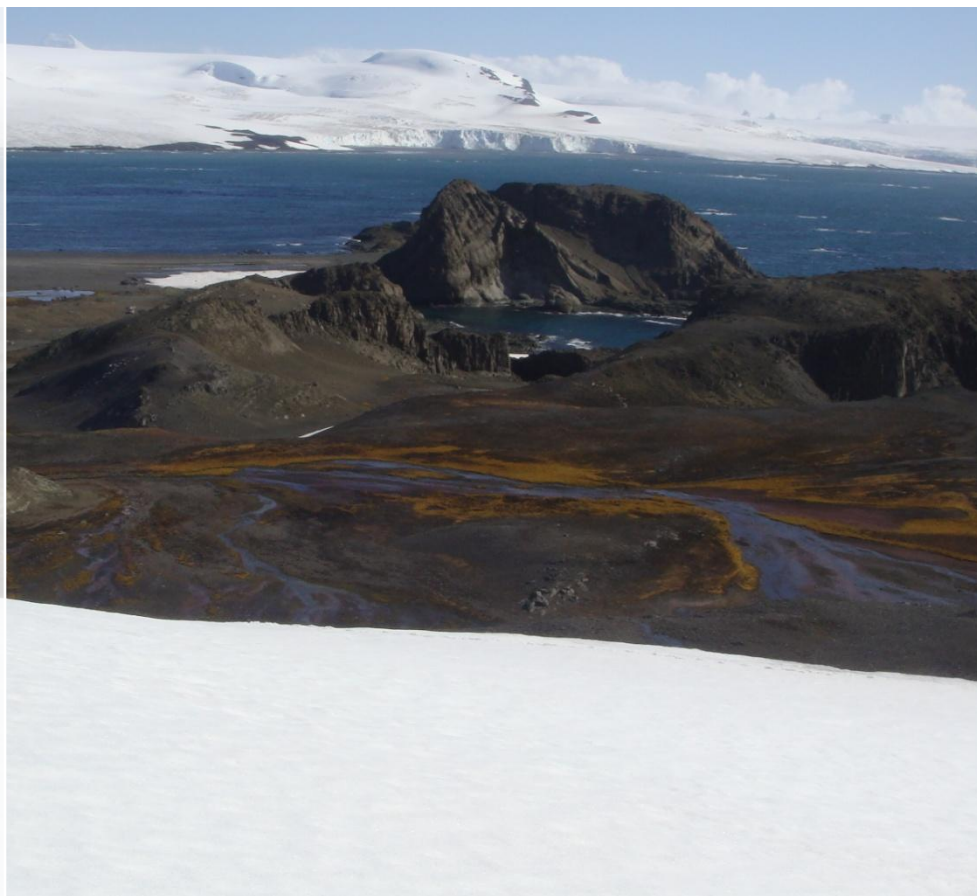


Biorremediación con microorganismos antárticos

Dr. Miguel Gualoto, Ing. Tania Oña

2012



La Antártida, el continente blanco, donde flamea glorioso el tricolor patrio, es el escenario donde se desarrolla la presente investigación, dirigida a la búsqueda, aislamiento y producción de microorganismos con capacidad para degradar hidrocarburos a bajas temperaturas



Programa Antártico de Investigaciones
Biotecnología aplicada
Biorremediación

Tabla de contenido

INFORME DE ESTADO DE LA INVESTIGACIÓN BACTERIAS ANTÁRTICAS CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR HIDROCARBUROS.....	3
1. ANTECEDENTES	3
2. JUSTIFICATIVOS	5
3. OBJETIVO	7
4. PRIMERA MISIÓN CIENTÍFICA.....	7
4.1. Metodología	7
5. SEGUNDA MISIÓN CIENTÍFICA.	13
5.1. Objetivo.....	13
5.2. Objetivos específicos.....	13
5.3. Metodología	13
5.4. Resultados	15
5.5. Conclusiones.....	18
6. TRABAJOS PENDIENTES	19
7. BIBLIOGRAFÍA	20

INFORME DE ESTADO DE LA INVESTIGACIÓN BACTERIAS ANTÁRTICAS CON CAPACIDAD PARA DEGRADAR HIDROCARBUROS

1. ANTECEDENTES

El Ecuador es un país de enorme diversidad biológica, cuyo potencial no ha sido valorado a plenitud y constituye la principal fuente de desarrollo futuro del país, una vez que los recursos naturales no renovables se hayan extinguido.

La explotación de recursos no renovables como el petróleo, es por hoy la principal fuente de recursos económicos para el desarrollo del Ecuador, sin embargo, también es la principal fuente de contaminación ambiental de los ecosistemas sensibles del país. Todas las actividades relacionadas con el petróleo aportan significativamente al problema de la contaminación.

A lo largo de 35 años de actividad petrolera se han generado enormes daños ambientales y también sobre la salud de la población (Las palabras de la selva. Carlos M. Beristáin, 2009), tanto que han motivado demandas internacionales contra las compañías petroleras causantes de dichos daños; este es el caso del juicio del Frente Amazónico, contra en consorcio Chevron-Texaco, las demandas por daños ambientales de la Red Amazónica por la Vida contra, Petroecuador, OXY y OCP.

Ahora en el siglo XXI, el recurso que otrora parecía inagotable; el agua; es cada vez más escaso. Los cambios globales del clima, la sobre explotación, el desmesurado incremento de la población y de las actividades productivas han reducido drásticamente las reservas mundiales del agua, poniendo en riesgo a millones de habitantes que hoy, ya sufren los efectos de su escases y mala calidad.

En el Ecuador los derrames de crudo son frecuentes, bien sea por la antigüedad del sistema de oleoductos, fallas humanas o por actos deliberados, por parte de ciertos grupos interesados como traficantes de tierras y combustibles, colonos y **empresas que viven de la “remediación ambiental.”**¹

La situación es compleja cuando los derrames ocurren en lugares altos como la cordillera oriental, donde las condiciones ambientales para la realización de los trabajos de limpieza, remediación y biorremediación son desfavorables.

