DEGRADACIÓN DE BIODIESEL Y DIVERSIDAD BACTERIANA EN SUELOS ARENOSOS DE UNA ZONA INDUSTRIAL (GUAYANILLA, PUERTO RICO)

Por Rogelinda E. Barraza Cabarcas

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En Biología

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ 2005

Aprobado por:

Carlos Ríos Velázquez, Ph.D. Miembro, Comité Graduado

José A. Colucci, Ph.D. Miembro, Comité Graduado

Arturo Massol Deyá, Ph.D. Presidente, Comité Graduado

Baqar R. Zaidi, Ph.D. Representante de Estudios Graduados

Lucy Bunkley Williams, Ph.D. Directora del Departamento Fecha

Fecha

Fecha

Fecha

Fecha

ABSTRACT

Biodegradation of biodiesel from an industrial impacted sandy soil (Guayanilla Bay, Puerto Rico) and bacterial diversity was evaluated. Soil samples were amended with 2,500 mg/Kg of biodiesel and incubated during 41 days in laboratory conditions. Biodegradation by natural attenuation and enhanced of biodegradation by biostimulation with inorganic nutrients were examined. In addition, degradation of regular diesel (1,500 mg/Kg) and a mixture of diesel with biodiesel were examined. The biodegradation was measured by CO₂ evolution (EPA 560/82-003) and gas chromatography method (EPA 8015B). The bacterial diversity of culturable bacteria populations was determinate by carbon utilization profiles (Biolog[®]), ability to use biodiesel as the sole carbon source and molecular techniques including amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and 16S rDNA sequence analysis. Gas chromatography showed partial removal of biodiesel (80%) and diesel (57%) in the natural attenuation treatment. The CO₂ evolution indicated that both rate and extent of biodiesel mineralization is greater than diesel indicating that biodiesel is more biodegradable. The removal of either diesel or biodiesel was enhanced after inorganic nutrient addition. A total of 36 bacterial populations were isolated of 26 distinctive genetic and physiological groups. Only 50% (18/36) of all bacterial populations grew in a medium with biodiesel constituents as sole carbon source. In general, the community was dominated mainly by gram positive bacilli. Sequence analysis of the 16S rDNA showed close relation with Bacillus thuringiensis, B. subtilis, B. megaterium, Paenibacillus latus and Micrococcus luteus, of the Firmicutes and Actinobacteria divisions which are widely recognized to be known hydrocarbon degradaders in the environment.

RESUMEN

La biodegradación de biodiesel en suelos arenosos impactados industrialmente (Bahía de Guayanilla, Puerto Rico) y la diversidad bacteriana presente en el proceso de degradación fue estudiada. Muestras de suelo fueron contaminadas con 2,500 mg/Kg de biodiesel e incubadas durante 41 días en condiciones de laboratorio. Se comparó la degradación en tratamientos de atenuación natural y bioestimulación con nutrientes inorgánicos. Adicionalmente se examinó la degradación de un diesel comercial (1,500 mg/Kg) y de una mezcla de diesel con biodiesel. La biodegradación se midió por medio de la evolución de CO₂ (EPA 560/6-82-003) y cromatografía de gas (EPA 8015B). La diversidad bacteriana fue determinada por Sistema Biolog[®], crecimiento en biodiesel como única fuente de carbono y técnicas moleculares que incluyeron análisis de restricción del 16S rDNA amplificado (ARDRA, por sus siglas en inglés) y secuenciación de 16S rDNA. Los análisis de cromatografía de gas mostraron una remoción parcial de biodiesel (80%) y diesel (57%) en tratamientote atenuación natural. La evolución de CO₂ indicó que la mineralización de biodiesel fue superior a la del diesel demostrando que el biodiesel es más biodegradable. La remoción de biodiesel y diesel fue completa con el tratamiento de bioestimulación demostrando que la adición de nutrientes ejerce un efecto positivo en la biodegradación. Un total de 36 poblaciones bacterianas fueron aisladas de 26 grupos genéticos que presentaron diversidad fisiológica entre sus miembros. Solo el 50% (18/36) de las poblaciones crecieron en medios suplementados con biodiesel como única fuente de carbono. En general la comunidad estuvo constituída principalmente por bacilos gram positivos, el análisis de secuencias de 16S rDNA mostraron estrecha similitud con Bacillus thuringiensis, B. subtilis, B. megaterium, Paenibacillus latus, y Micrococcus luteus de las divisiones Firmicutes y Actinobacteria las cuales son conocidas ampliamente por tener miembros degradadores de hidrocarburos en el ambiente.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a los seres más importantes de mi vida:

A Dios Todo Poderoso que es mi amparo y la fortaleza de mi vida. ¡Para el siempre sea la gloria!

A mis padres César y Bolivia a quienes amo con toda mi alma, a ellos por su amor y su esfuerzo. A mis hermanos: Indira, Bladimir, César y Víctor Hugo, por su amor y su apoyo en todas las situaciones. A mi hijo Eduardo Andrés quien le da color a mi vida y es mi motivación para seguir adelante. A mis tías y demás familiares que me han dado su cariño en momentos buenos y malos y finalmente a Paola y Francisco por brindarme su amistad y su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mi consejero Dr. Arturo Massol Deyá, por su guía y apoyo en la realización de mi trabajo y por la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación.

Al Dr. José A. Colucci, por su apoyo técnico y por brindarme las facilidades de su laboratorio para la realización de algunos análisis químicos. Al Dr. Carlos Ríos Velázquez por su guía en la revisión del manuscrito y por hacer parte de esta investigación.

