación de resultados de Hemolisis	35
Figura 7. Montaje de los microcosmos.....	37
Figura 8. Preparación del medio mineral	40
Figura 9. Desarrollo de diluciones.....	41
Figura 10. Bacterias degradadoras de gasolina por dilución en placa incubadas a temperatura ambiente por tres días.	43
Figura 11. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en la caja 10 – 344	
Figura 12. Vistas macro y microscópicas de la cepa.	47
Figura 13. Tinción de Gram.....	48
Figura 14. Prueba de TSI.....	49
Figura 15. Resultado de la prueba de catalasa.....	49
Figura 16. Resultado de la prueba de Hemolisis.....	50
Figura 17. Resultado de la prueba de Bilis esculina	50
Figura 18. Resultado de la prueba de crecimiento en NaCl al 6.5%	51

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A. Trabajos realizados para la investigación	63
ANEXO B. Resultados de las pruebas físicas del suelo.....	65
ANEXO C. Resultados de las pruebas químicas del suelo.....	66
ANEXO D. Tablas de interpretación de análisis de suelo.....	67
ANEXO E. Montaje de respirometría	69
ANEXO F. Espectrofotómetro genesys 20	69

LISTA DE GRAFICAS

Grafica 1. Curva de crecimiento de <i>Enterococcus</i> spp	55
---	----

RESUMEN

Villanueva es un municipio ubicado en el sur del departamento de la Guajira, la mayor parte de la población la encontramos concentrada en la zona urbana, pero su actividad económica desde tiempos atrás ha estado centrada en la agricultura y la ganadería. Actualmente este municipio se enfrenta a una gran problemática, debido a que parte de la economía de este municipio ha sido la venta ilegal de gasolina la cual es traída de Maicao – Guajira. Existen muchos puntos de venta de este hidrocarburo, el cual al momento de ser vendida y manipulada no existen las medidas ambientales necesarias. Este hidrocarburo la mayoría de veces es derramado de manera accidental o no en el subsuelo. Esto trajo consigo la pérdida de estructura y textura del componente suelo, además de pérdida de propiedades químicas como pH, salinidad y aumento de la degradación del suelo. Debido a esta problemática nació la idea de determinar bacterias con potencial de degradar gasolinas aisladas a partir de suelos contaminados en Villanueva – Guajira con el fin de mejorar las propiedades tanto físicas como químicas del componente suelo.

Palabras Claves: Bacterias, Degradación, Determinación, Gasolina, Textura.

ABSTRACT

Villanueva is a municipality located in the south of the department of La Guajira, most of the population is concentrated in the urban area, but its economic activity since time ago has been focused on agriculture and livestock. Currently this municipality faces a big problem, because part of the economy of this municipality has been the illegal sale of gasoline which is brought from Maicao - Guajira. There are many points of sale of this hydrocarbon, which at the moment of being sold and manipulated there are no environmental measures necessary. This hydrocarbon is most often spilled accidentally or not in the subsoil. This brought with it the loss of structure and texture of the soil component, as well as the loss of chemical properties such as pH, salinity and increased soil degradation. Due to this problem was born the idea of determining bacteria with the potential to degrade gasolines isolated from contaminated soils in Villanueva - Guajira in order to improve the physical and chemical properties of the soil component.

Keywords: Bacteria, Degradation, Determination, Gasoline, Texture.

1. INTRODUCCION

Los hidrocarburos, en este caso la gasolina afectan de manera constante y directa a los suelos como resultado de las actividades humanas durante el uso y transporte del mismo. Gracias a los microorganismos que se encuentran en el suelo, estos ayudan a la degradación del hidrocarburo con el fin de mejorar las condiciones del suelo.

La actividad bioquímica de los microorganismos nativos del suelo es fundamental no sólo en la ausencia o permanencia de compuestos químicos orgánicos contaminantes, sino en la biodegradación de toda la materia orgánica que llega al suelo. De ahí que también es posible que algunos microorganismos puedan adaptarse y tengan la capacidad de metabolizar los hidrocarburos a través de su maquinaria enzimática. La diversidad de los microorganismos asegura la multiplicidad de funciones atribuidas en el suelo, así como la permanencia de estas tareas bajo condiciones de estrés o disturbación (Solís y López, 2003).

En el departamento de la Guajira, exactamente en el municipio de Villanueva se ha venido presentando el derrame del hidrocarburo debido a las malas prácticas de la venta y uso del mismo, causando así un deterioro del componente suelo, la idea principal del proyecto es poder identificar y evaluar cepas bacterianas que tengan la mayor capacidad de degradar la gasolina con el fin de utilizarlas en estudios posteriores de biorremediación.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los problemas de contaminación en el ámbito local, nacional e internacional son parte de nuestra vida cotidiana; es preocupante la manera en cómo se han ido degradando los ecosistemas de nuestro planeta, y la capa superficial de la corteza terrestre no es la excepción (Martínez et al., 2011).

El contrabando de combustible se da inicialmente en la frontera colombo – venezolana, en razón a que la Gasolina es adquirida en Venezuela debido a su bajo costo, de este modo cientos de carro tanques cargados de gasolina provenientes de Venezuela ingresan a diario a Colombia por más de 246 trochas distribuidas a lo largo del territorio fronterizo entre los Estados Zulia (Venezuela), La Guajira y el Cesar (Colombia), Norte de Santander y el estado Táchira, así como en los cruces de los ríos Arauca y Apure, Vichada y el Orinoco, que representan alrededor de 1.400 millones de dólares anuales de pérdidas por el contrabando de ese combustible en el país vecino (Flórez, 2015). Así funciona el contrabando de gasolina venezolana en la frontera. Las 2 orillas. Disponible en <http://www.las2orillas.co/asi-funciona-el-contrabando-de-gasolina-venezolana-en-la-frontera/>.

La guajira no es ajena a este problema ya que en el municipio de Villanueva se comercializa este hidrocarburo de manera ilegal, las causas por las cuales se presenta este problema es la translación inadecuada de este hidrocarburo trayendo como consecuencia la reducción o inhibición del desarrollo de la cobertura vegetal del lugar donde ocurre el derrame, cambios en la dinámica poblacional de la fauna y la biota microbiana y contaminación por infiltración de cuerpos de agua subterráneos (Benavides et al., 2004).

Teniendo en cuenta que gran parte de la contaminación del suelo es a causa de la comercialización y almacenamiento de gasolina producto del contrabando, nace la necesidad de que se desarrolle un proceso de descontaminación.

Actualmente existen muchas alternativas que podrían reparar naturalmente el suelo contaminado, sin embargo, por su bajo costo y el gran potencial que tienen las bacterias para degradar y soportar altas concentraciones de este hidrocarburo, teniendo unos excelentes resultados al momento de emplearlas.

2.1 FORMULACION DEL PROBLEMA

De lo anterior surge el siguiente interrogante ¿Será que es posible identificar bacterias con potencial degradadora de Gasolina?

Otros interrogantes que subyacen de la problemática anterior descrita son los siguientes:

¿Si no tomamos medidas drásticas a este problema ambiental que se está presentando a diario, que pasara con los microorganismos en el suelo?

¿Podemos mitigar todos esos impactos negativos que se han venido efectuando al ambiente?

¿Cómo lo podemos hacer?

¿Será este método el adecuado, o se aumentará el problema?

3. JUSTIFICACION

En Villanueva Guajira se encuentran contaminados los suelos con Gasolina, debido al manejo inadecuado de la venta ilegal de este hidrocarburo, con base a lo anterior se hace necesario implementar medidas que ayuden a recuperar la capa vegetal porque de lo contrario con el tiempo esta superficie quedara infértil y no brindara ninguna utilidad productiva a la sociedad.

Por consiguiente este proyecto tiene como finalidad determinar bacterias con potencial degradador de Gasolina, en los suelos del municipio de Villanueva guajira con el principal objetivo de mejorar y obtener unas condiciones ideales de estos terrenos para permitir su uso futuro.

Estas condiciones ideales hacen referencia a las propiedades físico-químicas y microbiológicas que deberán tener estos suelos después de haber realizado esta práctica, como lo son: capacidad de retención de agua, densidad adecuada, porosidad, nutrientes, pH, alcalinidad fertilidad, humedad y materia orgánica.

Esta investigación es pertinente hacerla porque como dicho anteriormente mejorara las condiciones del suelo, en donde la flora crecerá y la fauna tendrá nuevos habitat para reproducirse, además generara una mayor productividad económica.

Es importante resaltar que los microorganismos utilizados para recuperar estos suelos, no solo degradan hidrocarburos también cumplen funciones notables como es secretar bioemulsificantes y biosurfactantes que facilitan el acceso hacia el hidrocarburo, también están implicadas en el ciclo biogeoquímico del carbono, así mismo en las transformación y mineralización de materia orgánica.

Por último es considerable decir que esta actividad posee un bajo costo y unos resultados excelentes lo cual beneficiara a la sociedad y así mismo el suelo quedara en óptimas condiciones, menos contaminados y más productivos.

4. OBEJTIVOS

4.1 OBEJTIVO GENERAL

- Determinar bacterias con potencial degradadoras de gasolina aisladas a partir de suelos contaminados en Villanueva – guajira.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Aislar bacterias con potencial de degradar gasolina en suelos contaminados de Villanueva – Guajira.
- Determinar las características fisicoquímicas en suelos contaminado de Villanueva-Guajira.
- caracterizar bacterias a través de pruebas bioquímicas en el suelo contaminado de Villanueva – Guajira a escala laboratorio.
- Plantear los rendimientos de las bacterias en el suelo contaminado para utilizarlas en el futuro.

5. MARCO REFERENCIAL

5.1. ANTECEDENTES

El objetivo de este trabajo fue caracterizar una muestra de suelo proveniente de un sistema de biorremediación en actividad y determinar la capacidad de la comunidad bacteriana de biodegradar petróleo y sus destilados, e identificar los principales microorganismos involucrados en el proceso. (Acuña et al., 2010)

Esta investigación nos sirve para nuestro proyecto, para saber que si podemos determinar bacterias con capacidad para degradar el petróleo y sus destilados.

Revisaron los procesos de Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia, como una alternativa sostenible frente al deterioro progresivo de la calidad del medio ambiente por el derrame de hidrocarburos. En la legislación Ambiental en Colombia y en el mundo, todo residuo contaminado con hidrocarburos es Considerado un residuo peligroso; por lo tanto, no puede ser dispuesto en suelo, aguas o incinerado a cielo abierto, lo que ha motivado a empresas del país en el mundo a implementar procesos de tratamiento de lodos contaminados. (Caldwell et al., 2009).

Este estudio tiene relación con nuestro proyecto ya que nos verifica que la biorremediación si es una técnica de alternativa sostenible frente al deterioro del medio debido a los derrames de hidrocarburos.

Se realizó la biorremediación de un suelo contaminado con la mezcla de combustibles gasolina-diésel a escala de laboratorio, para evaluar la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación. La reducción en la concentración de los Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) en un periodo de tres meses fue del 52.79 % para el tratamiento por atenuación natural, 60.45 % para

El tratamiento por bioestimulación y del 64.92 % para el tratamiento por bioaumentación. Para la inoculación del tratamiento por bioaumentación se aisló una bacteria con capacidad para degradar hidrocarburos, la cual fue identificada como *Bacillus* sp. (Gómez, 2009).

Esta investigación nos ofrece gran ayuda a nuestro proyecto, nos permite conocer una de las bacterias que más degradan este hidrocarburo como lo es *Bacillus* sp, además nos posibilita una forma de aumentar las bacterias como lo es la bioaumentación.

A partir de sedimentos del Caribe colombiano se realizaron 31 aislamientos bacterianos en medio mínimo de sales suplementado con hidrocarburos (ACPM o petróleo crudo) como única fuente de carbono. Las cepas aisladas se sometieron a pruebas de selección en diferentes concentraciones de hidrocarburos y se escogieron once de ellas tolerantes al crudo y ACPM en un ámbito del 1-8% v/v. Posteriormente, con las cepas seleccionadas, se conformó un cultivo bacteriano mixto y se evaluó su capacidad de degradar hidrocarburos en un ensayo a escala de laboratorio, con una concentración del 2% v/v de ACPM en un periodo de 21 días. (Gómez et al., 2008).

Esta investigación no ayuda a realizar nuestra metodología al momento de determinar aislar las bacterias necesarias que tengan como fuente de carbono hidrocarburos.

Utilizaron el método de respirometría para monitorear el consumo de O₂ y la producción de CO₂ con el fin de determinar las actividades metabólicas de los microorganismos del suelo y el impacto del TNT (contaminante) sobre este. (Cárdenas, 2012).

Esta investigación nos ayuda a realizar nuestra metodología al momento de llevar acabo la evaluación del microorganismo identificado en el laboratorio.

5.2. MARCO TEORICO

El suelo es un componente esencial del ambiente en el que se desarrolla la vida; es vulnerable, de difícil y larga recuperación (tarda desde miles a cientos de miles de años en formarse), y de extensión limitada, por lo que se considera un recurso natural no renovable.

Este recurso se utiliza para fines muy diversos: agricultura, ganadería, pastos y montes, extracción de minerales y de materiales para la construcción, soporte para las edificaciones, eliminación de residuos y actividades de ocio y recreo, entre otros. En este sentido, puede decirse que el suelo provee importantes funciones ambientales, dentro de los cuales se destaca ser el sustento de alimento para las plantas, almacenar nutrientes, poseer y albergar materia orgánica proveniente de restos animales y vegetales, ser el hábitat de diversos organismos que transforman la materia orgánica presente en él, entre otros factores que lo hacen ser esencial en el desarrollo de los ecosistemas de los cuales forma parte. De acuerdo con (Dorronsoro, 2007).