Los procesos de biorremediación ambiental, deben por lo general ser desarrollados ***in situ*** requieren de temperaturas elevadas, que no se logran en dichos espacios. Los microorganismos que se emplean en biorremediación están adaptados a condiciones ambientales más benignas y se inhiben por completo o reducen su

¹ Comentarios del autor basados en su experiencia en calidad de perito ambiental.

metabolismo considerablemente, generando bajas tasas de biodegradación, prolongando los tiempos de tratamiento y reduciendo su efectividad.

Hasta la actualidad nada se ha realizado en relación a la implementación de trabajos reales de biorremediación en condiciones de altura. Se desconoce la existencia de cepas microbianas capaces de biodegradar hidrocarburos a bajas temperaturas, debido a la falta de programas de investigación, incentivos económicos y de políticas de estado, que estimulen la investigación científica

En este contexto se hace indispensable el desarrollo, identificación, aislamiento y reproducción de microorganismos capaces de biodegradar crudo, a bajas temperaturas. La participación en el programa Antártico de investigaciones, constituye una gran oportunidad para buscar a dichos microorganismos.

El aislamiento de la Antártida durante millones de años, seguramente habrá permitido el desarrollo de una micro fauna única y exclusiva completamente adaptada a sus condiciones ambientales. Se estima que en la Antártida, deben existir cepas microbianas que no han sufrido cambios sustanciales desde hace millones de años atrás, con capacidades metabólicas insospechadas. El poder estudiarlas y conocer su metabolismo, posibilitará encontrar cepas microbianas capaces de metabolizar hidrocarburos a bajas temperaturas, consecuentemente realizar trabajos de biorremediación de hidrocarburos en zonas del callejón interandino afectadas por derrames de crudo.

De fuentes confiables (Academia de Ciencias de la URSS, 1966), se conoce que en la estación antártica de la Federación Rusa, ubicada en la Isla Rey Jorge de las Shetland del Sur, hace algunas décadas atrás, se produjo un derrame considerable de bunker en los grandes tanques de almacenamiento de combustibles. En la actualidad apenas quedan vestigios del derrame. Ni la URSS ni ningún otro país ha realizado ningún trabajo de limpieza o remediación en la zona, sin embargo, en el verano ártico, se evidencia un cambio sustancial en las características de los suelos circundantes, cambios que solo pueden ser consecuencia de la presencia de actividad microbiana, que lentamente ha ido eliminando el hidrocarburo del suelo.

El potencial de la investigación, se sustenta con un estudio desarrollado por Argentina en las bases antárticas Jubany y Marambio, en las áreas de manejo de combustible, cuyos suelos se hallan crónicamente contaminados. Los suelos se tomaron de la capa superficial, hasta los 20 cm de profundidad. Los ensayos de contaminación aguda se realizaron utilizando suelos de las mismas áreas y contaminándolos con diferentes hidrocarburos puros o mezclas complejas según el objetivo de cada ensayo.

En los sistemas con biomagnificación, se utilizaron como inóculo, cepas y consorcios bacterianos psicrotolerantes aislados de suelos de las bases antes nombradas con una larga historia de contaminación con Gas Oil y/o JP1. Se utilizaron las siguientes cepas: ADH (*Rhodococcus* sp.), DM1-41 (*Stenotrophomonas*

maltophilia), MP2-4 (*Stenotrophomonas* sp.), M10dp (*Pseudomonas* sp.) y los consorcios bacterianos M10 y J13.

Todas las cepas y consorcios demostraron capacidad para utilizar distintos hidrocarburos (alifáticos y aromáticos) como única fuente de carbono y energía (Bej y col.2000; Mac Cormack, 1999, Margesin y Schinner 1997). Se evaluó la desaparición abiótica de hidrocarburos, la respuesta de la microflora autóctona a la presencia de los contaminantes (Aislabie y col. 2001), el efecto de la Bioestimulación con N y P y la biomagnificación con cepas y consorcios de bacterias psicrotolerantes con capacidad degradadora de hidrocarburos conocida.

Se realizaron recuentos en placa de microorganismos viables, se determinó la concentración de hidrocarburos totales por espectroscopia infrarroja (IR) y análisis cualitativo y cuantitativo de hidrocarburos por cromatografía gaseosa y espectrometría de masa (MS-GC).

En todos los ensayos se observó que las condiciones climáticas antárticas producen una importante eliminación abiótica de los contaminantes que osciló entre el 40% y el 60% de la carga inicial. Los ensayos en frascos mostraron que, cuando el suelo prístino fue sometido a una contaminación aguda con gasolina existió una significativa respuesta de la microflora autóctona (35% de remoción comparado con el control abiótico).

Sin embargo la presencia de un inóculo externo produjo una significativa reducción en la concentración final de los contaminantes (81,1% de remoción). Ensayos en bandejas utilizando suelo contaminado con un hidrocarburo aromático policíclico (fenantreno) mostraron resultados similares.

Cuando se analizaron suelos crónicamente contaminados en sistemas de bandejas, la flora autóctona fue muy efectiva en la remoción de hidrocarburos al ser bioestimulada con N y P (81% de remoción en 45 días). El sistema inoculado con un consorcio bacteriano aislado del mismo suelo a biorremediar (M10) mostró una remoción del 86%, mientras que un consorcio aislado de un suelo distinto (J13) mostró una baja eficiencia, similar a la mostrada por la flora autóctona sin bioestimar (62%). En todos los casos, la eficiencia de un sistema para eliminar los hidrocarburos se correlacionó con un incremento de la actividad biológica, observada como mayores valores de recuento de bacterias aerobias totales y fundamentalmente de bacterias degradadoras de hidrocarburos las cuales llegaron a representar más de un 90% de las cuentas totales.