A la Dra. Mildred Zapata, de la Facultad de Ciencias Agrícolas por permitirme el uso del sistema Biolog[®], por su guía y ayuda en la obtención de datos en este sistema. A la MSc. Elba Díaz (Química), por su guía en el manejo de algunos equipos, a la MSc. Gladys Toro por sus consejos que me facilitaron una mejor ejecución de los diferentes métodos de biología molecular que forman parte de este trabajo.

A los estudiantes: Mónica Ospinal (Ing. Química), Enid Rodríguez, Silvia Ara y Ernie Pérez (Biología), quienes me brindaron apoyo técnico en algunas etapas de mi trabajo.

A mis grandes amigos Paola Bracho y Francisco Puerta, por apoyarme en momentos difíciles. A la MSc. Magali Zapata, por su amistad y su colaboración en mi trabajo como ayudante de cátedra, al Dr. Carlos Betancourt por sus consejos y su apoyo al inicio de mis estudios, a la Dra. Mónica Alfaro y la Sra. María Méndez, por su cooperación y apoyo valioso en todo momento.

A mis compañeras de laboratorio y todos mis amigos del Departamento de Biología con quienes he compartido las gratas experiencias y también las dificultades en nuestro diario vivir como estudiantes de maestría.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	ii
RESUMEN	. iii
DEDICATORIA	. iv
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDO	. vi
LISTA DE TABLAS	vii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Área de estudio	11
Experimento de biodegradación	11
Análisis microbiológico	15
Caracterización fenotípica	16
Tipificación genética	18
RESULTADOS	22
Propiedades del suelo	22
Biodegradación de biodiesel	22
Análisis de TPH	22
Densidad bacteriana	26
Diversidad bacteriana	30
DISCUSIÓN	36
Diversidad y abundancia bacteriana	39
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA	47
APÉNDICE	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Comparación entre características físicas y químicas de biodiesel y diesel (USDOE, 2000).	6
Tabla 2: Descripción de los tratamientos empleados para evaluar la degradación de biodiesel y diesel.	12
Tabla 3: Propiedades físicoquímicas de los suelos utilizados en este estudio	22
Tabla 4: Remoción de TPH de biodiesel y diesel después de 41 días de tratamiento	23
Tabla 5: Mineralización biodiesel y diesel en 41 días de incubación. El CO ₂ neto se refiere al producido por mineralización del combustible.	24
Tabla 6: Densidad bacteriana cultivable (NMP/g de suelo) durante el tratamiento de degradación de biodiesel y diesel.	26
Tabla 7: Análisis de las secuencias del 16S rDNA de 9 cepas aisladas de suelos contaminados con biodiesel	34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la trans-esterificación de los triglicéridos de aceite de soya para la obtención del biodiesel
Figura 2: Diseño de matraz biométrico usado para medir la mineralización de biodiesel y diesel
Figura 3: Representación gráfica de la inoculación en un plato de agar para la enumeración por el Número Más Probable
Figura 4. Curva de mineralización de sistemas expuestos a biodiesel y diesel 25
Figura 6: Comparación entre el crecimiento bacteriano (bact/g de suelo) y mineralización (µmoles de CO ₂) en suelos contaminados con biodiesel y diesel mediante tratamiento de atenuación natural y bioestimulación
Figura 7: Comparación entre el crecimiento bacteriano (bact/g de suelo) y la mineralización (µmoles de CO ₂) en suelos contaminados con biodiesel y diesel en sistemas expuestos a un solo combustible (SB y SD) y en sistemas expuestos a la mezcla (SBD)
Figura 8: ARDRA de 4 cepas cortado con <i>Hae</i> III (carriles 1 al 4), <i>Hinf</i> I (carriles 5 al 8) y <i>Rsa</i> I (carriles del 9 al 12). M: marcador (pGEM). A la derecha se muestra el tamaño en pb del marcador
Figura 9: Análisis de grupo de patrones ARDRA de 36 cultivos bacterianos presentes en el proceso de biodegradación de biodiesel y diesel
Figura 10: Dendograma de cepas degradadoras de biodiesel, basado en Biolog [®] GP, GN
Figura 11: Árbol filogenético de cepas degradadoras de biodiesel

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice 1: CO ₂ (µmoles) acumulados durante el tratamiento de degradación de biodiesel y diesel.	. 56
Apéndice 2: Tabla del Número Más Probable utilizado para estimar la densidad bacteriana.	. 57
Apéndice 3: Características de las cepas aisladas de los suelos contaminados con biodiesel y diesel.	. 58
Apéndice 4: Perfil de utilización de Fuentes de carbono de 22 cepas analizadas por Biolog [®] .	. 61

INTRODUCCIÓN

El *Alkyl-éster* conocido comercialmente como biodiesel, es producto de la tranesterificación de un aceite vegetal o grasa animal con un alcohol en presencia de un álcali como catalizador. Para su obtención se utilizan aceites vegetales de diferentes fuentes como la soya, palma, canola, arroz y girasol, entre otros (Lang *et al.*, 2001) así como aceites residuales de frituras obtenidos en restaurantes disminuyendo costos de producción. Para la reacción, el aceite es mezclado con un alcohol que puede ser etanol, metanol o butanol y se adiciona hidróxido de sodio o de potasio como catalizador. El producto es llamado *butyl, etyl* o *metyl éster* según el alcohol utilizado.