Expresa que “el suelo es una parte fundamental de los ecosistemas terrestres debido a que contiene agua y elementos nutritivos que los seres vivos utilizan, y en él se apoyan y nutren las plantas y otros organismos”, razón por la cual el suelo es considerado un recurso natural vital para el sustento de las actividades del ser humano, por lo que debe ser estudiado y analizado con el fin de encontrar la mejor manera de conservarlo a través del tiempo. Para lograr tal fin es necesario conocer cómo es su proceso de formación, cuáles son sus componentes y cómo es su dinámica en general. (Echarri, 1998)

El suelo es un componente muy específico de la biosfera debido a que actúa como amortiguador natural, controlando el transporte de elementos y sustancias químicas a la atmósfera, la hidrosfera y la biota. Por tanto, se dice que el mantenimiento de las funciones ecológicas del suelo es responsabilidad de la humanidad (kabataspendías y pendías, 1992).

"el suelo es un sistema estructurado, heterogéneo y discontinuo, fundamental e irremplazable, desarrollado a partir de una mezcla de materia orgánica, minerales y nutrientes capaces de sostener el crecimiento de los organismos y los microorganismos". (Nannipieri *et al.* 2003).

Los suelos tienen su origen en los macizos rocosos preexistentes que constituyen la roca madre, sometida a la acción ambiental disgregadora de la erosión en sus tres facetas:

— Física, debida a cambios térmicos (lo que origina dilataciones diferenciales entre los diferentes minerales y da lugar a acciones y fisuras internas) y a la acción del agua (arrastres de fragmentos ya erosionados; posible acción directa por congelación, que produce tensiones internas por el aumento de volumen del hielo respecto al agua; acción alternante de humedad-sequedad a lo largo del tiempo, etc.).

Química, originada por fenómenos de hidratación (por ejemplo, paso de anhidrita o sulfato hemihidratado a yeso o sulfato dihidratado), disolución (de sales, como los sulfatos en el agua), oxidación (de minerales de hierro por efecto ambiental), cementación (por agua conteniendo carbonatos previamente disueltos a partir de otra roca), etc.

Biológica, producida por actividad bacteriana, induciendo putrefacciones de materiales orgánicos y mezclando el producto con otras partículas de origen fisicoquímico, actuando de elemento catalizador, etc.

Aquí podremos encontrar las características del suelo:

Los físicos implican la reducción del tamaño de las partículas sin ninguna alteración en su composición, y son causados por ciclos de hielo-deshielo, lluvia y otros efectos ambientales (Budhu, 2007).

Señala que la textura depende de la proporción de partículas minerales de diverso tamaño presentes en el suelo. Las partículas minerales se clasifican por tamaño en

tres grupos: Arena: diámetro entre 0,05 a 2 mm. Puede ser gruesa, fina y muy fina. Los granos de arena son ásperos al tacto y no forman agregados estables, porque conservan su individualidad. Limo: diámetro entre 0,002 y 0,5 mm. Al tacto es como la harina o el talco, y tiene alta capacidad de retención de agua. Arcilla: diámetro inferior a 0,002 mm. Al ser humedecida es plástica y pegajosa; cuando seca forma terrones duros. (Brack A, 2009).

Añaden que la estructura del suelo está dada por la ordenación de las partículas primarias (arena, limo y arcilla) en la forma de agregados en ciertos modelos estructurales, que incluyen necesariamente el espacio poroso. Aunque no sea considerada un factor de crecimiento para las plantas, la estructura del suelo ejerce influencia en el aporte de agua y de aire a las raíces, en la disponibilidad de nutrimentos, en la penetración y desarrollo de las raíces y en el desarrollo de la macro fauna del suelo. (Benítez et al, 2009).

Manifiesta que el color es un carácter del suelo, fácil de observar y de uso cómodo para identificar un tipo de suelo dentro del cuadro regional o local. Las principales sustancias que confieren al suelo su color son el humus, compuesto minerales como los óxidos, sulfuros, sulfatos, carbonatos. Los colores claros, es decir, el blanco o el blancuzco, son debidos a la abundancia de minerales blancos o incoloros. La cantidad de calor absorbido o reflejado por el suelo depende, en gran parte, de su color, ya que juega el mismo papel cualesquiera que sean los cuerpos considerados. Se sabe que los cuerpos blancos son los que reflejan más las radiaciones caloríficas que reciben, mientras que al contrario, los cuerpos negros las absorben al máximo. (Rucks L. 2009).

Los químicos son originados por la separación de las partículas minerales de las rocas; su alteración o destrucción y la resistencia a compuestos sólidos estables se deben, principalmente, a la acción del agua, el oxígeno, el dióxido de carbono y los compuestos orgánicos (Budhu, 2007).

Sostiene que el pH, es extremadamente importante para las plantas porque afecta directamente la disponibilidad de los nutrientes necesarios para el crecimiento eficiente de las plantas. Los suelos que son muy ácidos o demasiado alcalinos no favorecen la solución de compuestos, y, por lo tanto, restringen la presencia de iones de nutrientes esenciales para las plantas. El pH del suelo es el resultado de muchos factores, entre otros, material parental del suelo, materia orgánica, crecimiento vegetativo, y nutrientes añadidos. (Ecoplexity, 2009).

Indica que la salinidad es la consecuencia de la presencia de sales en el suelo. Por sus propias características se encuentran tanto en la fase sólida como en la fase líquida por lo que tiene una extraordinaria movilidad. (Starmedia, 2009).

Expone que la acidez, unida a la poca disponibilidad de nutrientes, es una de las mayores limitaciones de la baja productividad de los suelos ácidos. Aunque la acidificación es un proceso natural, la agricultura y otras actividades humanas aceleran este proceso. Debido al aumento de áreas acidificadas en el mundo y a la necesidad de producir más alimentos, es fundamental entender la química que explica el proceso de acidificación de los suelos. De esta forma se podrán desarrollar prácticas para recuperarlos o no acidificarlos. (Zapata R, 2009).

Por su parte, los cambios biológicos son realizados por la comunidad que habita en el suelo: flora (plantas), macro fauna (invertebrados), meso fauna (artrópodos, anélidos, nemátodos y moluscos), micro fauna (protozoos y algunos nemátodos) y micro biota (bacterias, actinomicetes, hongos y algas), y el 80-90% de los procesos son reacciones mediadas por la micro biota (Nannipieri *et al.*, 2003; Porta *et al.*, 2003). Estos cambios biológicos son: la degradación y el aporte de materia orgánica, la producción de CO₂ en la respiración, la intervención en la movilidad de los ciclos biogeoquímicos de los elementos y los efectos mecánicos de los animales y las plantas, así como el fraccionamiento de las rocas por las raíces, entre otros (Porta *et al.*, 2003).

Manifiesta que la materia orgánica representa del 95 al 99% del total del peso seco de los seres vivos, pero su presencia en los suelos suele ser escasa y son contadas las excepciones en las que supera el 2%, el nivel deseable de materia orgánica en los suelos arcillosos medios es del 2%, pudiendo descender a 1,65% en suelos pesados y llegar a un 2,5% en los arenosos. (SciELO, 2009).

Indica que las propiedades biológicas del suelo son muy importantes, ya que está constituida por la micro fauna del suelo, como hongos, bacterias, nematodos, insectos y lombrices, los cuales mejoran las condiciones del suelo acelerando la descomposición y mineralización de la materia orgánica, además que entre ellos ocurren procesos de antagonismo o sinergia que permite un balance entre poblaciones dañinas y benéficas que disminuyen los ataques de plagas a las plantas. (Rico A, 2009).

Como sociedades cada vez más urbanas, sin contacto con la naturaleza, perdemos de vista la importancia de los suelos para nuestra supervivencia y prosperidad. Sin embargo, en todos los ecosistemas, los suelos cumplen con importantes funciones de las cuales se derivan servicios ambientales indispensables para el sostenimiento tanto del ecosistema como de la vida humana. La función más conocida es la de soporte y suministro de nutrientes a las plantas. De ahí que la degradación del suelo esté considerada como el mayor problema ambiental que amenaza la producción mundial de alimentos (PNUMA 2000) y una de las principales amenazas para el desarrollo sostenible de los terrenos agrícolas (Castillo 2004). No obstante, el suelo cumple con otras funciones igualmente trascendentes, como la de constituir un medio filtrante que permite la recarga de los acuíferos, influyendo también en la calidad del agua.

Incluyen propiedades tanto del contaminante como del suelo. A continuación se describen brevemente algunos de los factores fisicoquímicos más importantes:

Cada compuesto químico posee características únicas que dictan el mecanismo de combinación de ellos, y que controlan su movimiento y su biodegradabilidad. Este

parámetro es uno de los factores más importantes en la biodegradación. (Alexander, 1994).

La biodegradabilidad de un compuesto depende de su solubilidad. En general, al aumentar la solubilidad, la disponibilidad para los microorganismos aumenta. (Reddy y col., 1982; Singer y Finnerty; 1984).

La velocidad de movimiento de un contaminante a través del suelo, es proporcional a su concentración y a su coeficiente de difusión. La difusión de un contaminante hacia dentro y fuera de los poros del suelo es un importante factor que controla su biodegradación. Es uno de los procesos abióticos que compite más efectivamente con los microorganismos por el sustrato (Alexander, 1994; Riser- Roberts, 1998).

Es el proceso en el que un compuesto químico se mueve de una fase líquida o sólida a la gaseosa, como resultado de su difusión molecular. La velocidad de volatilización de un compuesto en el suelo, es una función de su concentración, su presión de vapor y su solubilidad. La volatilización depende del tipo de compuesto, del contenido de humedad, de la temperatura y de la porosidad del suelo, y del contenido de materia orgánica y arcillas (Eweis y col., 1998).

La migración de un compuesto inmiscible depende de su densidad y viscosidad. La densidad determina la tendencia de la fase inmiscible a flotar o sumergirse en la superficie del suelo, y por consiguiente el lugar en donde este quedara concentrado (Bouwer y Zehnder, 1993).

Los factores ambientales son aquellos afectan directamente al crecimiento y actividad de los organismos que llevan a cabo la biodegradación.

A continuación se describen uno de los más importantes:

La temperatura del sitio influye directamente en la actividad microbiana. Un descenso en la temperatura provoca una disminución en la velocidad de

degradación. Mientras que altas temperaturas pueden perjudicar la actividad de algunos organismos, provocar la volatilización del contaminante y un aumento en la solubilidad, así como la disminución en la solubilidad del O₂ (Van Deuren y col., 1997; Eweis y col., 1998).

La actividad microbiana disminuye a valores extremos de pH, en cambio a valores moderados, la biodegradación es más rápida. El pH influye también en la solubilidad, y en consecuencia, en la disponibilidad del contaminante y otros constituyentes del suelo que afectan la actividad biológica (Alexander, 1994).

Para que la biodegradación se lleve a cabo, el contaminante debe estar accesible al organismo. La persistencia de contaminantes en ambientes en que las especies degradadoras estén presentes, se debe a que el contaminante no este accesible. Esta inaccesibilidad es resultado de la sorción del compuesto en las partículas del suelo o de su baja solubilidad en agua (Bouwer et al., 1993).

Para que un microorganismo pueda crecer, además de un compuesto orgánico que sirva como fuente de carbono y energía, se requiere de nutrientes y de un aceptor de electrones (O₂ para aerobios) (Singleton, 1995).

Los microorganismos requieren de una humedad adecuada para su crecimiento y actividad. El agua sirve como medio de transporte para nutrientes y constituyentes orgánicos hacia la célula microbiana, y de productos de desecho hacia fuera de célula. El nivel óptimo de humedad, depende de las propiedades del suelo, la naturaleza del contaminante y del tipo de transformación (aerobia y anaerobia). En general, un contenido de humedad bajo disminuye la biodegradación (Van Deuren y con., 1997)

Los factores biológicos se refieren a la presencia de organismos con rutas metabólicas capaces para degradar los compuestos de interés, y a la aclimatación

o inducción de enzimas que catalicen las reacciones necesarias en la población microbiana. La persistencia de un agente químico en el suelo puede ser el resultado de diferentes tipos de interacciones biológicas (Riser- Roberts, 1998).

La diversidad bacteriana puede ser definida como el número de especies o biotipos y su abundancia relativa en un espacio y tiempo determinados dentro de una comunidad o también puede ser definida como la cantidad y distribución de información (e.g. genética, funcional) dentro de la comunidad (i.e. comunidades complejas poseen mayor información). Esto incluye la diversidad de genes, hábitats, nichos y la diversidad funcional de las poblaciones; de esta forma la diversidad puede considerarse un atributo de la comunidad, relacionada con estabilidad, productividad y estructura trófica (Stirling et al., 2001).

La conexión entre la diversidad y la función de los sistemas biológicos es aún un tema de discusión abierto. Para algunos una mayor diversidad implica un detrimento para el sistema ya que como afirman Atlas y Bartha (2002), las comunidades que poseen una estructura compleja generalmente poseen tasas de producción primaria menor, debido a que se necesita menor cantidad de energía para mantener la estabilidad de la comunidad, sin embargo, las comunidades diversas poseen un mayor rango de respuestas ante una perturbación.

Dada la multiplicidad de microambientes disponibles en el suelo y las múltiples interacciones con organismos animales y vegetales, la diversidad esperada de microorganismos en el suelo es alta. Curtis et al.(2002), estimaron usando curvas de abundancia de especies que en el suelo pueden encontrarse de 6.000 a 38.000 tasa por gramo, una cantidad enorme comparada con las aproximadamente 5000 especies de bacteria reportadas hasta ahora, indicando el gran desconocimiento que se tiene de la composición de las comunidades.