2. JUSTIFICATIVOS

Con estos antecedentes la investigación tiene justificación, ambiental, económica, tecnológica, científica, social y política.

Ambiental.- Por la necesidad de recuperar amplias zonas contaminadas con derrames de hidrocarburos de la región interandina y en consecuencia proteger la flora y fauna además de las fuentes de agua que cada vez son más escasas, para garantizar la provisión de agua potable a la creciente población del Ecuador.

Económica.- la remediación y rehabilitación de dichos espacios, requiere de ingentes gastos y el consumo de energía, debido a las dificultades de acceso y condiciones climáticas extremas que presentan. La biorremediación con microorganismos adaptados a condiciones extremas, reduciría grandemente los costos operativos y acortaría significativamente los tiempos de tratamiento, que a su vez, permitiría un ahorro sustancial de recursos.

Tecnológica.- Creemos que es hora de que el Ecuador, desarrolle sistemas tecnológicos propios, que respondan a las necesidades del desarrollo del país y sean consecuentes con nuestros ecosistemas. El desarrollo de una tecnología de Biorremediación de bajas temperaturas, nos permitiría ofrecer servicios ambientales a todos los países andinos que presentan la misma problemática ambiental.

Científica.- Como consecuencia de la investigación, el Ecuador podría desarrollar ceparios de microorganismos especializados en degradar una amplia gama de contaminantes, dispondríamos de su identificación genética y de patentes biotecnológicas al servicio de los intereses del país.

Además se podría esclarecer los mecanismos bioquímicos de la adaptación microbiana a las condiciones extremas, cuyos principios, se los podría aplicar en la obtención de organismos genéticamente mejorados para el agro, agricultura y la Biotecnología.

Social.- Los problemas de la contaminación son socio ambientales, por cuanto afectan a los ciclos productivos y vivenciales de las comunidades y grupos sociales que habitan en las inmediaciones de los espacios degradados.

Al rehabilitar los espacios contaminados se resolverán los problemas de salud, producción, abastecimiento de agua y alimentos, que en forma conjunta contribuirán a mejorar la calidad de vida de la población, reduciendo los conflictos sociales y mejorando los espacios de diálogo como única estrategia viable de resolución de conflictos.

Política.- La Remediación y recuperación de espacios contaminados por las actividades humanas y productivas del sector público o privado, es y debe ser parte angular de la política del estado, en especial cuando los causantes son transnacionales, quienes deben respetar la legislación ambiental nacional vigente o en sus defecto operar tal como si lo hicieran en sus países de origen.

Por otro lado el estado Ecuatoriano como miembro del Tratado Antártico, debe participar en el quehacer científico de la Antártida, contribuir con investigaciones al desarrollo nacional y ejercer sus derechos sobre la Antártida, conforme a los acuerdos y convenio de cooperación antártica que ha suscrito.

El problema a resolver es: “La contaminación de las fuentes de agua y suelos de la alta sierra ecuatoriana, causada por derrames del sistema de oleoductos”.

Las técnicas disponibles en la actualidad son de tratamiento químico, físico y biológico de baja efectividad por las condiciones ambientales extremas de las mencionadas zonas.

El disponer de microorganismos, adaptados a condiciones extremas de temperatura y baja disponibilidad de nutrientes, es una gran oportunidad para resolver en forma definitiva y segura los problemas de la contaminación de páramos y zonas nevadas del Ecuador.

Está por demás detallar las ventajas y beneficios que esto trae, para la población, flora y fauna locales. Ahora cuando la nueva constitución concede derechos al ambiente, es cuando debemos en forma práctica y no retórica hacer realidad esos derechos.

3. OBJETIVO

Aislar, identificar microorganismos antárticos, con capacidad para degradar hidrocarburos y emplearlos en la biorremediación de suelos y fuentes de agua contaminadas, en las zonas altas del callejón interandino.

4. PRIMERA MISIÓN CIENTÍFICA

Participamos en la XIV Misión Científica a la Antártida, con el proyecto: “Búsqueda, aislamiento e identificación de Bacterias antárticas con capacidad para degradar hidrocarburos”

Basados en las informaciones disponibles, tomamos muestras en las estaciones de abastecimiento de combustibles de la Estación Maldonado, Estación chilena Arturo Prat (ubicada a 30 minutos de Maldonado), en Punta Ambato, aledaña a Maldonado y considerada como testigo. También se tomaron muestras en la estación rusa Belinshaussen de la Isla Rey Jorge, en el sitio donde se depositaron suelos contaminados por derrames de hidrocarburos.

4.1. Metodología.

La toma de muestras fue del horizonte superficial (hasta 20 cm), esto debido a que en el verano austral apenas unos pocos cm, se descongelan lo suficiente como para permitir la toma de muestras y el desarrollo de una actividad

microbiana intensa. Para tener una muestra representativa del área de ingreso a la sala de máquinas, de Maldonado, se tomaron sendas muestras de tres partes dentro del área de ingreso.

Mediante la metodología de cuarteo se tomó una muestra representativa, para su análisis y medición de parámetros básicos como: pH, conductividad, temperatura, además de efectuar siembras en agar nutritivo traído desde el continente en cajas petri.



Los parámetros de las muestras tomadas se midieron en el laboratorio de la base, con un equipo waterproof combo multiparámetro y se confirmaron los valores de conductividad con un conductímetro Hanna.

Medición de parámetros de las muestras in situ.