En muchos países europeos como Francia, Austria, Germania, Suecia, Italia, Bélgica, Hungría y República Checa se comercializa el biodiesel desde 1989 (Staat y Vallet, 1994; Cvengros y Povazanec, 1996). Actualmente se distribuye ampliamente en Europa y Estados Unidos. Numerosos estudios han demostrado las ventajas del uso del biodiesel en el funcionamiento de motores diesel (Agarwal. 2005; Antolin *et al.*, 2002; Peterson y Reece, 1996; Serdari *et al.*, 2000) mientras la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), lo considera como combustible puro o mezclado aprobado legalmente para uso comercial (Peterson y Reece, 1996). Por sus características químicas y la baja contaminación ambiental que genera su combustión, se proyecta como una prometedora fuente de energía renovable sobre todo para los países donde las reservas de combustibles fósiles son escasas.

Hasta el momento el único estudio de biodegradabilidad de biodiesel es el reportado por Zhang y colaboradores (1998). Después de investigar la degradación de varios tipos de biodiesel y compararlos con la degradación de un diesel comercial así como mezclas de diesel con biodiesel, los investigadores concluyeron que el biodiesel es fácilmente biodegradable en ambientes acuáticos, y su biodegradabilidad es mayor que la del diesel comercial. También sugieren, que la mezcla realza la biodegradación del diesel. Debido a que el biodiesel promete ser un excelente sustituto del diesel de petróleo, estudios de biodegradabilidad en ambientes naturales son importantes con el fin de evaluar su tiempo de descomposición y los aspectos fisicoquímicos limitantes en su degradación en caso de accidentes durante su almacenamiento y transporte.

Entre los métodos disponibles para estudiar la biodegradabilidad de un compuesto está el examen de la evolución de CO_2 en matraces biométricos. Este método se basa en el principio de que bajo condiciones aeróbicas y adición de nutrientes, los microorganismos pueden metabolizar una sustancia hidrocarbonada a dos productos finales: CO_2 y agua (Lyman *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1998). El CO_2 es un indicador presuntivo de que la sustancia se ha oxidado completamente (Atlas y Bartha, 2002).

Otra importante herramienta con la que se puede realizar una determinación directa de la desaparición de un substrato (degradación primaria) es la cromatografía de gas (GC) y usualmente involucra el uso de un solvente de extracción tal como cloruro de metileno o hexano.

La optimización de procesos para remediación biológica de contaminantes en los suelos es de importancia práctica para disminuir el tiempo de remediación y economizar costos de tratamiento (Losser *et al.*, 1998). Dado que la tasa de degradación microbiana de hidrocarburos en suelos es afectado por varios parámetros fisicoquímicos y biológicos, en esta investigación se propuso estimar la rapidez de descomposición de un biodiesel comercial y su tasa de mineralización en un suelo arenoso impactado industrialmente bajo condiciones naturales (Atenuación natural), y mediante estimulación con nutrientes (Bioestimulación). Además se determinó la diversidad bacteriana de los suelos después de la contaminación con biodiesel y se identificaron cepas bacterianas (cultivables) degradadoras para su posible uso como inoculantes biológicos en procesos de biorremediación.

Debido a que el biodiesel es distribuido comercialmente mezclado con diesel, otro de los objetivos del estudio es evaluar la degradabilidad del diesel en estado puro y mezclado con biodiesel. De esta manera comparar la biodegradabilidad de los dos combustibles y determinar los efectos que causa la mezcla en la degradación en un suelo arenoso con historial de impactos industriales.

OBJETIVOS

- Evaluar la degradación de biodiesel por atenuación natural y bioestimulación en un suelo arenoso con historial de impactos industriales.
- Comparar la biodegradabilidad de biodiesel y diesel en estado puro y en mezcla.
- Determinar la diversidad bacteriana del suelo después de la exposición al biodiesel e identificar cepas bacterianas degradadoras para su posible uso como inoculantes biológicos en procesos de biorremediación de hidrocarburos.

REVISIÓN DE LITERATURA

Biodiesel hace referencia al éster producido en la trans-esterificación de un aceite vegetal con un alcohol que generalmente es etanol o metanol, utilizándose como catalizador NaOH ó KOH (Lang *et al.*, 2001). El alcohol más comúnmente usado es el metanol debido a su bajo precio. Dentro de las materias primas usadas están los aceites vegetales de soya, palma, canola, arroz, colza y girasol entre otros (Lang *et al.*, 2001), también se ha utilizado grasa animal residual de frituras en restaurantes con lo cual se reducen costos de producción.

Químicamente la transesterificación rompe la molécula del aceite vegetal convirtiéndose así en un *Metil alcohol éster* o *Etil alcohol éster* (según el alcohol utilizado) más glicerina muy utilizada en la industria farmacéutica. La glicerina se separa del éster por decantación para finalmente someter el biodiesel a un proceso de limpieza (Mohamad *et al.*, 2002). Un esquema de la reacción se presenta en la figura 1.



Figura 1: Esquema de la trans-esterificación de los triglicéridos de aceite de soya para la obtención del biodiesel. Obtenido de Technical Handbook for Marine Biodiesel (http://www.cytoculture.com/Biodiesel%20Handbook.htm).

El uso del biodiesel en motores diesel permite reducir substancialmente emisiones de dióxido de carbono, óxido de carbono y material particulado. Por no contener hidrocarburos aromáticos, no hay emisiones de fenatreno, benzofluorantreno y benzopirenos además, las emisiones óxidos de nitrógeno se reducen o aumentan levemente dependiendo de los desgastes del motor y la calibración de la bomba inyectora (Randall, 1999). Las propiedades físicoquímicas del biodiesel y diesel de petróleo se presentan en la tabla 1.