Para la evaluación de la degradación de un compuesto, es necesario tener en cuenta diversas variables que influyen en el estudio, tales como, el objetivo de este, el tiempo durante el cual va a ser llevado a cabo y el impacto que se puede generar sobre el ecosistema. Se han propuesto metodologías que pueden evaluar el proceso de biodegradación de una sustancia como las directas, que cuantifican la reducción del contaminante en volumen, masa o concentración, realizando balance de nutrientes y utilizando técnicas como la cromatografía, espectrofotometría, etc. En cuanto a las metodologías indirectas, estas evalúan la transformación o conversión de los contaminantes por el metabolismo de los microorganismos. Dentro de este monitoreo se encuentran el consumo de aceptores de electrones, la respirometría, biomasa y actividad enzimática (Cárdenas, 2012).

Dentro de las metodologías indirectas, implicadas en la evaluación de procesos de Biodegradación de sustancias contaminantes, se encuentra la respirometría. Esta técnica, se ha convertido en un criterio de gran importancia para medir, evaluar y controlar la actividad metabólica en la degradación de un contaminante. El uso de esta técnica trae ventajas como su rapidez, fácil montaje, la evaluación de diferentes tratamientos antes de su aplicación en campo y se puede calcular la tasa de respiración (Cárdenas, 2012).

5.3. MARCO CONCEPTUAL

BACTERIAS: Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como Chlamydias y Rickettsias. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento.

BIORREMEDIACION: La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza organismos vivos (plantas, algas, hongos y bacterias) para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en suelo, agua y aire.

CONTAMINACION: La contaminación es la introducción de sustancias u otros elementos físicos en un medio que provocan que éste sea inseguro o no apto para su uso. El medio puede ser un ecosistema, un medio físico o un ser vivo.

DEGRADACION AMBIENTAL: La degradación del suelo es la consecuencia directa de la utilización del suelo por el hombre. Bien como resultado de actuaciones directas, como agrícola, forestal, ganadera, agroquímicos y riego, o por acciones indirectas, como son las actividades industriales, eliminación de residuos, transporte, etc.

GASOLINA: La gasolina es una mezcla de hidrocarburos obtenida de la destilación fraccionada del petróleo, utilizada principalmente como combustible en diversos tipos de motores.

HIDROCARBUROS: Los hidrocarburos son compuestos Orgánicos formados únicamente por átomos de carbono e hidrógeno. Los hidrocarburos son los compuestos básicos que estudia la Química Orgánica. Las cadenas de átomos de

carbono pueden ser lineales o ramificadas, y abiertas o cerradas.

RESPIROMETRIA: La respirometría es uno de los métodos más utilizados para monitorear procesos de biorremediación ya que mediante el consumo de O₂ y la producción de CO₂ por parte de los microorganismos, en condiciones experimentales definidas.

SUELO: Se denomina suelo a la parte superficial de la corteza terrestre, biológicamente activa, que proviene de la desintegración o alteración física y química de las rocas y de los residuos de las actividades de seres vivos que se asientan sobre ella.

USO DEL SUELO: disponibilidad del suelo para una serie de posibles usos, que pueden ser ordenados y distribuidos de acuerdo a un plan, o de manera espontánea.

5.4. MARCO CONTEXTUAL

5.4.1. Municipio de Villanueva guajira

El Municipio de Villanueva tiene una superficie de 265 Km², que corresponden al 1,27% del territorio departamental. No cuenta con corregimientos, el Municipio se encuentra dividido en sector urbano, determinado por el perímetro urbano; el área de expansión urbana, determinada como área de crecimiento para desarrollo futuro; el área suburbana que comprende los caseríos de Las Flores, Los Zanjones y Juncalito y sector rural, el cual está conformado por diez (10) regiones: San Gerónimo, Los Guamachitos, La Sarahita, El Tunal, Los Quemaos, El Horno, Nolasco, Los Llanos, El Morro, Potrero Grande y seis (6) veredas: Juncalito, Las Flores, Los Zanjones, El Eneal, Orozul, Los Quemaos.

5.4.2. Factores abióticos

El municipio de Villanueva – Guajira cuenta con un clima tropical y la temperatura promedio es de 28°C en el casco urbano y alcanza valores mínimos a medida que se asciende hacia la cordillera. En algunas épocas calurosas del año, este elemento climático ha alcanzado unos 31°C, las variaciones anuales de temperatura ejercen una gran influencia no sólo del territorio. Se puede evidenciar que la topografía plana y montañosa del Municipio favorece la diversidad del clima, estableciéndose dos zonas climáticas: Una determinada por el Valle del Cesar y la otra por las estribaciones de la Cordillera. (EOT Villanueva – Guajira).

5.4.3. Factores bióticos

- FLORA: Aunque la vegetación natural ha sido disminuida por la acción del hombre, se encuentran áreas donde existen especies forestales valiosas, especialmente en las colinas.

En las partes más planas, correspondientes a las zonas de vida bosque seco Premontano con transición al cálido (bs-PM), y bosque seco tropical (bs-T), se presentan algunos enclaves edáficos con mayor humedad y se encuentran especies de caracolí (*Anacardium excelsum*), guamo (*Inga sp.*)

Olla de mono (*Lecythis* sp), algarrobo (*Hymenaea courbaril*), corazón fino (*Platymiscium* sp.), Higuerón (*Ficus* sp), guarumo (*Cecropia* sp.) guácimo (*Guazuma ulmifolia*). (EOT Villanueva – Guajira).

- **FAUNA:** La fauna se encuentra en proceso de extinción no muy acentuada que aún existe áreas boscosas que sirven de refugio y alimento, especialmente en la zona de colinas; Según informaciones suministrada por el jefe de bosques de la oficina de CORPOGUAJIRA, en el área aún existen varias especies de aves, mamíferos, reptiles y peces. Se define como el conjunto de animales que viven en una región geográfica determinada. La repartición de los animales está asociada a la existencia de determinados vegetales, pues, directa o indirectamente, estos son el sustento de aquellos. (EOT Villanueva – Guajira).



Figura 1. Ubicación del municipio de Villanueva en el departamento de la Guajira
Fuente: plan territorial de desarrollo de Villanueva (2018).

5.5. MARCO LEGAL

En la constitución política de Colombia de 1991 en los artículos 79 y 80 no se habla directamente sobre la contaminación del suelo como tal, sino que generaliza a la protección de los recursos naturales con el fin de buscar un desarrollo sostenible.

A continuación se presentan las principales normas, decretos y resoluciones que incluyen acciones para poder prevenir y controlar la contaminación del recurso suelo.

Artículo 79 de la constitucion politica 1991

Todas las personas tienen derecho a gozar de un ambiente sano. La ley garantizará la participación de la comunidad en las decisiones que puedan afectarlo. Es deber del Estado proteger la diversidad e integridad del ambiente, conservar las áreas de especial importancia ecológica y fomentar la educación para el logro de estos fines.

Artículo 80 de la constitución política 1991

El Estado planificará el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución. Además, deberá prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental, imponer las sanciones legales y exigir la reparación de los daños causados. Así mismo, cooperará con otras naciones en la protección de los ecosistemas situados en las zonas fronterizas.

Ley 7779

Uso, manejo y conservación de suelos

La presente ley tiene como fin fundamental proteger, conservar y mejorar los suelos en gestión integrada y sostenible con los demás recursos naturales, mediante el fomento y la planificación ambiental adecuada.

Ley 23 de 1973

Decreta:

Art. 1. Es objeto de la presente ley prevenir y controlar la contaminación del medio ambiente y buscar el mejoramiento, conservación y restauración de los recursos naturales renovables, para defender la salud y el bienestar de todos los habitantes del Territorio Nacional.

Art. 2. El medio ambiente es un patrimonio común; por lo tanto su mejoramiento y conservación son actividades de utilidad pública, en las que deberán participar el Estado y los particulares. Para efectos de la presente Ley, se entenderá que el medio ambiente está constituido por la atmósfera y los recursos naturales renovables.

Resolución 0170 de 2009

Que conforme al artículo 8º, literales a, b y c del Código Nacional de los Recursos Naturales Renovables y de Protección al Medio Ambiente - Decreto ley 2811 de 1974-, "Se consideran factores que deterioran el ambiente entre otros:

- a)** La contaminación del aire, de las aguas, del suelo y de los demás recursos naturales renovables. Se entiende por contaminación la alteración del ambiente con sustancias o formas de energía puestas en él, por actividad humana o de la naturaleza, en cantidades, concentraciones o niveles capaces de interferir el bienestar y la salud de las personas, atentar contra la flora y la fauna, degradar la calidad del ambiente de los recursos de la nación o de los particulares. Se entiende por contaminante cualquier elemento, combinación de elementos, o forma de energía que actual o potencialmente pueda producir alteración ambiental de las precedentemente descritas. La contaminación puede ser física, química o biológica;
- b)** La degradación, la erosión y el revenimiento de suelos y tierras;
- c)** Las alteraciones nocivas de la topografía;

Que igualmente, el artículo 179 ibídem señala que "El aprovechamiento de los suelos deberá efectuarse en forma de mantener su integridad física y su capacidad productora. En la utilización de los suelos se aplicarán normas técnicas de manejo para evitar su pérdida o degradación, lograr su recuperación y asegurar su conservación".

Que así mismo, conforme al artículo 180 de la norma citada, "Es deber de todos los habitantes de la República colaborar con las autoridades en la conservación y en el manejo adecuado de los suelos. Las personas que realicen actividades agrícolas, pecuarias, forestales o de infraestructura, que afecten o puedan afectar los suelos, están obligadas a llevar a cabo las prácticas de conservación y recuperación que se determinen de acuerdo con las características regionales".

6. MARCO METODOLOGICO

6.1. TIPO DE INVESTIGACION.

El tipo de investigación aplicada para la determinación de bacterias con potencial degradador de gasolina en la rizosfera de seis puntos donde se evidencia la venta ilegal de este hidrocarburo en Villanueva-Guajira es: explicativo de nivel experimental.

Con este estudio explicativo se buscó, establecer hipótesis (supuestos que se pueden verificar por medio de ensayos, experimentos llevados a cabo en el laboratorio o fuera del (entorno natural), con el objetivo de saber si las técnicas propuestas le dan solución a la problemática.

6.2. LÍNEA INVESTIGACIÓN

La investigación pertenece a la línea **de Sostenibilidad y Gestión Ambiental**.

6.3 SUBLINEA

La investigación pertenece a la sublínea **Recurso suelos**

6.4 POBLACIÓN

La población de análisis fundamental para este estudio fue el suelo contaminado con gasolina obtenido de seis puntos donde venden este hidrocarburo, ubicado en el municipio de Villanueva la Guajira.



Figura 2. Mapa del municipio de Villanueva-Guajira
Fuente: Google Maps (2018)

6.5 MUESTRA

En cada uno de estos puntos se recolectó una submuestra de suelo, el muestreo consistió en realizar las tomas en zig-zag, tomando en cada punto una muestra simple, se tomó un total de 6 muestras, después se revolviaron, se hizo un cuarteo con el fin de tener una muestra más representativa y posterior a esto se obtuvo la muestra donde se realizaron los análisis al suelo y el aislamiento de los microorganismos presentes.

6.6. DESARROLLO METODOLÓGICO

6.6.1. Obtención de la información técnica e instrumentos de recolección de la información.

La información de este proyecto se obtuvo de 2 formas, recolección de información primaria y secundaria.

Información primaria: esta se obtuvo de tesis de grados, revistas científicas, artículos científicos, libros, que tenían relación con la investigación trazada. La recolección de la información se hizo por medio de la web por las principales bases de datos académica como son: Google académico, Scielo, ScienceDirect y el portal de revistas científica para Latino América Redalyc.

La información secundaria se consiguió de los estudios de laboratorio y labor en campo realizados y concluidos en la investigación.

6.6.2. Etapa 1. Toma de muestra de suelo por el método de cuarteo y zigzag

Las muestras de suelo se recolectaron en 6 puntos del municipio de Villanueva (los más antiguos) donde se evidenció la degradación del suelo por causa de la venta de la gasolina. El muestreo consistió en realizar las tomas en zig-zag, tomando en cada punto una muestra simple, se tomó un total de 6 muestras de aproximadamente un kilogramo a partir de un área de 1m² a una profundidad comprendida entre 12 a 15 cm, estas fueron mezcladas, se hizo un cuarteo para tener una muestra representativa de 2 Kg sobre la cual se le realizaron las determinaciones. (Acuña et al, 2010)

Las muestras se preservaron en bolsas de polietileno con sello hermético y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento (Álvarez et al., 2016).

Trabajamos con el tipo de muestreo probabilístico, ya que en la muestra seleccionada encontramos bacterias que tenían la misma probabilidad de degradar gasolina, por consiguiente son resistente a este hidrocarburo.

6.6.2.1. *Aislamiento y conteo de bacterias degradadoras de gasolina por la técnica de dilución en placa.*

Se preparó el medio mineral, ajustando el pH a 7 para después agregarle el agar noble. Se esterilizó a 15 lb por 15 minutos, dejándose enfriar a unos 50°C para añadir la solución mineral estéril previamente preparada (1ml por litro del medio). Después se vació en cajas Petri en condiciones estériles y se esperó a que solidificaran

6.6.2.2. *Desarrollo De Las Diluciones*

Se utilizaron tubos con tapón de rosca con 9 mL y frascos con 90 mL de solución salina isotónica al 0.85% así como cajas Petri y puntas para pipeta automática, esterilizados por 20 minutos a 15 lb de presión. Para la preparación de la muestra se pesaron, en condiciones de esterilidad, 10 g de suelo que fueron agregados al frasco de 90 mL de solución isotónica estéril, dejándolo en incubación a 35°C para la activación de los microorganismos. Después de 24 horas de incubación se procedió a la preparación de diluciones tomando 1 mL de la muestra incubada y transfiriéndolo a uno de los tubos (dilución 10⁻²), previamente se dispersó el suelo y homogeneizó la muestra. Se repitió este paso preparando diluciones sucesivas hasta la dilución 10⁻⁴, asegurándose de utilizar una punta estéril diferente en cada paso (Universidad veracruzana, 2014).