Muestra	pH	μS/cm	T solución °C	T ambiental °C
M1 Maldonado	6,05	248	16,6	-1,2
M2 Maldonado	6,18	199	16,0	-1,2
M3 Maldonado	5,3	145	16,2	-1,2
M4 Ambato	5,83	149	16,1	-0,5
M5 Prat	3,68	282	16,0	-0,8

Finalmente se realizaron las siembras de las muestras tomadas en agar nutritivo, agar sangre y agar chocolate, mediante la técnica de dilución en superficie.



Las colonias que surgieron a la semana de haberlas sembrado, fueron transportadas al Ecuador, para su procesamiento e identificación, en los laboratorios de la UDLA de la ciudad de Quito.

En Quito se logró identificar 33 cepas microbianas morfológicamente distintas, cuya variedad y diversidad fue presentada en la Primera conferencia antártica desarrollada en la UDLA el mes de abril del 2010.

Paralelamente se ejecutó un estudio comparativo de la diversidad microbiana antártica con la Andina. Para lo cual tomamos muestras de suelos del permafrost del nevado Antisana y de sus inmediaciones. Los resultados de este estudio fueron presentados en las Jornadas antárticas en la Universidad del Pacífico (Guayaquil), en julio del 2010.

Luego de concluir la relación con la UDLA, en el laboratorio personal, se continuaron con el estudio de la capacidad degradadora de hidrocarburos en los microorganismos antárticos. De las 33 inicialmente identificadas, nueve mostraron capacidad para asimilar hidrocarburos.

Las Pruebas se realizaron bajo 4°C (condiciones de cuarto frío), en medio mineral que disponía como única fuente de carbono, hidrocarburos aromáticos así como alifáticos. Todos los frascos que presentaron opacidad (formación de precipitados), fueron consideradas positivas.

Con las pruebas positivas, se montaron nueve celdas experimentales (terrarios),

METODOLOGÍA

La metodología de tratamiento empleada fue la de terrario, en bandejas de plástico de 20kg (un total de 10). Los suelos fueron tomados en las inmediaciones del nevado Antisana; y fueron limpiados de restos de materiales orgánicos; se sometieron a tratamiento térmico durante 60 minutos a 80°C, en un horno de mufla. Luego de su enfriamiento se tamizó

para eliminar el material pétreo e impurezas presentes con una malla 70 y se dispuso en las bandejas experimentales.

A los suelos se adicionó crudo de 18 grados API disueltos en acetona, en tal forma que los 20 kg de suelos estériles adquieran una concentración de 5000ppm en TPHs y 850 ppm en HAPs, conforme al análisis inicial de la composición del crudo empleado.

Entre las cepas identificadas que se emplearon en la biorremediación, podemos mencionar a: *Pseudomonas sp*, *Rhodococcus sp*, *Pseudomona putida*, *Bacillus sp*, *Clostridium perfringens*, *Aspergillum niger?*, *Penicillum Chrysogenum*, *Micrococcus antarticus?*, y *Sphingomonas sp*, las cuales según varias fuentes de consulta han mostrado la capacidad de degradar hidrocarburos. (Shivaji et al 1989; Logan et al.2004; Liu et al.2000; Miwa 1975, Arenz 2006).

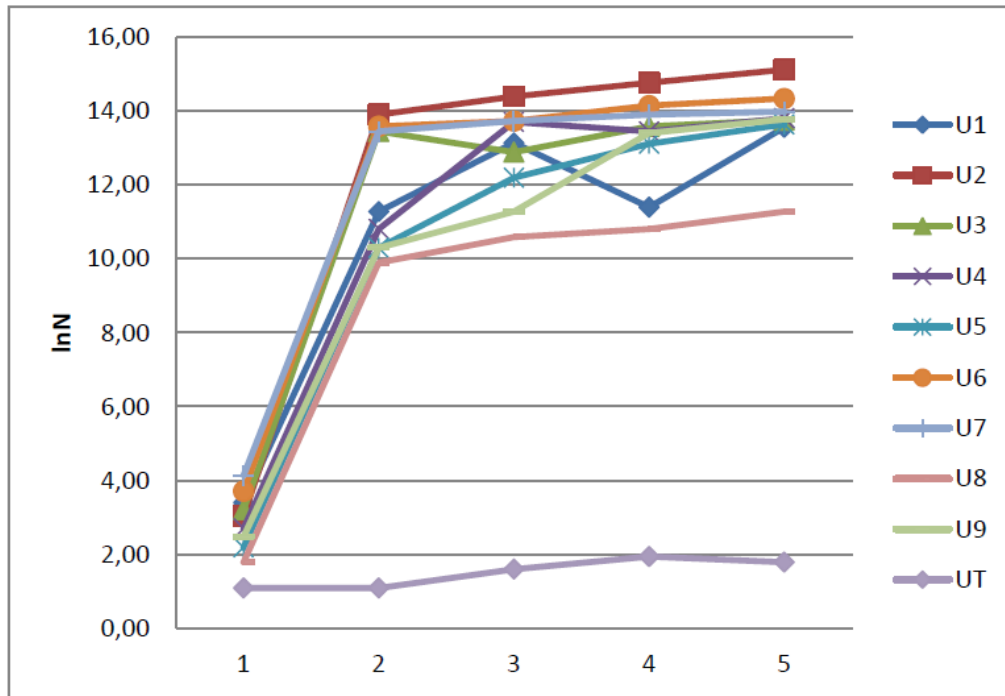
A continuación presentamos en forma breve los resultados obtenidos.

Tabla No1. Tasa de crecimiento específica.