Tabla 1: Comparación entre características físicas y químicas de biodiesel y diesel (USDOE, 2000).

Propiedades						
Estándar del combustible	ASTM D975	ASTM PS121				
Composición del combustible	С10-С21 НС	C2-C22 FAME				
Valor bajo de calentamiento (BTU/lb)	130,250	120,910				
Viscosidad a 40°C	1.3-4.1	1.9-6.0				
Densidad, lb/gal a 15°C	7.079	7.328				
Carbón %/peso	87	77				
Punto de ignición (°C)	60-80	100-170				
Punto de congelación (°C)	-15 a 5	-3 a 12				
Número de cetanos	40-55	48-60				
Sulfuros (%/peso)	0.05 máximo	0				
Gravedad específica Kg/l a 60°F	0.85	0.88				
Oxígeno, por diferencia (%/peso)	0	11				
Hidrógeno (%/peso)	13	12				
Punto de ebullición (°C)	188-343	182-338				

En el periodo comprendido entre los años 1994 a 1996, la firma ambiental *CytoCulture* condujo varias pruebas con la colaboración del Departamento de Pesca y Recreación de California (USA) para documentar el impacto de los ésteres metílicos vegetales en varias especies nativas de plantas, peces y mamíferos marinos y compararlo con el diesel de petróleo. Los estudios incluyeron pruebas de toxicidad utilizando larvas de pescado (*Menidía beryllina*) y de crustáceos (*Mysidopsis bahia*). En el experimento se estableció que la LD₅₀ (concentración requerida para matar al 50% de la población) para *Menidía beryllina* fue *de* 578 ppm mientras que la del diesel fue de 27 ppm. De igual forma, la LC50 para las larvas del camarón fueron 122 ppm y de 2.9 ppm para el diesel de referencia (Randall, 1999).

Hasta ahora, el único trabajo publicado sobre la biodegradabilidad de biodiesel es el de Zhang y colaboradores (1998). En este estudio fueron ensayados varios tipos de biodiesel: Metil éster de canola, Etil éster de canola, Metil éster de soya y Etil éster de soya, empleando la técnica de evolución de CO_2 (*EPA 560/6-82-003*), cromatografía de gas, demanda biológica (BOD₅ *EPA 405.1*) y demanda química de oxígeno (COD *EPA 410*). También se examinó la biodegradabilidad del diesel comercial 2-D para compararla con la del biodiesel y la mezcla biodiesel/diesel en proporción de 80/20, 50/50 y 20/80. Los resultaron mostraron una remoción del 100% de los biodiesel al segundo día de incubación de los sistemas de acuerdo al método de GC y la mineralización en 28 días de incubación de acuerdo al método de evolución de CO_2 . Así mismo, se observó que el biodiesel se degrada más rápidamente que el diesel y que la mezcla con biodiesel, realza la biodegradación del diesel.

La biodegradación de hidrocarburos por poblaciones nativas de microorganismos representa uno de los principales mecanismos por el cual el petróleo y otros hidrocarburos contaminantes son eliminados del ambiente (Tempest *et al.*, 1978). La técnica de biorremediación, basada en el potencial biodegradativo natural de un suelo es comúnmente llamada "atenuación natural" o biodegradación intrínseca y es propuesta como una forma costo efectivo de remediación de bajo riesgo (Hinchee *et al.*, 1998. citado en Margesin y Shinner, 2001).

El ambiente ejerce profunda influencia sobre las actividades microbianas. Muchos microbios son muy activos en ciertos ambientes, pero muy poco activos en otros. La tasa de degradación microbiana de hidrocarburos en suelos es afectado por varios parámetros fisicoquímicos y biológicos que incluyen el número y tipos de microorganismos presentes, las condiciones de actividad de degradación microbiana como presencia de nutrientes, oxígeno, pH, presión, salinidad, temperatura, la calidad, cantidad y biodisponibilidad de los contaminantes y características del suelo como tamaño y distribución de partícula (Margesin y Schinner, 1997; Joseph, 1990).

El paso inicial en el catabolismo hidrocarburos por bacterias involucra la oxidación del substrato por oxigenasas por lo que la concentración de oxígeno limita la biodegradación de petróleo en el suelo (Jamison *et al.*, 1975) y otros hidrocarburos en aguas subterráneas (Wedel *et al.*, 1988). La disponibilidad de oxígeno en el suelo es dependiente de la velocidad de consumo microbiano, el tipo de suelo y la presencia de substratos utilizables que puedan conllevar a su consumo (Bossert *et al.*, 1984).

Numerosos estudios reportan biodegradación de los hidrocarburos aromáticos y *n*alcanos bajo condiciones aeróbicas (Ericsson *et al.*, 1998; Gallego *et al.*,2001; Salimen *et al.*, 2004) mientras otros trabajos realizados con cultivos de enriquecimiento y microcosmos muestran que los consorcios microbianos pueden degradar hidrocarburos tales como tolueno (Elshahed y Langenhoff, 1997), alquil-benenceno (Chen, 1997; Phelps, 1991; Ball, 1996), benceno, naftaleno y fenantreno (Burland, 1999; Kazumi *et al.*,1997; Meckenstock *et al.*, 2000; Coates *et al.*, 1996), n- alcanos mayores de C₆ (So y Young, 2001; Ehrenrich *et al.*, 2000), alcanos ramificados (Bregnard *et al.*, 1996; Bregnard *et al.*, 1997), y mezclas de hidrocarburos (Grishchenkov *et al.*, 2000) bajo condiciones anaeróbicas.