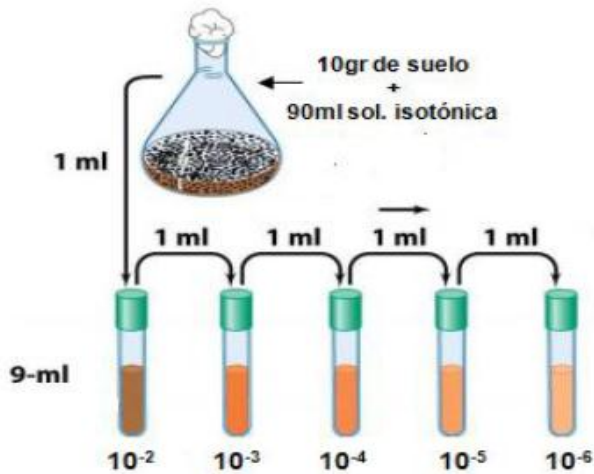


Figura 3. Técnica de dilución
Fuente: Universidad veracruzana (2014)

Posteriormente, se tomó 1 mL de cada dilución y se inoculó en el centro de cada caja de Petri conformada por el medio mineral, se obtuvieron dos cajas por cada dilución y se extendió la alícuota en la superficie de la placa cuidadosamente haciendo giros a la derecha y a la izquierda, y moviendo la caja horizontal y verticalmente seguido de esto se humedecieron discos de papel filtro estéril con gasolina, y se colocaron en la parte interna de la tapa de la caja Petri. Dejando así que el hidrocarburo se volatilizara para que sirviera como única fuente de carbono y energía. (Universidad veracruzana, 2014).

Se incubaron las cajas de forma invertida a la temperatura que se consideró óptima en función del suelo y la localización del sitio.

Pasados tres días de incubación, se procedió al conteo de UFC en las cajas, por medio de la técnica de “punteo”.

Para realizar el conteo se seleccionaron las dos cajas de la dilución 10^{-3} .

6.6.2.3. Aislamiento y purificación:

A partir del crecimiento de colonias en atmósfera de gasolina se procedió a identificar con ayuda de un microscopio estereoscópico 1 tipo de colonia siguiendo como criterio la visualización de la morfología de crecimiento, el inóculo se tomó de la caja 10-3 de las diluciones (Universidad Veracruzana, 2014).

Una vez diferenciada, se marcó la ubicación en la caja Petri y se sembró para su purificación en 2 cajas que contenían caldo nutritivo. Cada colonia se rotuló. Transcurrida las cuarenta y ocho horas de incubación, para verificar la pureza de la cepa bacteriana se procedió a sembrar por estrías en agar nutritivo, incubando a 30 °C por 48 horas (Escalante, 2002).

6.6.3. Etapa 2. Determinación de las propiedades fisicoquímicas del suelo

Las propiedades del suelo tenidas en cuenta son de gran importancia ya que hacen parte de la capa vegetal y además de son las condiciones en las que viven los microorganismos.

PARAMETRO	METODO O TECNICA
Textura	Método de bouyoucus
Humedad	Método Gravimétrico
pH	Potenciometria
materia Orgánica	Método de Walkey-Black
Nitrógeno orgánico	Método matemático
Fosforo	Método de Oisen
Potasio	Absorción Atómica

Tabla 1. Parámetros a determinar en el suelo
Fuente: autores (2018)

6.6.3.1 Determinación de textura (Método de Bouyoucus)

Para la preparación de la muestra se pesaron 60 g de suelo tamizado (Tamiz No. 2) y se agregaron aproximadamente 40 mL de peróxido de hidrógeno para la digestión de la materia orgánica, se homogeneizó y se evaporó hasta sequedad.

Este paso se repitió hasta que ya no hubo efervescencia en el suelo al humedecerse con el agua oxigenada.

Cuando la muestra se secó, se llevó a la estufa a una temperatura de 100°C y se dejó secar durante varios días, luego se sacó de la estufa para que se enfriara a temperatura ambiente y se continuó con la determinación.

De la muestra ya digerida y seca se pesaron 50 g de suelo, saturándola con agua destilada y 10 mL de solución de calgón al 10% y se homogeneizó, dejándola reposar por 15 minutos, la suspensión fue mezclada en una batidora y después se vació en una probeta de 1000 mL. Finalmente, la suspensión fue bien mezclada mediante la agitación de la probeta tapada con un trozo de papel adhesivo, después se introdujo el hidrómetro dentro de la probeta, y 40 segundos después se tomó una lectura del hidrómetro y la temperatura; se dejó en reposo la suspensión por dos horas y se tomó una segunda lectura del hidrómetro y de la temperatura (Aguilar, 2014).

6.6.3.2. Determinación de humedad (Método gravimétrico)

En esta determinación se realizó por duplicado siguiendo el método gravimétrico, para lo cual se pesaron dos muestras de 2 g cada una en una cápsula de porcelana a peso constante y se dejaron 24 horas en estufa de secado a 80°C. Pasado el tiempo, se pesó en la balanza analítica las cápsulas con muestras secas del suelo, después se dejó media hora más para comprobar que estaban a peso contante, al final se compararon los pesos finales con los iniciales de cada una, para así poder calcular el porcentaje de humedad mediante la siguiente fórmula: (Aguilar, 2014).

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{peso inicial} - \text{peso final})}{\text{peso final}} * 100$$

6.6.3.3. Determinación de pH (Método potenciométrico)

Para determinar el pH de la muestra de suelo se pesaron 10 g de suelo tamizado (Tamiz No.1) y se agregaron 20 mL de agua destilada, dejando en agitación por 30

minutos, después se dejó reposar y se tomó la lectura directamente del potenciómetro, anotando también la temperatura (Aguilar, 2014).

6.6.3.4. Determinación de materia orgánica (método de Walkey-Black)

Se pesaron 0.05 g de suelo de tamiz No.0.5 en un matraz de 500 mL al que, para oxidar la materia orgánica, se le añadió 10 mL de dicromato de potasio 1 N mezclando con movimiento rotatorios y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado dejándolo caer suavemente por la pared del matraz, ya que se podría generar una reacción violenta y exotérmica. Se dejó reposar por 30 minutos y simultáneamente se realizó de la misma forma un ensayo en blanco, es decir sin muestra de suelo. Para hacer la valoración por retroceso se le agregarán 200 mL de agua destilada, 5 mL de ácido fosfórico y de 5 a 8 gotas de indicador difenilaminasulfonato de bario, valorando con la solución de sulfato ferroso amónico 1 N.

El color verde oscuro debido a los iones cromo en un precipitado, se desplazó hacia el azul turbio a medida que avanza la valoración. En el punto final este color cambió bruscamente a verde brillante, dando el viraje con una gota (Aguilar, 2014).

6.6.3.5. Determinación del nitrógeno orgánico (Método matemático)

El porcentaje de nitrógeno orgánico se obtiene a partir del cálculo de porcentaje de materia orgánica, mediante el uso de la siguiente expresión: (Aguilar, 2014).

$$\% \text{ Nitrogeno Organico} = \frac{\% \text{ Materia Organica}}{20}$$

6.6.3.6. Determinación de fósforo (Método de Olsen)

Para determinar el fósforo de la muestra se pesaron, por duplicado, 2.5 g de suelo en tamiz No. 2 y se colocaron en tubos de polietileno, se adicionaron 50 mL de solución extractora y se agitó la suspensión en agitador de acción recíproca durante

30 minutos, a 180 oscilaciones por minuto para posteriormente filtrarlas a través de papel filtro Whatman No. 42.

Después de esto se tomó 5 mL (ó 10 si la concentración de P es muy baja) del filtrado y se colocó en un matraz aforado de 50 mL. Finalmente, se agregaron 5 mL de la solución reductora. Se agitó y aforó, al mismo tiempo se preparó un blanco de la misma manera. Las preparaciones se dejaron reposar por una hora para que el color se revelara y después se hizo la lectura en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 882 nm. Para preparar la curva de calibración se usaron de 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 mg L⁻¹ de P (Aguilar, 2014).

6.6.3.7. Determinación de potasio (Absorción Atómica)

Para determinar el Potasio de la muestra se pesaron 2,5 g de suelo y se colocaron en un beacker de 125 mL. Se adicionaron 25mL de CH₃COONH₄ 1 N a un pH de 7. Luego, se agitó continuamente por 15 min, se filtró con un papel de filtro whatman N° 42 y se depositó a un matraz aforado. Finalmente, se leyó en el equipo de absorción atómica en llama de N₂O y C₂H₂. Recuperado de monografías.com

6.6.4. Etapa 3. Caracterización de bacterias en el suelo contaminado de Villanueva – guajira a escala laboratorio.

6.6.4.1. Caracterización microscópica y macroscópica del crecimiento de las cepas puras cultivadas.

La caracterización macroscópica se ejecutó observando menudamente las características morfológicas de la colonia elegida y comparándola con la guía de clasificación según (Aguilar, 2014).



Figura 4. Características macroscópicas
Fuente: universidad veracruzana (2014)

También se realizó la caracterización microscópica de las cepas aisladas realizando la cloración de Gram.

La secuencia de la tinción fue la siguiente: el frotis fue fijado con calor a un portaobjetos, agregándole por 1 minuto algunas gotas de cristal violeta, se lavó con agua destilada, se cubrió con solución yodada durante 1 minuto y se lavó de nuevo con agua destilada, se decoloró con alcohol al 95%, se dejó escurrir y se cubrió con safranina (color de contraste) durante 10 minutos, se lavó con agua destilada y se secó, para después observar el porta objetos en un microscopio compuesto. (Aguilar, 2014).

6.6.4.2. Caracterización bioquímica de las bacterias

Las pruebas que se realizaron para la identificación del género correspondiente a la cepa obtenida están descrita a continuación:

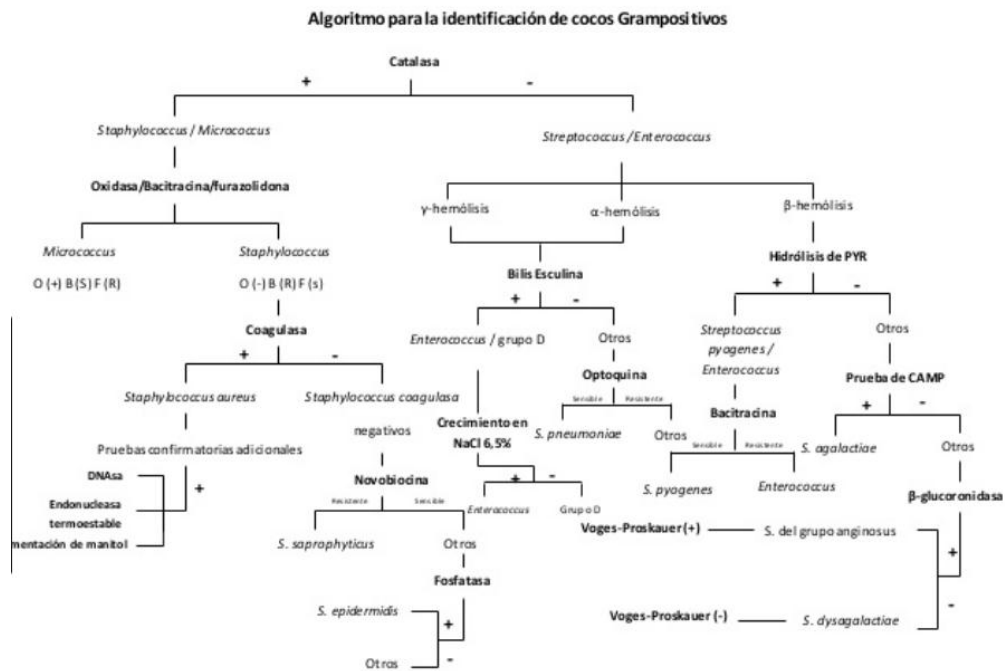


Figura 5. Identificación de cocos Gram positivo
Fuente: Salazar (2018).

Prueba de TSI

Se fundamenta en evidenciar la fermentación de los azúcares presentes, y la producción de sulfuro de hidrógeno y gas.

Interpretación de resultados

1. Superficie alcalina/ profundidad acida (pico rojo/fondo amarillo): el microorganismo solamente fermenta la glucosa.
2. Superficie acida/profundidad acida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa.
3. Superficie alcalina/profundidad alcalina (pico rojo/ fondo rojo): el microorganismo no es fermentador de azúcares.
4. la presencia de burbujas o la ruptura del medio de cultivo indican que el microorganismo produce gas.
5. El ennegrecimiento del medio indica que el microorganismo produce ácido sulfúrico. (laboratorio Britania, 2010).

El sembrado se realizó con un asa recta. Se realizó una punción, cuidando que fuera por el centro del medio hasta llegar al fondo, y luego se terminó el sembrado inoculando la superficie en forma de zigzag, se Incubó a 37°C en aerobiosis por 18-24 horas para interpretar los resultados.

Prueba de Catalasa

Pone de manifiesto la presencia de la enzima catalasa en una bacteria. Esta enzima es capaz de descomponer el peróxido de hidrogeno (agua oxigenada en agua y oxígeno, con la consiguiente aparición de burbujas. La mayoría de las bacterias Gram negativas son catalasa positiva. (Universidad Veracruzana, 2014).