CEPAS	48 horas	120 Horas	$\ln N_1$	$\ln N_2$	K
<i>Pseudomonas sp</i>	32	160	3,40	5,07	0,023
<i>Rhodococcus sp</i>	21	92	3,04	4,52	0,020
<i>Pseudomona putida</i>	25	112	3,21	4,71	0,0208
<i>Bacillus sp</i>	15	63	2,70	4,13	0,019
<i>Clostridium perfringens</i>	9	42	2,19	3,73	0,021
<i>Aspergillum niger</i>	41	85	3,71	4,44	0,010
<i>Penicillum Chrysogenum</i>	63	154	4,14	5,03	0,012
<i>Micrococcus antarticus</i>	6	41	1,79	3,71	0,026
<i>Sphingomonas sp</i>	12	43	2,48	3,76	0,017
Testigo	3	3	1,09	1,09	0,00

Fuente: Dr. Miguel Gualoto

Gráfico No.2 Variación de UFCs en las celdas experimentales durante las pruebas de biodegradación.



Fuente: Dr. Miguel Gualoto

Las curvas calculadas resultaron cercanas a la ideal para este tipo de procesos.

Tabla No.2 Variación de la concentración de TPHs

Variación de TPHs ppm						
Microorganismo	Celda	Muestra				
		I	II	III	IV	V
<i>Pseudomonas sp</i>	U1	5000	4629	3731	2978	2120
<i>Rhodococcus sp</i>	U2	5000	4896	4662	4132	3700
<i>Pseudomona putida</i>	U3	5000	4021	3657	2133	1867
<i>Bacillus sp</i>	U4	5000	4729	4119	3027	2630
<i>Clostridium perfringens</i>	U5	5000	4502	4194	3645	3112
<i>Aspergillum niger</i>	U6	5000	4679	4510	4467	4230
<i>Penicillum Chrysogenum</i>	U7	5000	4003	3729	2765	2079
<i>Micrococcus antarcticus</i>	U8	5000	4867	4622	4139	4002
<i>Sphingomonas sp</i>	U9	5000	4902	4762	4473	4137
Testigo	UT	5000	5000	4910	4890	4870

Fuente: Dr. Miguel Gualoto

Las cepas más eficientes para la degradación de TPHs, son: *Pseudomona putida*, *Penicillum Chrysogenum* y *Pseudomonas p.*

Tabla No.3 Variación de la concentración de HAPs

Microorganismo	Celda	HAPs ppm				
		Muestra				
		I	II	III	IV	V
<i>Pseudomonas sp</i>	U1	850	837	819	798	720
<i>Rhodococcus sp</i>	U2	850	652	387	105	78
<i>Pseudomona putida</i>	U3	850	812	779	721	720
<i>Bacillus sp</i>	U4	850	845	832	812	801
<i>Clostridium perfringens</i>	U5	850	827	814	802	798
<i>Aspergillum niger</i>	U6	850	721	413	156	94
<i>Penicillum Chrysogenum</i>	U7	850	691	396	138	97
<i>Micrococcus antarcticus</i>	U8	850	800	784	726	710
<i>Sphingomonas sp</i>	U9	850	770	625	251	112
Testigo	UT	850	850	847	844	840

Fuente: Dr. Miguel Gualoto

Las cepas con mayor eficiencia para degradar HAPs son: *Rhodococcus sp*, *Aspergillum niger*, *Penicillum chrysogenum* y *Sphingomonas sp*.

Tabla No.6 Eficiencia comparativa para degradar TPHs y HAPs.

Microorganismo	TPHs/%	HAPs/%
<i>Pseudomonas sp</i>	57,60	15,29
<i>Rhodococcus sp</i>	26,00	90,80
<i>Pseudomona putida</i>	62,60	15,29
<i>Bacillus sp</i>	47,40	5,76
<i>Clostridium perfringens</i>	37,76	6,11
<i>Aspergillum niger</i>	15,40	88,94
<i>Penicillum Chrysogenum</i>	58,42	88,58
<i>Micrococcus antarcticus</i>	19,96	16,47
<i>Sphingomonas sp</i>	2,60	86,82
Testigo	0	0

Fuente: Dr. Miguel Gualoto

Los resultados de esta investigación fueron presentados en la Conferencia antártica organizada por el IAEN- INAE en el hotel Quito, en Noviembre del 2011.

5. SEGUNDA MISIÓN CIENTÍFICA.

En la XVI Misión Científica a la Antártida, participamos con el tema: “Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos en la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado, mediante el empleo de cepas microbianas antárticas, en terrarios”.

5.1. Objetivo.

Degradar hidrocarburos con las cepas microbianas aisladas in situ, mediante pruebas de biodegradación (terrarios -bandejas de 20 kg), de suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos y aromáticos, bajo condiciones locales de la Estación Científica Pedro Vicente Maldonado.

5.2. Objetivos específicos

- Confirmar los datos obtenidos en la Misión XIV.
- Ampliar la búsqueda a otras zonas antes no muestreadas, tales como Barrientos y la isla Dee.
- Definir el tema, actividades y cronogramas de trabajo del proyecto binacional de biorremediación, el mismo que estará sujeto a la aprobación de las instituciones que brindan el soporte académico.
- Montar terrarios contaminados con hidrocarburos alifáticos y aromáticos, para evaluar la capacidad de los microorganismos para degradar hidrocarburos.

5.3. Metodología

- **Muestreo.** Las muestras tomadas fueron muestras compuestas de cinco submuestras. El método de toma fue mediante cuarteo. Se retiró en lo posible el material pétreo y materia orgánica presentes. La cantidad de la muestra fue un 1kg, al efecto se emplearon sobres de papel aluminio dentro de fundas sifloc. La profundidad de toma varió entre 12-15cm.
- **Laboratorio.** Los materiales se esterilizaron se lavaron, secaron y esterilizaron en el autoclave del laboratorio a la temperatura de 121°C durante 15 minutos. Se recuperó material usado por otras expediciones, en especial cajas petri de plástico, que fueron lavadas, secadas y desinfectadas mediante UV, de la cámara de flujo laminar del laboratorio durante 2 horas.

Los medios preparados disponibles fueron: Agar nutritivo, PDA y agar triple azúcar con Fe. Los medios fueron preparados en frascos boeco, y autoclaveados, para su posterior vertido en las cajas petri experimentales.