Los nutrientes pueden limitar la actividad microbiana en suelos. Después de un evento de contaminación con hidrocarburos, los nutrientes pueden escasear debido a que la fuente de carbono tiende a causar un rápido consumo de los más importantes nutrientes

inorgánicos tales como nitrógeno (N) y fósforo (P) (Morgan y Watkinson, 1989). La aceleración de la biodegradación de petróleo crudo y gasolina en sistemas terrestres y marinos por adición de nitrógeno y fósforo en forma de úrea, fosfato y sales de amonio, ha sido demostrado en numerosos estudios (Walworth y Reinolds, 1995; Swanell *et al.*, 1996) mientras otros investigadores han observado falta de incremento en la tasa de biodegradación (Lebtomaki y Niemela, 1975) o un incremento sólo después de varios meses o años de que los fertilizantes fueron adicionados (Raimond *et al.*, 1976).

Margesin y Schinner (1997), estudiaron en el laboratorio la biodegradación de diesel de petróleo (5g/Kg de suelo) durante 20 días a 10°C en cinco tipos de suelos alpinos. Estos investigadores analizaron la actividad degradativa por los microorganismos nativos del suelo en tratamientos de bioaumentación y bioestimulación con nutrientes inorgánicos (C, N, P en proporción 100:10:2, respectivamente). Mediante análisis de TPH (Total Petroleum Hidrocarbon, por sus siglas en inglés) se observó al cabo de 20 días de incubación, una disminución de 27-53% de TPH en suelos fertilizados y 16-31% en los suelos no fertilizados, indicando claramente que la bioestimulación con fertilizantes inorgánicos. incrementa substancialmente la actividad degradativa de los microorganismos nativos del suelo. En otro estudio de degradación de diesel realizado en mesocosmos, los autores reportaron mayor eficiencia en la biodegradación en tratamientos de bioestimulación, sin embargo señalan una disminución del efecto positivo de la adición de nutrientes al transcurrir varios meses de tratamiento.

Venosa y colaboradores (1996), calcularon la tasa de biodegradación intrínseca y aumentada con bioestimulación de un vertido de petróleo en la bahía de Delaware y observaron que la tasa de biodegradación de los hidrocarburos aromáticos era significativamente mayor en las parcelas tratadas sólo con nutrientes frente a las no tratadas. Ellos sugieren que los nutrientes representan un factor crítico en la biodegradación de hidrocarburos en suelos. Por otro lado, son pocos los estudios que muestran el efecto de la salinidad en la degradación microbiana de hidrocarburos. Ward y Brock (1976), reportaron que la tasa de metabolismo de hidrocarburos decrece cuando

incrementa las salinidad en un rango de 3.3 a 28.4% y atribuyen los resultados a una reducción general de la tasa metabólica microbiana.

La actividad degradativa de poblaciones naturales de microorganismos es uno de los principales mecanismos por el cual se elimina el petróleo y otros hidrocarburos contaminantes del ambiente (Tempest, 1978). Como los organismos individualmente pueden metabolizar un limitado rango de hidrocarburos, se asocian en poblaciones mixtas para adquirir una amplia y completa capacidad enzimática suficiente para degradar complejas mezclas de hidrocarburos como el petróleo crudo en el suelo (Britton *et al.*, 1984). Los más importantes grupos bacterianos implicados en la biodegradación de hidrocarburos y otros contaminantes están compilados en la biodegradativas (http://bsd.cme.msu.edu/bsd/index.html) donde se destacan los géneros: *Alcaligenes, Arthrobacter, Azoarcus, Bacillus, Bacteroides, Burkholderia, Comamonas, Desulfitobacterium, Flavobacteriu, Mycobacterium, Nocardia, Pseudomonas* (Kivisaar *et al.*, 1989; Haigler *et al.*, 1992), *Ralstonia, Rhodococcus y Sphingomonas*. (Van Hamme *et al.*, 2003; Lang, 1996).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Muestras compuestas de suelo arenoso fueron colectadas de la playa de Guayanilla en la costa sur este de Puerto Rico (18°20'05N; 065°19'22W). Esta playa fue escogida por representar un área de exposición histórica a hidrocarburos incluyendo la zona de puerto y trasbordo que operó durante 20 años como uno de los más grandes complejos petroquímicos del mundo (López, 1979).

Para la obtención de la muestra, se tomaron aleatoriamente porciones de suelo de los primeros 20 cm de profundidad en cinco diferentes lugares de la playa (a lo largo de la zona costera) hasta obtener cinco muestras de aproximadamente 2 Kg. Posteriormente, se transportaron en refrigeración al laboratorio donde fueron mezcladas para obtener una muestra compuesta.

La muestra compuesta fue cernida haciéndola pasar dos veces por el tamiz #5. El pH del suelo se determino usando un potenciómetro, mientras los análisis de humedad fueron realizados siguiendo los protocolos descritos por Cote (2000). Una muestra representativa fue enviada a los laboratorios Alchem Inc. (Ponce, PR), para el análisis de textura, nitrógeno en forma de nitratos, nitritos y amonio, fósforo total, carbonato de calcio y carbono total.

Experimento de biodegradación

La biodegradabilidad de biodiesel se evaluó en sistemas en triplicado utilizando matraces biométricos de 250 ml con 100 g de suelo y a los que se aplicaron los tratamientos descritos en la tabla 2.