Con un asa de platino, en condiciones de esterilidad, se tomó una porción de cultivo bacteriano y se colocó en un porta objetos limpio, después se le agregó una gota de peróxido de hidrogeno al 3 % (Aguilar, 2014).

Prueba de Hemolisis

Los microorganismos hemolíticos liberan enzimas (hemolisinas) al medio que destruyen los glóbulos rojos apareciendo halos de hemólisis. (Microbiología clínica, 2013).

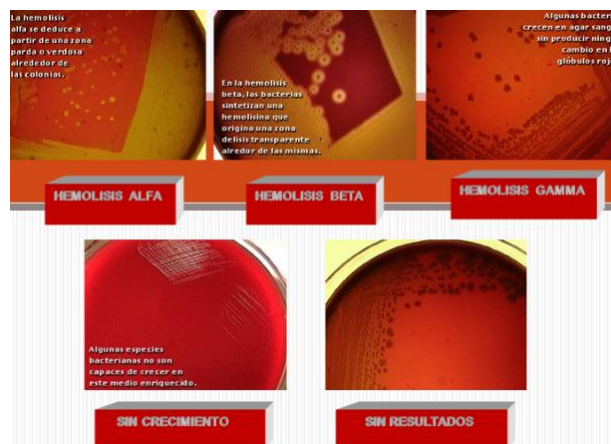


Figura 6. Interpretación de resultados de Hemolisis
Fuente: Ramírez et al (2013).

Se sembraron las placas en la superficie del medio (agar sangre), y se Incubó a 37° C de 24 a 48 horas.

Prueba de Bilis esculina

Es un medio selectivo y diferencial que se usa para aislar e identificar un gran número de miembros del género *Enterococcus*, y también *Streptococcus* del grupo D.

La siembra se hizo por inoculación directa del material en estudio en placa, se incubó en aerobiosis a 35-37 °C (laboratorio Britania, 2019).

Prueba de Crecimiento en NaCl al 6.5%

El agar sal es un medio recomendado para evaluar la tolerancia al NaCl y diferenciar *Enterococcus* de otros *Streptococcus* de Grupo D.

La siembra se hizo por inoculación directa del material en estudio en tubo, y se incubó a 24-48 horas a 37°C en atmósfera aeróbica, con CO₂ o anaeróbica.

6.6.5. Etapa 4. Rendimiento de microorganismos tolerantes a la gasolina

Las metodologías que se utilizaron para evaluar el comportamiento de las bacterias para degradar la gasolina fueron la respirometría y la cinética de crecimiento de las bacterias a partir de la turbidez.

6.6.5.1. Respirometría

Preparación del inóculo

Se realizó un enriquecimiento del microorganismo identificado sembrando en viales la colonia aislada por triplicado conteniendo 2ml de caldo nutritivo en plano inclinado, se incubó a 30 °C por 48 horas. Una vez observadas la pureza de las cepas bacterianas se procedió a taponar los viales con tapones de goma estériles y a sellar con parafina. Fue mantenido en refrigeración a 4 °C hasta que se

realizaron las pruebas de capacidad degradativa (Escalante, 2002), y hasta que el cultivo logró una densidad óptica de 0,5 a 690 nm. (Acuña et al, 2010).

Preparación de la muestra

Fueron utilizados 750g de suelo, este fue tamizado con un tamaño de poro (1mm), con el fin de generar una muestra más homogénea para los ensayos de respirometría, además se sometió a 500°C en una mufla durante 3h con el fin de eliminar la materia orgánica presente. Por último se esterilizó por una hora a 121°C y 15 lb de presión. Este proceso se llevó a cabo 3 veces con el fin de destruir microorganismos presentes en la suelo que pudieran llegar a generar alguna interferencia con el microorganismo a evaluar. Posterior a esto se le agregó el inoculo y esta fue contaminada con gasolina con el propósito de ser la única fuente de carbono y energía (Cárdenas, 2012).

Preparación de la prueba de respirometría

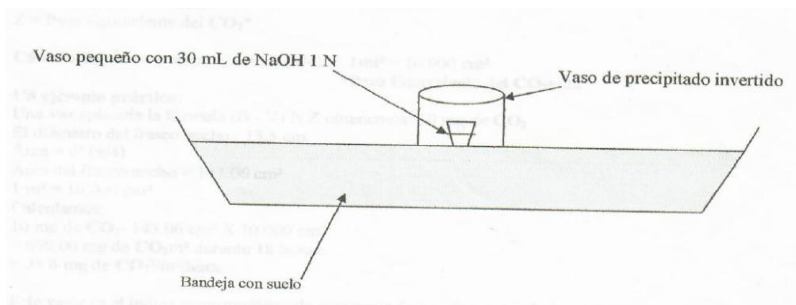


Figura 7. Montaje de los microcosmos
Fuente: universidad de córdoba (2018)

Mediante esta técnica se buscó cuantificar la cantidad de dióxido de carbono que producen los microorganismos, la cual es atribuida a la degradación de los sustratos (gasolina).

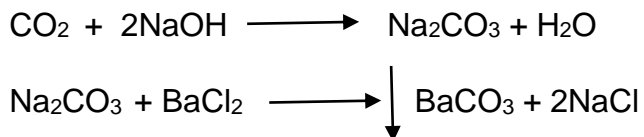
La confiabilidad de la evolución de la producción de CO₂ como actividad microbiana se interpretara de acuerdo a las características de los microorganismos

involucrados en la transformación, el tipo de material sometido a la descomposición y por ultimo a las propiedades físicas y químicas del suelo.

Para el ensayo se utilizaron; el terrario o mesocosmos, vaso de precipitado, solución de NaOH a una concentración de 1NORMAL, solución de HCL a una concentración de 1NORMAL, solución de BaCl₂ una concentración de 2%, buretas de 25ml y fenolftaleína.

El vaso pequeño se colocó con 30mL de NaOH a 1N dentro del vaso de precipitado invertido con el fin de que este quedara cerrado herméticamente y previniera el ingreso de CO₂ atmosférico, luego se incubó una semana, pasada la semana se empezó a titular.

Agregamos a cada vaso pequeño que contenia NaOH, 5mL de una solución de 2% de BaCl₂, el bario reaccionó con el carbonato precipitándolo como BaCO₃ este paso se requiere debido a que el Na₂CO₃ es suficientemente alcalino para ser titulado con el NaOH remanente.



Se le agregaron 5 gotas del indicador fenolftaleína al Erlenmeyer y se tituló inmediatamente con HCL a 1N hasta un punto final blanco. Para así observar el punto final de la titulación (constancia en el cambio de color), si la solución permanece incolora la titulación es completa (Universidad de Córdoba, 2018).

- CALCULO DE CO₂

$$\text{Mg de CO}_2 = (\text{V} - \text{B}) \text{NZ}$$

Donde:

B: volumen de ácido necesario para titular el NaOH del blanco (en ml)

V: cantidad de ácido necesaria para titular el NaOH de la muestra (en ml).

N: normalidad de HCL.

Z: peso equivalente del CO₂

Muestra= muestra de suelo estéril, sustrato (gasolina) más inoculación del microorganismo (200 μ L) a la temperatura del sitio.

Blanco= sin adición de inóculo y bajo las mismas condiciones de la muestra. El objetivo de este blanco fue obtener la producción de CO₂ durante la respiración endógena de la muestra empleada (Cárdenas, 2012).

Con el fin de tener resultados más representativos se prepararon tres muestras, adicionando a cada una 0,5, 1 y 1,5 mililitros de gasolina respectivamente, cada una con sus blancos correspondientes.

6.6.5.2. Cinética de crecimiento

Se prepararon sistemas líquidos por duplicado utilizando como sustrato gasolina. Cada sistema estuvo conformado por 10 mL de caldo mineral, 20 μ L del hidrocarburo ensayado y 200 μ L del microorganismo a evaluar. La incubación se realizó 15 días a 28°C con agitación orbital a 150 r.p.m en oscuridad, y el seguimiento se realizó por medición de absorbancia a 690 nm frente a un blanco conformado por el caldo mineral más el hidrocarburo correspondiente, con el fin de observar la cinética de crecimiento, las lecturas se tomaron a los 3, 6, 9, 12 y 15 días (Acuña et al, 2010).

7. RESULTADOS Y ANALISIS

7.1. TOMA DE MUESTRA DE SUELO POR EL MÉTODO DE CUARTEO Y ZIGZAG

A los seis puntos de gasolina seleccionados en el municipio de Villanueva-Guajira, se les realizó toma de muestra, el muestreo consistió en realizar tomas en zigzag, tomando en cada punto una muestra simple para obtener un total de 6 muestras.

Las muestras fueron llevadas al laboratorio de microbiología de la universidad popular del cesar para realizarle los respectivos análisis.

7.1.1. Aislamiento y conteo de bacterias degradadoras de gasolina por la técnica de dilución en placa.

Se preparó el medio mineral y se le agregó el agar noble, esterilizando por 15 minutos para después agregarle la solución mineral. Seguido de esto se procedió a servir el medio en las cajas Petri esperando a que este solidificara.

El procedimiento se realizó en la cabina con el mechero encendido para evitar la contaminación de los medios y las muestras, después de esto se dejó en la incubadora por 24 horas a 28°C.



Figura 8. Preparación del medio mineral
Fuente: autores (2019)

7.1.2. Desarrollo De Las Diluciones

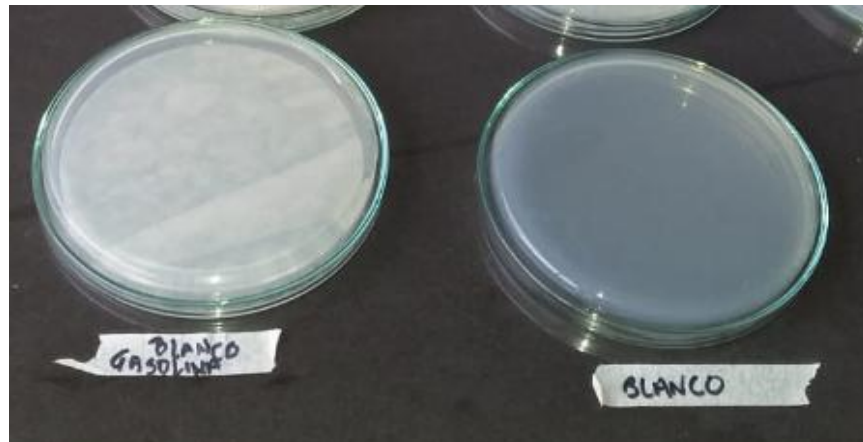
Se pesaron en condiciones de esterilidad, 10 gramos de suelo que fueron agregados al frasco de 90 mL de solución isotónica estéril, dejándolo en incubación a 35°C para la activación de los microorganismos. Después de 24 horas de incubación se procedió a la preparación de diluciones tomando 1 mL de la muestra incubada y transfiriéndolo a uno de los tubos (dilución 10⁻²), previamente se dispersó el suelo y homogeneizó la muestra. Se repitió este paso preparando diluciones sucesivas hasta la dilución 10⁻⁴, asegurándose de utilizar una punta estéril diferente en cada paso.



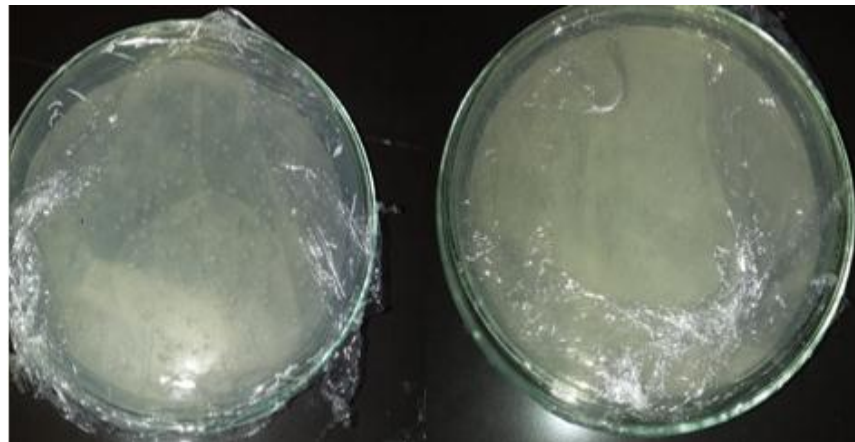
Figura 9. Desarrollo de diluciones
Fuente: autores (2019)

Posteriormente, se tomó 1 mL de cada dilución y se inoculó en el centro de cada caja de Petri conformada por el medio mineral en atmosfera de gasolina, se obtuvieron dos cajas por cada dilución y se extendió la alícuota en la superficie de la placa cuidadosamente haciendo giros a la derecha y a la izquierda, y moviendo la caja horizontal y verticalmente.

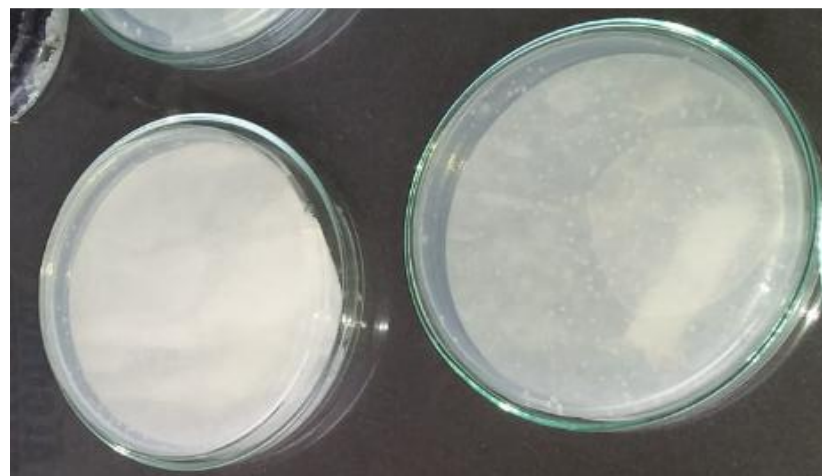
Para este procedimiento se utilizaron dos blancos, uno compuesto por el medio mineral basal más la gasolina, y el otro compuesto por el medio solamente, esto se hizo para llevar un control con las muestras. Pasado el tiempo de incubación se obtuvieron los siguientes resultados.