Las siembras se realizaron mediante diluciones, según metodología estándar, las diluciones destinadas a siembra fueron 10^{-1} y 10^{-2} ; no solo porque existe escases de materiales, sino también porque la cantidad de microorganismos presentes en suelos antárticos y del permafrost, son muy bajas.

También se hicieron siembras directas, para asegurar la posibilidad del surgimiento de colonias microbianas en los medios de cultivo.

Se realizaron cultivos a temperatura ambiente (la del laboratorio) y a 15 grados en un termostato calibrado.

Las muestras a temperatura ambiental se introdujeron en un cooler, para protección del personal operativo e investigadores, así como de los cultivos.

Pruebas de tratamiento in situ

Preparación de celdas de tratamiento

Seleccionar seis bandejas de plástico, impermeabilizarlas con ayuda de láminas de polietileno.

Tomar 20 kg de —suelo de las inmediaciones de la Estación Maldonado. No es factible por razones de tiempo y de logística esterilizar los suelos, así que los microorganismos que estén presentes en él no serán eliminados. En consecuencia la adición de microorganismos que haremos será una bioaumentación a los ya existentes en el suelo.

Los suelos serán contaminados intencionalmente con 15000 ppm de TPHs, esto es con diesel, y gasolina y con 5000 ppm HAPs, esto es benceno.

Para evitar la volatilización natural de los hidrocarburos las celdas experimentales se cubrirán con una lámina de polietileno.

GASOLINA: 300ml x 2 = 600ml/2 celdas

DIESEL: 300ml x 2 = 600ml/2 celdas

BENCENO: 100ml x 2 = 200ml/2 celdas

Preparación del medio de propagación.

Extracto del suelo: 100g en 900 ml de agua destilada. Autoclavear y retirar el sobre nadante. Adicionar 30 ml de solución de glucosa al 10%, 20ml de almidón al 10%, 5ml de ácido cítrico al 5%, 1,5 ml de solución de $MgSO_4$, $MnSO_4$, al 1% por cada 1000ml de solución.

Acidular con HNO_3 hasta un pH 6,5.

Inocular 1ml de cada colonia seleccionada, con una concentración estimada de 108 Ufcs.

Incubar durante 24 h a 15°C e inocular a razón de 15ml/kg de suelo, en cada una de las celdas experimentales.

Bioaumentación.

La inoculación se hará en cantidad proporcional a 25 litros/m³, obtenido en base a trabajos de biorremediación de campo en el Ecuador y/o en base a las pruebas de biorremediación experimentales con bacterias antárticas realizadas en el Ecuador, esto es 15ml/kg de suelo contaminado. (Collerman 1997, Coulon y Delille 2003, Cuningham y Philp 2000); aunque otros consideran innecesaria la aplicación de técnicas de biomagnificación (Ruberto y col. 2003).

5.4. Resultados

Tabla No2. Número de colonias por medio y por muestra a 15°C, diluciones 10⁻¹ y 10⁻².

15°C	MEDIO		
MUESTRA	AN	PDA	TS
B1	5	10	13
B2	7	0	15
M3	6	17	12
PA	1	0	7

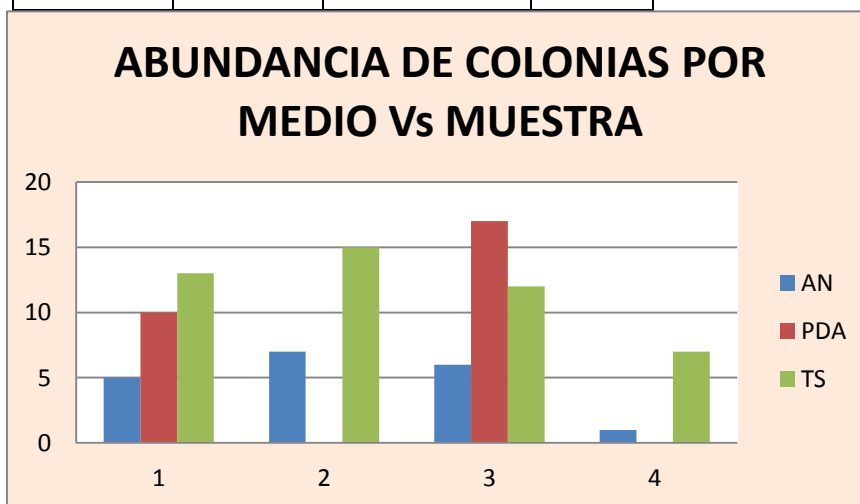


Tabla No3. Número de colonias por medio y por muestra a temperatura 15°C

S. DIRECTA	MEDIO		
MUESTRA	AN	PDA	TS
B1	36	37	16
B2	100	100	100
M3	8	75	7
PA	13	6	8

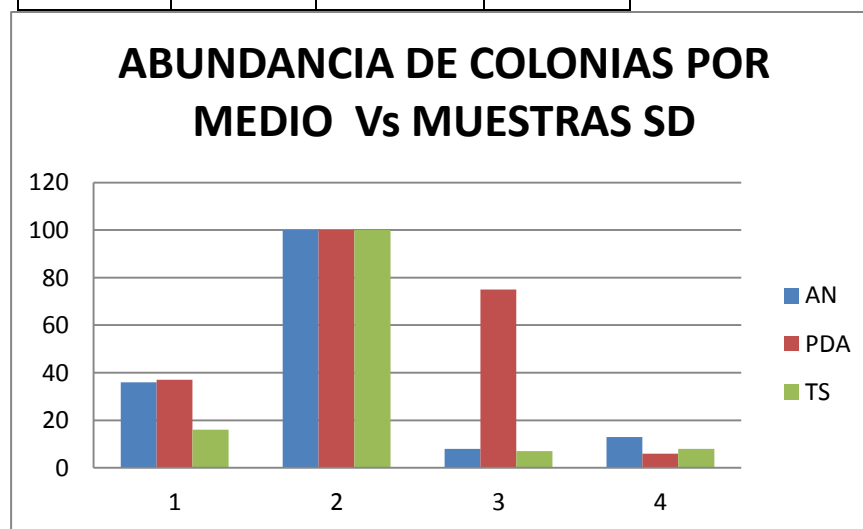


Tabla No4. Número de colonias por medio y por muestra a temperatura de 5°C, por diluciones.