Tabla 2: Descripción de los tratamientos empleados para evaluar la degradación de biodiesel y diesel.

Sistema	Tratamiento	Descripción del tratamiento
SB	Atenuación natural	Suelo contaminado con 2,500 mg/Kg de biodiesel. Para evaluar la degradación de biodiesel por microorganismos indígenas del suelo.
SBN ¹	Bioestimulación	Suelo contaminado con 2,500 mg/Kg de biodiesel y suplementado con 3 ml de solución de nutrientes. Para evaluar el efecto de la adición de nutrientes en la biodegradación de biodiesel.
SBD	Mezcla biodiesel/diesel	Suelo contaminado con 2000 mg/Kg de biodiesel y 2000 mg/Kg de diesel. Para examinar como influye la mezcla en la biodegradación de los hidrocarburos.
SD	Atenuación natural	Suelo contaminado con 1500 mg/Kg de diesel. Para comparar la degradabilidad de diesel versus biodiesel.
SDN^1	Bioestimulación	Suelo contaminado con 2000 mg/Kg de diesel y suplementado con 3 ml de solución de nutrientes. Para evaluar el efecto de la adición de nutrientes en la biodegradación del diesel.
S	Control	Suelo sin contaminar.
SBA	Control abiótico	Suelo contaminado con 2,500 mg/Kg de biodiesel y suplementado con 3 ml de solución de nutrientes y 3 ml de AgNO ₃ (1M). Para examinar la pérdida abiótica de biodiesel.
SN	Control de nutrientes	Suelo sin contaminar y suplementado con 3 ml de solución de nutrientes.

¹ Composición de la solución de nutrientes: (NH₄NO₃ [1.5 g]; K₂HPO₄ [0.3 g]; NaCl [0.5 g]; agua destilada [100 ml]).

Los sistemas que no contenían solución de nutrientes fueron suplementados con 3 ml de agua destilada para igualar la humedad. Sistemas similares a los utilizados durante el experimento de mineralización fueron preparados en matraces sencillos (300 ml) para monitorear la densidad bacteriana y degradación de hidrocarburos por el método de cromatografía de gas (*EPA 8015B*). Todos los sistemas fueron incubados en oscuridad a 30 °C durante 41 días. En los días 1, 2, 5, 14, 29 y 41 se obtuvieron muestras de 10 g de los matraces sencillos para estimar la densidad bacteriana mientras a intervalos de 2 a 3 días se examinó la evolución de CO₂ mediante titulación de las muestras de KOH de los matraces de mineralización.

Medición de biodegradación

La degradación de biodiesel fue determinado por análisis de cromatografía de gas (*EPA* 8015B) y mediante el método de evolución de CO₂ (*EPA* 560/6-82-003). En el análisis de cromatografía de gas se midió la concentración de Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH, por sus siglas en inglés), en todos los sistemas al inicio del experimento (Día 1) y al final (Día 41). Para esto, una muestra compuesta obtenida de las réplicas de cada sistema fue enviada al laboratorio Alchem Inc., (Ponce, PR). En general, la extracción de hidrocarburos del suelo se realizó de una muestra de 20 g con 50 ml de hexano. La medición de TPH se realizó en un cromatógrafo EXXON 6890 GC system con detector de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés) y columna DBSHS JW *Scientific manufacuture* (30.0 m x 0.53 mm x 1.50 μ de grosor). La temperatura y los parámetros de corrida fueron: Puerto de inyección: 60 °C/2 minutos a una tasa de 13.30 y temperatura final de 300 °C. Puerto de salida: 280 °C, presión 8, tiempo de purga 0.75, flujo de purga 60; flujo total 13.7. Detector de salida: 250 °C, flujo (H) 30, flujo de aire 400, modo constante HC 25.

El método de evolución de CO_2 fue empleado para analizar la mineralización de los combustibles con un sistema cerrado diseñado por Bartha y Pramer (1970) conocido como matraz biométrico ("Biometer Flask") (Figura 2). Este sistema consiste en un

matraz de 250 ml conectado lateralmente a un tubo de vidrio en el cual se deposita una solución absorbente de CO_2 (KOH), una torre de ascarite que se conecta en la boca del matraz con el fin de atrapar CO_2 ambiental, tapones de goma para mantener cerrado el sistema y una aguja con jeringa con la que se extrae la muestra de KOH expuesta para el análisis.

El fundamento de la técnica es medir indirectamente la mineralización de las fuentes de carbono hasta CO_2 contenidas en el matraz mediante la titulación con solución ácida de la solución absorbente. Los matraces biométricos, fueron preparados para cada sistema de acuerdo al protocolo descrito por Fuentes y Massol (1996). Todos los sistemas fueron incubados en oscuridad durante 41 días. En los periodos de muestreo, se extrajo la muestra de absorbente con una jeringa y se tituló con 0.05 N HCl. El volumen de ácido utilizado en la neutralización de la muestra fue restado del volumen necesario para neutralizar una muestra de KOH sin exponer a CO_2 . Para obtener las µmoles equivalentes de CO_2 producidos se realizó el siguiente cálculo:

$$\mu$$
moles de CO₂ = [(V final – V inicial) * 25]

Donde:

V inicial = Volumen necesario para neutralizar una muestra de KOH sin exponer a CO₂ V final = Volumen de ácido utilizado en la neutralización de la muestra 25 = Factor de corrección para obtención de μmoles de CO₂

La evolución de CO_2 fue registrada en forma acumulativa para cada sistema sumando progresivamente los resultados de cada periodo de muestreo para obtener una curva de evolución de CO_2 .