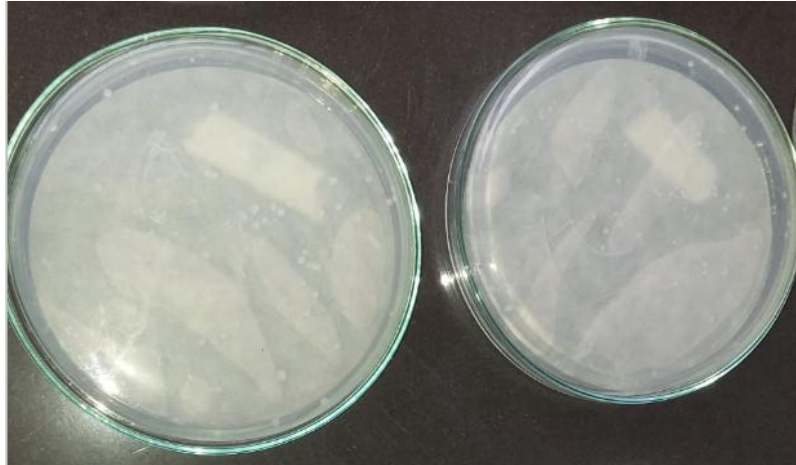
Blancos



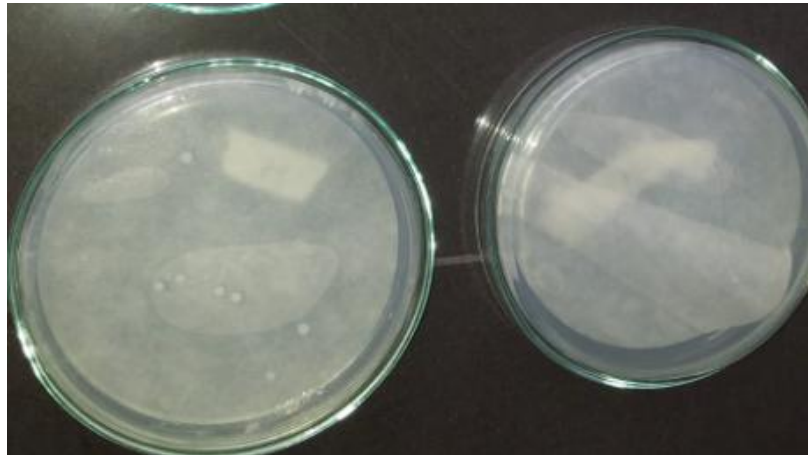
Dilución 10^{-1}



Dilución 10^{-2}



Dilución 10^{-3}



Dilución 10^{-4}

Figura 10. Bacterias degradadoras de gasolina por dilución en placa incubadas a temperatura ambiente por tres días.
Fuente: autores (2019)

Pasados tres días de incubación, se procedió al conteo de UFC en las cajas 10^{-3} , por medio de la técnica de “punteo”. Dando los resultados mostrados en la Tabla 1.

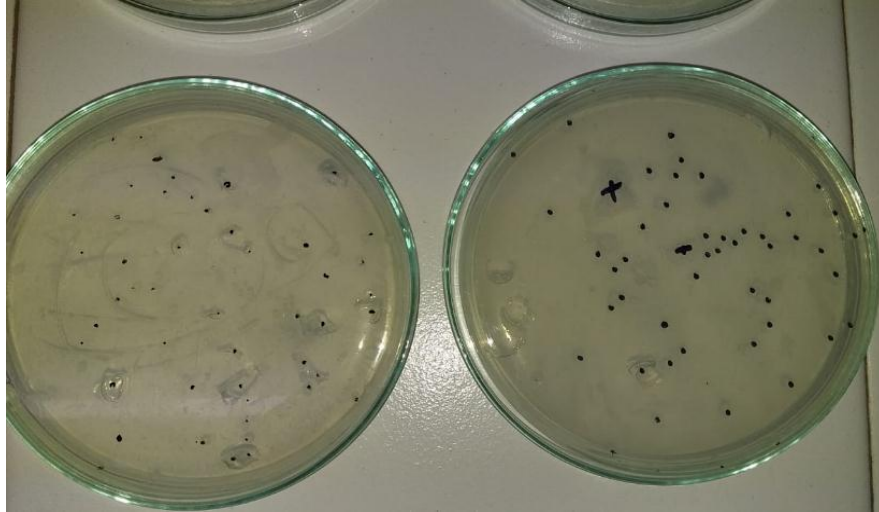


Figura 11. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en la caja 10^{-3}
Fuente: autores (2019)

$$\left(\frac{C1 + C2}{2} \right) * E.D$$

Donde:

$C 1, 2,$ = Total de colonias contadas en cada caja Petri

$E.D$ = Equivalente de la dilución en la que se realizó el conteo

$$\left(\frac{58+76}{2} \right) * 1000 = 6,7 \times 10^4$$

Dilución	Método empleado	Total UFC
-3	Punteo	6, 7x10 ⁴

Tabla 2. Resultado de cálculos de UFC
Fuente: autores (2019)

7.1.3. Aislamiento y purificación

Seguido al crecimiento bacteriano, al hacerle la tinción de Gram y caracterizar macroscópicamente la cepa, nos dimos cuenta que se trataba de la misma bacteria, ya que tenían el mismo tamaño, color elevación, superficie y la misma tinción de Gram, esto nos permitió confirmar decir que era un cultivo puro.

7.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DEL SUELO

Los resultados obtenidos se compararon con la tabla de interpretación de parámetros otorgada por el IGAC.

PARAMETROS	RESULTADO	UNIDADES	APRECIACION
Textura	F.A	clase	Franco arenoso
Arena	78	%	
Limo	10	%	
arcilla	12	%	
Humedad	2,14	%	
pH	7.8		(7.4-7.8) Medianamente alcalino
Materia orgánica	3,2	%	(2-5) medio
Nitrógeno	0,12	%	(0,10-0,20) medio
Fosforo	29	Mg kg ⁻¹	(16-40) medio
Potasio	0,46	Cmolc kg ⁻¹	>0,40 alto

Tabla 3. Resultado de análisis fisicoquímicos

Fuente: autores (2019)

Textura: La proporción relativa de las fracciones de arena, limo y arcilla que constituyen la masa del suelo es llamada textura del suelo. La textura del suelo tiene influencia sobre el movimiento y la disponibilidad de la humedad del suelo, la aireación y la disponibilidad de nutrimentos (Jaramillo, 2002).

Los porcentajes de distribución de las partículas del suelo obtuvieron los resultados registrados en la tabla 3, siendo este franco arenoso.

Humedad: La humedad es un factor importante porque actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula ya que forma parte de su protoplasma

bacteriano, este proceso es necesario para su crecimiento y desarrollo (Gómez, S., et al., 2008).

Potencial de hidrogeno (pH): Este parámetro es importante para la actividad enzimática y para el desarrollo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, el rango optimo está entre 6 - 8 unidades, para los procesos de biorremediación, Valores de pH inferiores a 6 unidades (ácidos) inhiben el crecimiento de la gran mayoría de los grupos microbianos, lo mismo pasa con valores mayores de 8 unidades (alcalinos) (Ritter, W., y Scarborough, 1995., Mehrasbi, M., et al., 2003., Vallejo, V., et al., 2005).

Se obtuvo un pH de 7.8 (ligeramente alcalino), siendo este óptimo para el desarrollo de microorganismos degradadores de hidrocarburo.

Materia orgánica: En la composición de la Materia Orgánica se encuentra un complejo número de macromoléculas en estado coloidal constituido por proteínas, azúcares, ácidos orgánicos, minerales, etc., en constante estado de degradación y síntesis. (García, E., et al, 2011).

La cantidad de materia orgánica obtenida en el suelo, se registra en la tabla 3, estando este en apreciación media.

Nitrógeno: La tasa de crecimiento de las plantas, generalmente, es proporcional a la tasa a la cual se provee el nitrógeno. El contenido de nitrógeno en los suelos varía en un amplio espectro, pero valores normales para la capa arable son del 0,2% al 0,7% (Costa & Ocete, s.f.).

La cantidad de nitrógeno obtenido en el suelo, se registra en la tabla 3, estando este en apreciación media.

Fosforo: El fósforo (P) interviene en la formación de compuestos energéticos dentro de las células y es requerido para la síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos en los procesos de reproducción y degradación (Gómez, S., et al, 2008).

La cantidad de fósforo obtenido en el suelo, se registra en la tabla 3, estando este en apreciación media.

Potasio: El Potasio (K) es requerido por una gran cantidad de microorganismos para catalizar diferentes reacciones bacterianas, interviene en procesos químicos dentro de las células y contribuye a mantener el agua en las células (Ríos, R., 2005).

La cantidad de potasio obtenido en el suelo, se registra en la tabla 3 estando este en apreciación alto.

7.3. CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS EN EL SUELO CONTAMINADO DE VILLANUEVA – GUAJIRA A ESCALA LABORATORIO.

7.3.1. Caracterización microscópica y macroscópica del crecimiento de las cepas puras cultivadas

En la figura 12 se muestran las vistas macro y microscópicas de la cepa pura encontrada.

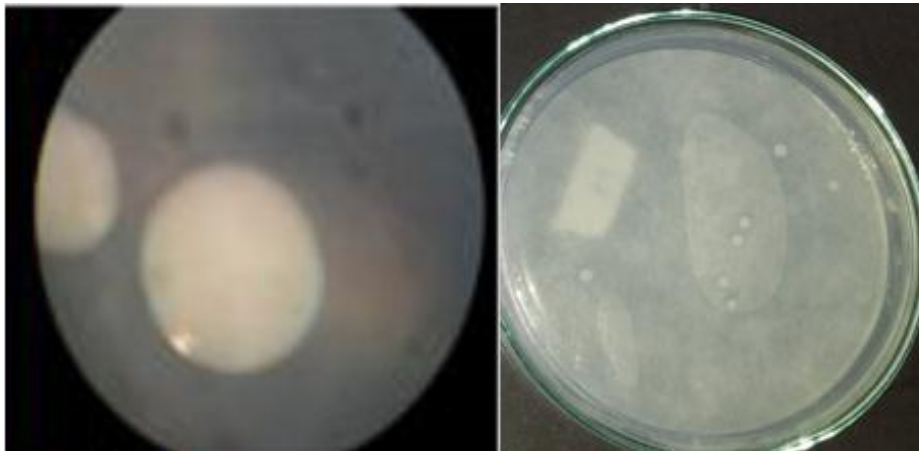


Figura 12. Vistas macro y microscópicas de la cepa.

Fuente: autores (2019)

En cuanto a la morfología, y con ayuda de la figura 4 las características macroscópicas de la colonia aislada es:

Característica	Colonia
Forma	Circular
Elevación	Elevada de aspecto liso
Margen	Entero
color	Blanco cremoso
Textura	Cremosa

Tabla 4. Características macroscópicas de la colonia
Fuente: autores (2019)

7.3.2 Tinción de Gram

Después de realizar el frotis y el procedimiento de coloración en la colonia pura, se pudo observar que la cepa es **Gram positiva** en forma de **coco**.

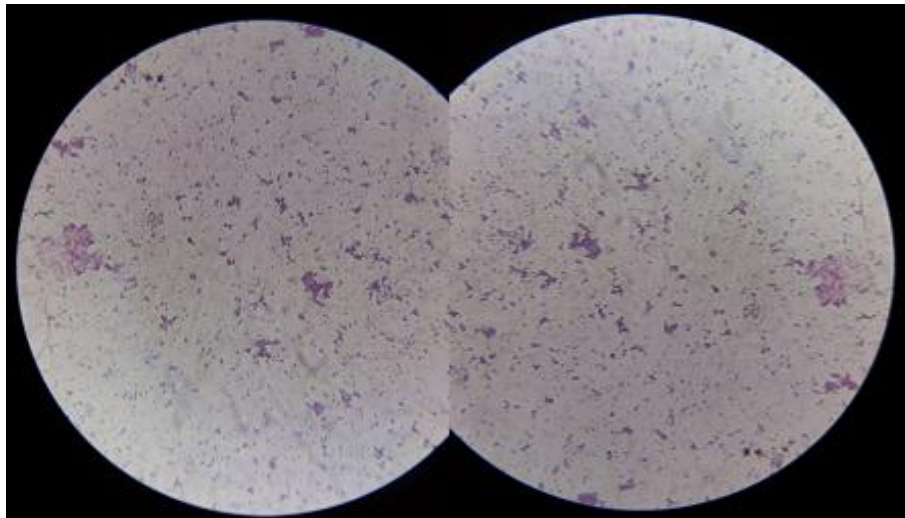


Figura 13. Tinción de Gram
Fuente: autores (2019)

7.3.3. Caracterización bioquímica de las bacterias

- **Prueba de TSI:**



Figura 14. Prueba de TSI
Fuente: autores (2019)

De acuerdo al resultado obtenido y basándonos en lo dicho por laboratorio Britania, 2010, la interpretación es la siguiente.