AMBIENTE	MEDIO		
MUESTRA	AN	PDA	TS
B1	2	0	7
B2	6	1	9
M3	9	8	17
PA	0	0	0

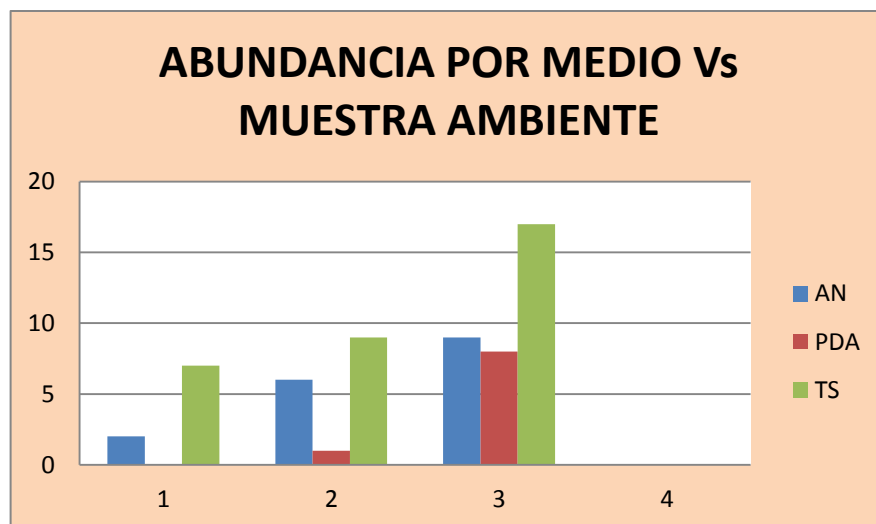


Tabla No6. Crecimiento comparativo de las siembras directas a las temepstras de 15°C y 5°C. Siembras directas

MUESTRA	15°C	AMBIENTE
B1	89	2
B2	300	24
M3	90	0
PA	27	11

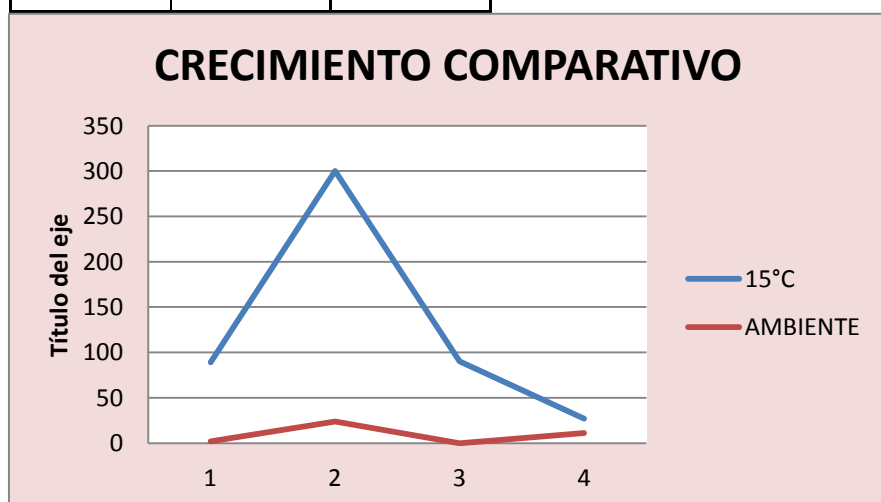
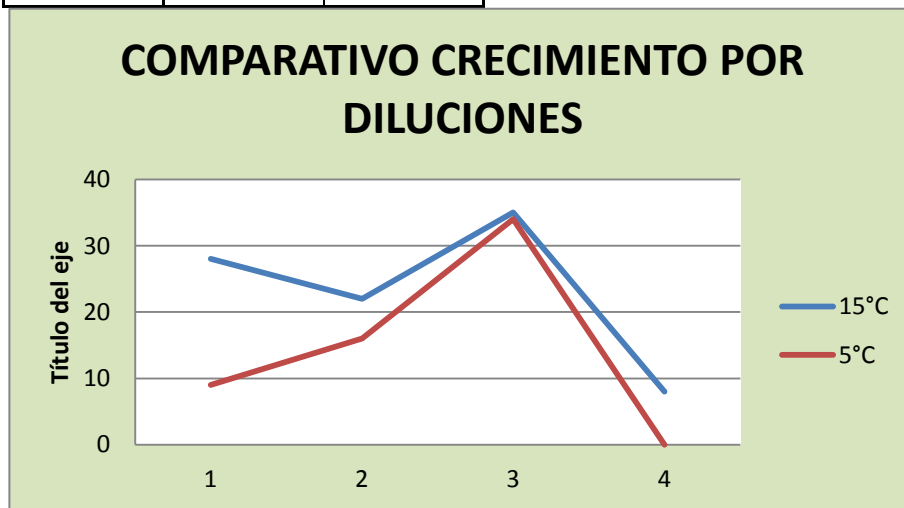


Tabla No7. Crecimiento comparativo siembras mediante diluciones a 15°C y a 5°C, por muestra.