Figura 2: Diseño de matraz biométrico usado para medir la mineralización de biodiesel y diesel. (obtenido de Atlas y Bartha, 2002). (A) Cierre de goma grande, (B) Torre empacada con ascarite, (C) Llave de paso para el aire libre de CO_2 , (D) Tapón de goma pequeño, (E) Aguja para retirar y reponer absorbente de CO_2 de la trampa, (F) Compartimiento de oxidación, (G) Tubo lateral, (H) Trampa alcalina (solución de KOH), (I) Puente de conexión entre la trampa alcalina y el compartimiento de oxidación, (J) Muestra biológica.

Análisis microbiológico

El análisis microbiológico consistió en la enumeración de microorganismos heterótrofos cultivables mediante la técnica de Número Más Probable (NMP) descrita por Woomer (1996). En general, se realizó una dilución de 10 g de suelo (obtenido de los matraces sencillos) en 90 ml de una solución amortiguadora estéril de buffer fosfato en agitador orbital (30 minutos a 150 rpm y 30° C) y se realizaron diluciones seriadas desde 10^{-1} a 10^{-5} . Platos con agar R2A fueron divididos en cinco secciones (Figura 3) y en cada sección se depositó 5 µl de cada dilución, luego fueron incubados por 5 días a 30° C. La

observación de crecimiento en cada punto de inoculación al quinto día fue interpretado como una respuesta positiva. Los datos obtenidos fueron comparados con una tabla probabilística de NMP (Apéndice 2) para obtener la población estimada. Este valor se multiplicó por el factor de corrección de volumen (200) y el factor de dilución menor inoculado en el plato (10) para finalmente obtener el número más probable de bacterias por gramo de suelo.



Figura 3: Representación gráfica de la inoculación en un plato de agar para la enumeración por el Número Más Probable (obtenido de Fuentes y Massol, 1996). Cada sección corresponde a una dilución de la muestra.

Caracterización fenotípica

Con el propósito de obtener cepas degradadoras, se aislaron poblaciones bacterianas de los sistemas contaminados con biodiesel y diesel. Los cultivos aislados fueron inoculados en medios suplementados con biodiesel (caldo Bushnell-Hass [1.5 g], agar bacteriológico [1.5 g], biodiesel filtro esterilizado [5 g] y agua destilada [100 ml]) para una selección preliminar de cepas potencialmente capaces de utilizar componentes de biodiesel como única fuente de carbono. De las poblaciones preseleccionadas, se

escogieron los morfotipos representativos de poblaciones bacterianas para su posterior caracterización. La caracterización fue realizada en dos etapas: La primera consistió en una caracterización preliminar basada en forma, color de colonia, reacción de Gram, presencia de endospora, y crecimiento en biodiesel como única fuente de carbono. La segunda etapa consistió en el análisis de utilización de fuentes de carbono usando el sistema Biolog[®] y caracterización molecular mediante análisis de restricción del gen 16S del DNA ribosomal y secuenciación del mismo.

Determinación del crecimiento en biodiesel como única fuente de carbono

Para este análisis, cada cepa fue inoculada en medio LB e incubada a 30 °C por 24 horas. Las bacterias fueron separadas del medio de cultivo mediante la centrifugación de 1 ml del cultivo a 7,500 rpm por 10 minutos. Las células así obtenidas fueron lavadas dos veces consecutivas con una solución al 0.85% de cloruro de sodio estéril y resuspendidas en 100 µl de la misma solución.

Medios sólidos de Bushnell-Hass (BH) fueron preparados en platos Petri suplementado con 5% biodiesel como única fuente de carbono (BHB). El medio Bushnell-Hass es un medio mínimo compuesto de minerales sin ninguna fuente de carbono que se emplea para el aislamiento y cultivo de bacterias capaces de utilizar hidrocarburos. Platos con agar R₂A fueron utilizados como control de crecimiento para cada cepa

Las cepas bacterianas fueron inoculadas en platos de agar BH sin biodiesel, platos de agar BHB y platos de agar R2A e incubados a 30 °C durante 5 días.

La utilización de biodiesel como única fuente de carbono fue observada también mediante crecimiento de cada cepa en caldo Bushnell-Hass suplementado con biodiesel (BHB). Para esto, se prepararon tubos de vidrio con 6 ml de caldo BH filtrado y esterilizado a los que se añadieron 200 µl de una suspensión de bacterias lavadas con solución salina y 100 µl de biodiesel filtro-esterilizado. Tubos con caldo BHB sin

inocular, fueron empleados como control. Los tubos fueron incubados a 37 °C en agitador orbital a 230 rpm.

Para investigar el crecimiento bacteriano, se midió diariamente la turbidez del medio de cultivo usando un espectrofotómetro HACH DR/4000U a 550 nm durante 10 días. Medidas de turbiedad significativamente mayores al control, fueron consideradas como respuestas positivas.