Superficie acida/profundidad acida (pico amarillo/fondo amarillo): el microorganismo fermenta glucosa, lactosa y/o sacarosa, además la presencia de burbujas indica que produce gas, siendo este facultativo inmóvil.

- **Prueba de Catalasa**



Figura 15. Resultado de la prueba de catalasa
Fuente: autores (2019)

Al observar la Figura 15 se puede ver que la cepa analizada da como resultado negativo a esta prueba.

- **Prueba de Hemolisis**

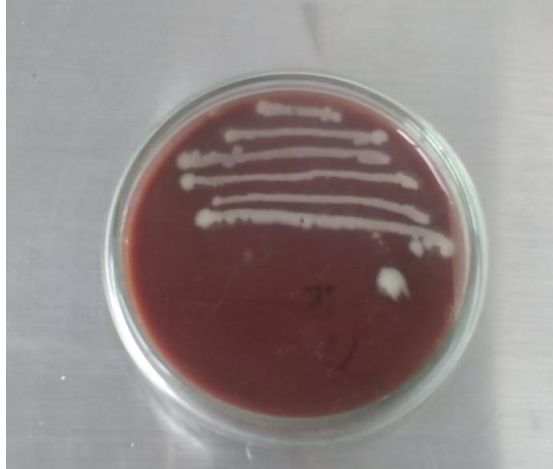


Figura 16. Resultado de la prueba de Hemolisis
Fuente: autores (2019)

Al observar la Figura 16 se puede ver que la cepa analizada según Ramírez et al (2013). Da como resultado Hemolisis Gamma o no Hemolisis, es decir que la bacteria no produce cambios en los glóbulos rojos.

- **Prueba de Bilis esculina**



Figura 17. Resultado de la prueba de Bilis esculina
Fuente: autores (2019)

Al observar la figura 17 observamos que la capa analizada presenta crecimiento, es decir que es positiva a esta prueba.

- **Prueba de Crecimiento en NaCl al 6.5%**



Figura 18. Resultado de la prueba de crecimiento en NaCl al 6.5%
Fuente: autores (2019)

Al observar la Figura 18 se puede ver que la cepa analizada da como resultado positivo, ya que se evidencia el crecimiento después de 48 horas de incubación.

- **Resultados de las pruebas bioquímicas**

PRUEBAS BIOQUÍMICAS						
	Gram	forma	Catalasa	Hemolisis	Bilis esculina	NaCl al 6.5%
CEPA	+	coco	-	Gamma	+	+

Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas
Fuente: autores (2019)

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas y comparándolos con la clasificación presentada en la figura 5 se concluye lo siguiente:

	GENERO	FAMILIA
CEPA	Enterococcus spp	Enterococcaceae

Tabla 6. Resultado de identificación de género de la bacteria degradadora de gasolina
Fuente: autores (2019)

- La cepa pertenece a la familia Enterococcaceae, género *Enterococcus*, los miembros del género *Enterococcus* son células esféricas u ovoides, de tamaño $0,6-2,0 \times 0,6-2,5 \mu\text{m}$. Son cocos grampositivos, no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no móviles, con excepción de las especies *E. gallinarum* y *E. casseliflavus*. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Fermentan un amplio rango de carbohidratos. Son catalasa negativos o, más comúnmente, débilmente positivos. Crecen usualmente en un caldo de cultivo a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, aunque el crecimiento óptimo es a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Pueden crecer a pH 9,6, con 6,5 % de NaCl y con 40 % de bilis. Usualmente fermentan la lactosa (Pérez et al, 2010).

7.4. RENDIMIENTOS DE LAS BACTERIAS EN EL SUELO CONTAMINADO

7.4.1. Respirometria

Después de pasar los siete días de incubación, se procedió a titular cada una de las muestras con sus respectivos blanco registrando los resultados en la tabla 7.

Muestras con sus respectivos blancos	Volumen de Hcl necesario para titular (ml)
0,5 ml de gasolina	1,6
blanco	2,6
1 ml de gasolina	2,0
blanco	2,7
1,5 ml de gasolina	2,3
blanco	2,8

Tabla 7. Resultado de la titulación

Fuente: autores (2019)

Luego de obtener los resultados de la titulación, se procedió a calcular la cantidad de CO₂ liberado en cada muestra.

Cálculos:

- ✓ **Mg de CO₂ = (V – B) NZ en 0,5 ml de gasolina**
Mg de CO₂ = (2,6 – 1,6) (1 N) (44,01) = 44,01 Mg

- ✓ **Mg de CO₂ = (V – B) NZ en 1,0 ml de gasolina**
Mg de CO₂ = (2,7 – 2,0) (1 N) (44,01) = 30,80 Mg

- ✓ **Mg de CO₂ = (V – B) NZ en 1,5 ml de gasolina**
Mg de CO₂ = (2,8 – 2,3) (1 N) (44,01) = 22,00 Mg

Muestras	Mg de Co2
0,5 ml de gasolina + 200 µL microorganismo	44,01
1 ml de gasolina + 200 µL microorganismo	30,80
1,5 ml de gasolina+ 200 µL microorganismo	22,00

Tabla 8. CO₂ liberado en cada uno de los tratamientos

Fuente: autores (2019)

Los resultados obtenidos en las tres muestras reportan una producción de CO₂, y basándonos en que La evolución de la Demanda Bioquímica de Oxígeno y la producción de CO₂ puede también constituir un indicador de la actividad de degradación que realizan los microorganismos (Balba *et al.*, 1998); podemos decir que *enterococcus spp* tiene el potencial para degradar la gasolina.

7.4.2. Cinética de crecimiento

Pasados los quince días, los datos de absorbancia obtenida en los días 3, 6, 9, 12 y 15 se registraron en la tabla 9.

Absorbancia	
Día 3	
Tubo 1	0,347
Tubo 2	0,310
Día 6	
Tubo 1	0,507
Tubo 2	0,407
Día 9	
Tubo 1	1,166
Tubo 2	0,574
Día 12	
Tubo 1	1,346
Tubo 2	0,972
Día 15	
Tubo 1	0,259
Tubo 2	0,253

Tabla 9. Absorbancia obtenida en los tubos
Fuente: autores (2019)

A pesar de que el microorganismo evaluado mostró crecimiento en ambos tubos, lo hizo de forma distinta ya que en los tubos 1 tuvo mayor crecimiento con respecto a los tubos dos, esto se debe a varios factores.

El incremento de la población microbiana a lo largo del tiempo es el resultado del Consumo de los hidrocarburos como fuente de carbono y energía. Este aumento de población puede visualizarse al medir la turbidez del medio (la densidad óptica) en el tiempo (Balba et al., 1998).

8. CONCLUSIONES

- Con esta investigación podemos concluir que, debido a la contaminación que tenía el recurso suelo por el derrame del hidrocarburo (gasolina), en el municipio de Villanueva – Guajira se pudo determinar la presencia de colonias de la familia Enterococcaceae, género Enterococcus en donde a través de los años y sin ayuda del hombre estas bacterias nativas han sobrevivido al contaminante, se encuentran presentes en la rizosfera y son capaces de degradar y de utilizar el hidrocarburo como única fuente de alimento.
- El hallazgo de las bacterias Enterococcus y las revisiones bibliográficas nos permiten deducir que estos microorganismos son capaces de mejorar o estimular el estado en el que se encuentra el suelo, ya que por su capacidad de degradar pueden remediar de alguna manera la contaminación encontrada. La biorremediación ha mostrado ser una alternativa eficiente, fácil de aplicar y de bajo costo para la recuperación de sitios potencialmente contaminados con hidrocarburos, el conocimiento de la micro biota autóctona y de las sucesiones biológicas que existen en el sitio del derrame, son herramientas invaluable en el restablecimiento de los ecosistemas alterados. (Sudarat et al., 2000).
- La recuperación del suelo a partir de microorganismos nativos que permiten la mejora del estado de dicho recurso ayuda a la contribución del ciclo biológico de las plantas y animales. Algunas bacterias contribuyen a resolver problemas de contaminación generados por el hombre, en este caso el mal uso de la gasolina, degradando la presencia de está aportando a la fertilidad del suelo, restaurando los ecosistemas, la fauna y flora presente en las zonas de muestro de la presente investigación. Por estas razones el estudio de las bacterias en ingeniería ambiental y sanitaria tiene gran importancia; en la presente investigación se observó que si hay presencia de estas colonias las cuales producen dióxido de carbono y degradan la mayor cantidad de

gasolina del suelo. Resolviendo algunos de los problemas de contaminación y desertificación generados por el hidrocarburo en el municipio de Villanueva – Guajira.

9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar de forma más amplia los microorganismos que se encuentran en el suelo muestreado antes y después del tratamiento, con el fin de establecer las comunidades o colonias de bacterias que puedan servir de ayuda en el proceso de biorremediación del suelo si se desea continuar con el proyecto.
- Para futuros trabajos, se puede realizar un análisis de cromatografía de gases para ser más exactos a la hora de la terminación de la bacteria que se encuentra en el suelo.
- Realizar un cultivo de plantas en el suelo que se quiere biorremediar luego de la aplicación de la bacteria y compararlo con un suelo que nunca haya presentado contaminación, para evaluar el crecimiento de las plantas en cada uno de ellos y ver qué tan eficiente fue el desarrollo de la investigación.
- Se desea promover y despertar la curiosidad a los espectadores de continuar o darle seguimiento a la investigación, debido a que esto fue a escala laboratorio y el objetivo principal es lograr biorremediar el suelo y poder ver los frutos de este proyecto.
- Con el fin de obtener resultados mas exactos al momento del crecimiento bacteriano es recomendable emplear tecnicas en donde se puedan conocer la cantidad de bacterias vivas y muertas en cada ensayo.

10. BIBLIOGRAFIA

- Acuña, A., Pucci, G., Morales, M. J., & Pucci, O. (2010). Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30, 29–36.
- Alcaldía de Villanueva la Guajira. (2002). Esquema de ordenamiento territorial departamento de la Guajira, municipio de Villanueva
- Alcaldía de Villanueva la Guajira. (2012-2015). Plan de desarrollo de Villanueva Guajira. "Villanueva está cambiando". .
- Alcaldía de Villanueva la Guajira. (2016-2019). Plan de desarrollo de Villanueva Guajira. "la oportunidad es para todos ".
- Benavides, J., Mesa, L. De, Quintero, G., Liliana, A., Vizcaíno, G., & Jaimes, D. C. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*, 4(5), 82–90. Disponible en http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/ARTREVIS1_5.pdf
- Cabrera, M., Herazo, G. T., Manzanillo, I. De, & Manzanillo, I. De. (2012). Aislamiento oligotróficos degradadores de hidrocarburos en la Bahía de Cartagena , 45(29).
- Caldwell, M. E., Garrett, R. M., Prince, R. C., Suflita, J. M., Olivera, N. L., Esteves, J., ... Pucci, O. (2009). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia Bioremediation in soil contaminated with hydrocarbons in Colombia. *Enzyme and Microbial Technology*, IX(3), 37,39. Disponible en <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2009.06.001>
- Cárdenas.(2012). uso de la respirometria en la evaluacion de cepas degradadoras de TNT. Disponible en <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8924>

Corona-Ramírez L., Iturbe-Argüelles R., (2005). Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. Ingeniería Investigación y Tecnología

Cotler, H., Sotelo, E., Dominguez, J., Zorrila, M., Cortina, S., Quiñones, L. (2007). La conservación de suelos: un asunto de interés público.

Escalante G. R. M., 2002. Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios. Tesis de maestría (Biotecnología). UNMSM, Lima, Perú.
Disponible en:

http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/tesis/Salud/Escalante_G_R/Escalante_G_R.htm

Fernández L. L. C., 2002. Atenuación natural de sitios contaminados con hidrocarburos. Memorias del Seminario Internacional de Manejo de Residuos, Ciudad de México

García, Y., & Ramírez, W. (2012). Indicadores de la calidad de los suelos : una nueva manera de evaluar este recurso Soil quality indicators : A new way to evaluate this resource, 35(2), 125–138.

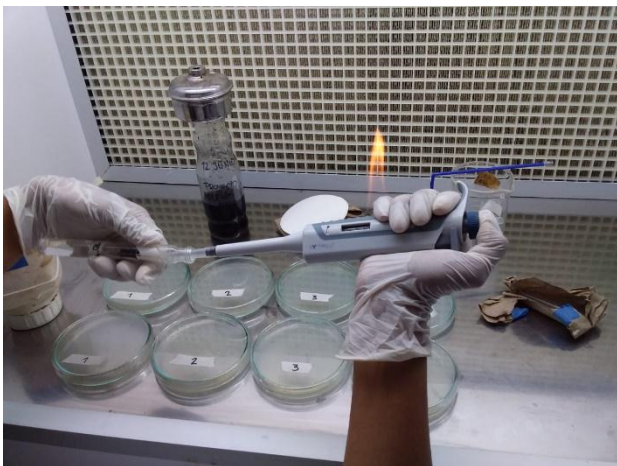
Martínez-Prado, A., Pérez-López, M. E., Pinto-Espinoza, J., Gurrola-Nevárez, B. A., & Osorio- Rodríguez, A. L. (2011). Biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alterna de nutrientes. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 27(3), 241–252.

Milena, S., Arroyave, S., Javier, F., & Restrepo, C. (2009). análisis de la contaminación del suelo : revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica * soil contamination analysis : a review of norms and economic regulation possibilities, (23), 13–34.