MUESTRAS	15°C	5°C
B1	28	9
B2	22	16
M3	35	34
PA	8	0



5.5. Conclusiones

- Los microorganismos antárticos pueden crecer a temperaturas superiores a 5°C, así lo muestran los resultados, donde el crecimiento microbianos a 15°C es superior al obtenido a 5°C.
- En las siembras mediante diluciones, a temperatura ambiente 5°C y a 15°C, la muestra de Maldonado M3, fue la de mayor población, confirmándose parcialmente la influencia de la permanente afluencia de materia orgánica (micro derrames de hidrocarburos), que los mantiene activas.
- Punta Ambato por ser una zona libre de contaminación, con esporádica presencia humana, presenta la menor población en siembras mediante diluciones a ambas temperaturas.
- De las siembras directas a 15°C, la muestra de Barrientos B2, es la más abundante en colonias, en tanto que la muestra M3 de Maldonado ocupa el segundo lugar por abundancia de colonias. Con la muestra M3 no existe problema la interpretación, pero en relación a B2 sí, porque, es una zona libre de pingüinos y el acceso a ella por parte de turistas es casi nulo. Estimamos que se requieren confirmar estos datos mediante siembras en Ecuador.

- El medio que presento mayor abundancia de colonias fue TS, para siembras por diluciones a 15°C, en tanto que para siembras directas fue PDA.
- El medio de mayor abundancia para siembras a temperatura ambiente en siembras por diluciones fue TS, en tanto que para siembras directas AN.
- Se aislaron seis colonias morfológicamente distintas por su pigmentación: Crema. Blanca, amarilla, anaranjado, violeta, verde. Para la Antártida la pigmentación constituye un mecanismo protector contra la radiación UV.

6. TRABAJOS PENDIENTES

No	ACTIVIDAD	MES										
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
1	Pruebas bioquímicas	x										
2	Tinción de gram	x										
3	Identificación morfológica	x										
4	Pruebas API		x									
5	Confirmación de resultados		x									
6	Cinética de crecimiento		x									
7	Publicación de resultados preliminares			x								
8	Pruebas de biodegradación de hidrocarburos en laboratorio			x	x	x						
9	Pruebas de biodegradación de campo					x	x	x	x	x		
10	Publicación de resultados						x					
11	Rastreo de microorganismos andinos			x								
12	Identificación morfológica y bioquímica			x								
13	Pruebas de biodegradación de hidrocarburos				x	x						
14	Publicación de resultados						x	x				
15	Hibridación de microorganismos afines									x	x	x

16	Envío de microorganismos a Venezuela. Genética									x	x	x
----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	---	---	---

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Aislabie, J., Fraser, R., Duncan, S. y Farrell, R.L., 2001. Effect of oil spills on microbial heterotrophs in Antarctic soils. *Polar Biology*, 24, 308-313.
2. Lapage S. P., Shelton J. E., Mitchell T. G, Mackenzie A. R. Culture collections and the preservation of bacteria, p. 135—228. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons (eds.), *Methods in microbiology*, vol. 3A, Academic Press, London, 1970.
3. Onions A. H. S. Preservation of fungi, p. 113—159. In:
4. Rinfret A. P., LaSalle B. (eds.). Round Table Conference on the Cryogenic Preservation of Cell Cultures, p. 1—78, National Academy of Sciences, Washington, D. C, 1975.
5. Collerman, E., 1997. Uses of bacteria in bioremediation. In SHEENAN, D., ed. *Bioremediation protocols*. New Jersey: Humana Press, 3-22.
6. Coulon, F., y Delille, D., 2003. Effects of biostimulation on growth of indigenous bacteria in sub-Antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons. *Oil & Gas Science and Technology*, 58, 469-479.
7. Coe A. W., Clark S. P. Mon. Bull. Min. Health Public Health Lab. Serv., 25, 97—100 (1966).
8. Cunningham, C. J. y Philp, J.C., 2000. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination & Reclamation*, 8, 261-269.
9. Gualoto Miguel, Informe de Auditoría a trabajos de Biorremediación en la Laguna de Papallacta. Juicio EMAAPQ- Ecuavital. 2006. Perito; Miguel Gualoto. Pag: 7-12.
10. Gordon R. E., Ryneerson T. K. In: S. M. Martin (ed.), *Culture collections: perspectives and problems*, p. 118—128, University of Toronto Press, Toronto, 1963.
11. Gualoto Miguel. Informe Preliminar de la investigación Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos. FUNDEMAR- UDLA. 2010. Pag: 32 PDF.
12. Mac Cormack, W.P. 1999. *Selección, caracterización y evaluación del potencial biotecnológico de bacterias sicrotróficas degradadoras de hidrocarburos*. Ph.D thesis, University of Buenos Aires, 192 pp.
13. Margesin, R. y Schinner, F., 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in Alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2660-2663.
14. Ruberto, L., Vazquez, S.C. y Mac Cormack, W.P., 2003. Effectiveness of the natural bacterial flora, biostimulation and biodegradation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 52, 115-125.
15. Ruberto, Lucas1; Vazquez, Susana1; Lo Balbo, Alfredo2; Mac Cormack, Walter, pad: Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando bacterias antárticas sicrotolerantes. 32-34.
16. Whyte, L.G., Goalen, B., Hawari, J., Labbe, D., Greer, C.W. y Nahir, M., 2001. Bioremediation treatability assessment of hydrocarbon-contaminated soils from Eureka,

Nunavut. *Cold Regions Science and Technology*, 32, 121-132. (Registrar la bibliografía existente en la que se fundamentó la presentación del perfil de proyecto)

17. Baraniecki, C.A., J. Aislabie, and J.M. Foght. 2002. Characterization of *Sphingomonas* sp. Ant 17, an aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Antarctic soil. *Microbial Ecology* 43(1):44–54.

Dr. Miguel Gualoto

Investigador de FUNDEMAR

Ing. Tania Oña

Investigadora UTN