- Narváez-flórez, S., & Gómez, M. L. (2008). selección de bacterias con capacidad degradadora DE hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano, 37(1006), 61–75.
- Ortínez Brito, O., Ize, I., & Gavilán, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. disponible en <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Pucci, G. N., & Tonin, N. (2010). Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova , Argentina Diversity of culturable bacteria capable of degrading hydrocarbons from, 17(2), 237–244.
- Silva, P., María, R., Pozo, C., Miladis, I., Oca, G. M. De, Manuel, J., ... Moreno, C. (2016). Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo.
- (Rodriguez, 2014) Rodriguez, A. (2014). Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarbonoclastas del suelo contaminado del sur del estado de Veracruz., 1–92.
- Wilmer, D., Willianis A. (2016). Determinacion de la concentracion de calcio, fosforo, potasio presentes en el suelo destinados al cultivo de tomate. Disponible en <https://www.monografias.com/trabajos109/determinacion-concentracion-calcio-fosforo-y-potasio/determinacion-concentracion-calcio-fosforo-y-potasio2.shtml>
- Yanine, H. F. (2010). Evaluación de la diversidad de bacterias degradadoras de hidrocarburos aisladas de suelos de las cuencas de los ríos Otún y la Vieja., 1–122. disponible en <http://core.kmi.open.ac.uk/download/pdf/11052771.pdf>
- Lañez, E. (2005). Microbiología General. Recuperado de <https://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/12crecimiento.htm>

11. ANEXOS

ANEXO A. Trabajos realizados para la investigación





ANEXO B. Resultados de las pruebas físicas del suelo.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA - SEDE MEDELLÍN
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE GEOCIENCIAS

LABORATORIO DE FÍSICA Y CONSERVACIÓN DE SUELOS
A.A. 3840 Tels. 430 98 20 - 430 9317

Nombre:	Ana Isabel Puerta Amaya		
Dirección:			
Fecha recibo:	18/09/2019	Fecha de entrega:	23/09/2019

LOCALIZACIÓN Y DESCRIPCIÓN

Departamento:	La Guajira	Municipio:	Villa Nueva
Vereda:		Finca:	Cabecera Municipal

HUMEDAD GRAVIMÉTRICA EN BASE SECA

MUESTRA	Código Laboratorio de física de suelos	HUMEDAD %
Cabecera Municipal	AF5452	2,14

Analizó:

Director de Laboratorio: Ramiro Ramirez P.
Ingeniero Agrónomo M.Sc, PhD.



ANEXO D. Tablas de interpretación de análisis de suelo

Tabla de interpretación de análisis de suelos (Molina y Meléndez 2002).

		Bajo	Medio	Óptimo	Alto
pH		< 5	5 - 6	6 - 7	> 7
Ca	cmol/L	< 4	4 - 6	6 - 15	> 15
Mg	cmol/L	< 1	1 - 3	3 - 6	> 6
K	cmol/L	< 0.2	0.2 - 0.5	0.5 - 0.8	> 0.8
Acidez	cmol/L		0.3 - 1	< 0.3	> 1
S. A.	%		10 - 30	< 10	> 30
P	mg/L	< 12	12 - 20	20 - 50	> 50
Fe	mg/L	< 5	5 - 10	10 - 50	> 50
Cu	mg/L	< 0.5	0.5 - 1	1 - 20	> 20
Zn	mg/L	< 2	2 - 3	3 - 10	> 10
Mn	mg/L	< 5	5 - 10	10 - 50	> 50
B	mg/L	< 0.2	0.2 - 0.5	0.5 - 1	> 1
S	mg/L	< 12	12 - 20	20 - 50	> 50
MO	%	< 2	2 - 5	5 - 10	> 10
RELACIONES CATIONICAS		Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	(Ca+Mg)/K
		2-5	5-25	2.5-15	10-40

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI											
SUBDIRECCIÓN DE AGROLOGÍA - LABORATORIO NACIONAL DE SUELOS											
CONSIDERACIONES GENERALES PARA INTERPRETAR ANÁLISIS QUÍMICOS DE SUELOS											
pH (H ₂ O)	APRECIACIÓN	P mg Kg ⁻¹ (BRAY II)	K omol (+) Kg ⁻¹	C.O (%)			N.Total (%)			CIC omol (+) Kg ⁻¹	SATURACION DE BASES (SB) %
				CLIMA			CLIMA				
				FRÍO	MEDIO	CÁLIDO	FRÍO	MEDIO	CÁLIDO		
1:1											
<4.6	BAJO	<16	<0.2	<2.8	<1.7	<1.2	<0.25	<0.16	<0.10	<10	<35
EXTREMADAMENTE ÁCIDO	MEDIO	16 - 40	0.2 - 0.4	2.8 - 8.1	1.7 - 2.8	1.2 - 2.3	0.26 - 0.60	0.16 - 0.30	0.10 - 0.20	10 - 20	35 - 60
	ALTO	>40	>0.4	>8.1	>2.8	>2.3	>0.60	>0.30	>0.20	>20	>60
4.8 - 5.0											
MUY FUERTEMENTE ÁCIDO											
5.1 - 5.6	APRECIACIÓN	RELACIONES				CLASIFICACIÓN DE ACUERDO CON SALES Y SODIO	PORCENTAJE SATURACIÓN ACIDEZ INTERCAMBIABLE (S.A.I)	APRECIACIÓN			
		Ca/Mg	Mg/K	Ca/K	(Ca+Mg)/K						
FUERTEMENTE ÁCIDO	RELACIÓN IDEAL	2 - 4	3	8	10	CONDUCTIVIDAD ELECTRICA dS m ⁻¹	PORCENTAJE SATURACIÓN SODIO INTERCAMBIABLE (P%)	CLASE	<16	SIN PROBLEMAS EN GENERAL LIMITANTE PARA CULTIVOS SUSCEPTIBLES	
6.8 - 8.0					0 - 2	INFERIOR	NORMAL				
MEDIANAMENTE ÁCIDO	K DEFICIENTE		>18	>30	>40		2 - 4	A	LIMITE	16 A 30	LIMITANTE PARA CULTIVOS MODERADAMENTE TOLERANTES
8.1 - 8.6						4 - 8	S1				
LIGERAMENTE ACIDO	Mg DEFICIENTE	>10	<1			8 - 18	16%	S2	16 A 30	LIMITANTE PARA CULTIVOS MODERADAMENTE TOLERANTES	
8.8 - 7.3								S3			
NEUTRO	CONTENIDO OPTIMO	ELEMENTOS MENORES* (mg Kg ⁻¹)				>18	SUPERIOR	Na	30 A 80	LIMITANTE PARA CULTIVOS TOLERANTES	
7.4 - 7.8		Zn	Cu	Mn	Fe	0 - 4					
LIGERAMENTE ALCALINO	SUELO	3 - 8	1.5 - 3	15 - 30	20 - 30	4 - 8	A	NaS1	30 A 80	LIMITANTE PARA CULTIVOS TOLERANTES	
7.9 - 8.4						8 - 18		NaS2			
MEDIANAMENTE ALCALINO	PLANTA	30 - 100	5 - 25	30 - 200	80 - 600	>18	16%	NaS3	>80	NIVELES TÓXICOS PARA LA MAYORÍA DE CULTIVOS	
8.5 - 8.0											
FUERTEMENTE ALCALINO	*Extraíbles con DTPA en suelos; digestión húmeda en tejido vegetal.							ÁREA DE QUÍMICA			
>8.0	Boro en suelos (extraíble en agua caliente): 0.8 - 1.0 mg Kg ⁻¹ .										
EXTREMADAMENTE ALCALINO	Boro en tejido vegetal : 30-80 mg Kg ⁻¹ .										
NC(Nivel Crítico): 26 mg Kg ⁻¹ NO ₃ ; 20 mg Kg ⁻¹ NH ₄ ; 20 mg Kg ⁻¹ S disponible (Fosfato de calcio)											
CONCENTRACION NORMAL EN TEJIDO VEGETAL (Handbook of Reference Methods for Plant Analysis, 1988):											
N (%): 2.5-4.5; P (%): 0.20-0.75; K (%): 1.5-5.5; Ca (%): 1.0-4.0; Mg (%): 0.25-1.0; S (%): 0.25-1.0											
B (mg Kg ⁻¹): 10-200; Cu (mg Kg ⁻¹): 5-30; Fe (mg Kg ⁻¹): 100-500; Mn (mg Kg ⁻¹): 20-300; Zn (mg Kg ⁻¹): 27-100; Mo (mg Kg ⁻¹): 0.10-0.20; Cl (mg Kg ⁻¹): 100-500											

ANEXO E. Montaje de respirometria



ANEXO F. Espectrofotómetro genesys 20

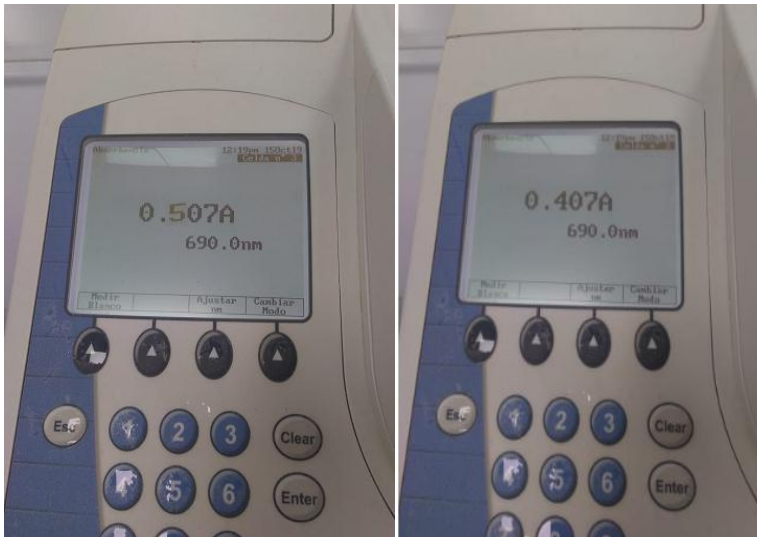


ANEXO G. Resultados de cinética de crecimiento

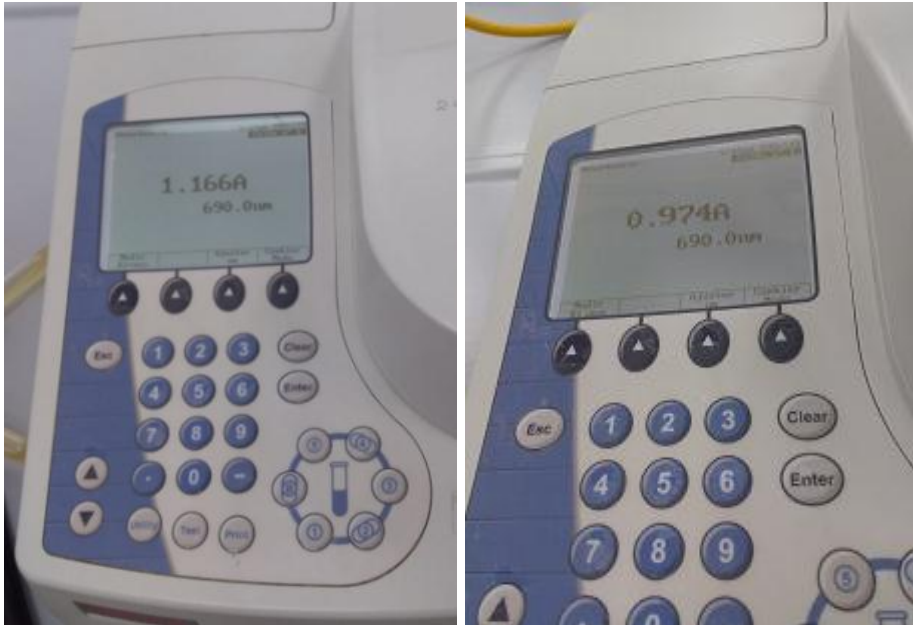
Día 3



Día 6



Día 9



Día 12



Día 15



ACEPTACIÓN

Nota de Aceptación

Director de Tesis

Jurado Evaluador

Jurado Evaluador

Fecha: _____

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecerle a Dios por permitirme cumplir una de las tantas metas trazadas, que con esfuerzo y sacrificio pude concluir, a mis padres GELBER GUERRA CHACON y NICOLASA RIVERA DURAN quienes con tanto esfuerzo y dedicación me apoyaron de manera constante y con tanta perseverancia.

Dedico este proyecto a mi Familia, Hermanos y Amigos que de forma directa o indirecta siempre estuvieron apoyándome para así llegar a este objetivo.

En el transcurso de este aprendizaje pude adquirir muchos conocimientos gracias a lo aportado por mi Director y Asesora, Alex Troya y Aslenis Melo. En lo general me llevo excelentes recuerdos de mi Compañera que tomadas de la mano hicimos posible esta investigación de forma satisfactoria.

Infinitas gracias a todos los que hicieron parte de esta investigación, y nunca me dejaron sola, ni siquiera en los momentos más difíciles.

Bienaventurado el hombre que persevera bajo la prueba, porque una vez que ha sido aprobado, recibirá la corona de la vida que el señor ha prometido a los que le Aman. (Santiago: 1:12).

Alejandra Guerra Rivera

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Es el único que lo puede todo, el que me mantuvo de pie cuando pensé rendirme, el que me brindó todas las herramientas necesarias para cumplir esta meta y que de una u otra forma puso personas en mi vida que me ayudaron en esta etapa.

A MIS PADRES

LUZ MARINA AMAYA Y RICARDO PUERTA, quienes me apoyaron en todo este proceso lleno de dificultades, por ellos y para ellos es este logro.

A MI TIA

Gracias a sus consejos, sus valores y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien.

A MIS FAMILIARES.

Primas, tío y hermanas por toda la atención prestada, ayuda y palabra de aliento.

Todo esto lo hice por ustedes y se lo dedico a ustedes

Ana Isabel Puerta Amaya