Perfil de utilización de fuentes únicas de carbono (Análisis Biolog[®])

Para esta prueba se preparó una suspensión celular de cada cultivo cuya absorbancia a 420 nm fuera de 0.25-0.35 en fase logarítmica (Kaiser y Guekert, 1998). La suspensión fue servida en una microplaca de Biolog[®] GP/GN usando una multipipeta de ocho canales con la cual se vertió en cada pozo 150 µl de la suspensión. Después de 24 a 48 horas de incubación, el desarrollo de color fue determinado como densidad óptica (OD) a 590 nm usando un lector automático de placas (Tmax Molecular Device, Biolog Inc). Los datos fueron generados usando el MicroLog 3 "soft-ware" (Biolog, Inc.) y fueron convertidos en una matriz binaria con la cual se hicieron análisis de grupos y generación de dendogramas empleando los programas Microsoft Excel 2003[®] y Systat 9.0[®].

Para el caso de bacterias formadoras de esporas, la suspensión celular fue obtenida de cultivos de 18 horas en platos con Agar Tripticasa de Soya (TSA, por sus siglas en inglés) con 25% de maltosa con lo cual se evitó la esporulación.

Tipificación genética

Extracción de DNA

Para la caracterización molecular de las bacterias se aisló el DNA de cada cultivo de 18 horas en caldo Luria Bertani siguiendo una modificación del protocolo descrito por Sambrook y Russell (1989). Un precipitado de células fue resuspendido en 100 μ l de TES (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8, Sacarosa 25%), con 40 μ L de lisozima y 40 μ l de EDTA. Esta suspensión se mezcló con vortex durante 1 minuto para luego incubarse a 37 °C por 10 minutos. Luego de esta incubación, se añadieron 175 μ l de agua destilada, 50 μ l de SDS y 5 μ l de RNAsa y se dejó incubar a 37 °C/20 minutos. A la mezcla se añadió 10 μ l de Proteinasa K (Promega[®]) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, se adicionó 85 μ l de TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM pH 8), 120 μ l de NaCl y se incubó a 65 °C por 20 minutos.

Para la precipitación del DNA, se añadió 75 μ l de acetato de potasio (8 M) y se precipitaron proteínas y debris celular en refrigeración por dos horas. Finalmente, se centrifugó a 14,000 rpm/5 minutos. El sobrenadante fue procesado con etanol para precipitación completa de DNA como se describe en el protocolo original descrito por Sambrook y Russell (1989).

El DNA obtenido fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en solución amortiguadora de Tris Ácido Acético EDTA (TAE) utilizando como marcador el DNA del fago λ cortado con la enzima *Hind*III, 2 µl de colorante ("Loading Dye") 5 X (Promega[®], G 1881) y una intensidad de corriente de 85 voltios por 1 h. La visualización del DNA se realizó tiñendo el gel en solución de bromuro de etidio (0.5 µg/ml) por 20 minutos y se llevó a un transiluminador de radiación UV, donde se tomó una fotografía del mismo. La concentración (ng) del DNA obtenido fue determinada en un espectrofotómetro de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y Russell (1989).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Una cantidad de 80-100 ng de DNA fue utilizada para la amplificación de 16S rDNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Para la amplificación, se preparó una reacción que consistió en: 10 µl de solución amortiguadora para PCR (5 X Colorless GoTaqTM), 6 µL de 2.5 mM de cloruro de magnesio, 30 µg de albúmina sérica bovina (BSA), mezcla de desoxirribonucleótidos

con 2.5 mM de cada uno, 40 pmol de iniciador 8F (Coates *et al.*, 1998) e iniciador 1392R (Bachoon *et al.*, 2001), 0.25 μ L de GoTaq[®] polimerasa y agua destilada desionizada estéril hasta completar un volumen de 50 μ l de reacción. La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400 con un programa de 1 minuto a 95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C y 2 minutos a72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. La visualización del fragmento amplificado se realizó por electroforesis en gel de agarosa como se describe anteriormente.

Segregación de grupos bacterianos por ARDRA

Amplified Restricción DNA Ribosomal Análisis (ARDRA) consiste en la amplificación de la región 16S rDNA, su corte con enzimas de restricción y la visualización del patrón de bandas generado mediante electroforesis en agarosa.

El producto de PCR del 16S rDNA, se cortó con las enzimas de restricción *Hae*III, *Hinf*I y *Rsa*I (Promega[®]) colocando por cada tipo de enzima: 0.5 µl de enzima de restricción (10 U/µl), 1.5 µl de amortiguador enzimático (10 X), 1 µl de agua des ionizada estéril y 12 µl del 16S rDNA (que contenía aproximadamente 1 µg de DNA) para un volumen final de 15 µL. Esta solución fue incubada a 37 °C por 3 horas. La visualización se hizo por electroforesis en gel de Methaphor (3%) usando el marcador pGEM cortado con las enzimas de restricción *Hinf*I, *Rsa*I y *Sin*I. Los patrones de bandas generados fueron visualizados y fotografiados luego de teñir con bromuro de etidio. Las fotografías fueron posteriormente digitalizadas para ser analizadas con Gel-Pro AnalyzerTM y determinar el tamaño de los fragmentos de restricción. Los datos generados en Gel-Pro fueron transcritos en una matriz binomial (Microsoft Excel 2003[®]) y analizadas en Systat 9.0^{*}.

Secuenciación del 16S rDNA

El producto amplificado del 16S rDNA de cepas aisladas de los sistemas contaminados, fue enviado para su secuenciación al Centro de Ecología Microbiana de la Universidad

Estatal de Michigan. Para este análisis, el 16S rDNA de cada cepa fue purificado con el "QIA quick PCR Purification Kit" de QIAGEM[®] y se colocó en un microtubo a una concentración de 20 a 80 ng con 30 pmol de uno de los iniciadores en un volumen final de 12 µl. Esto se hizo por duplicado usando en uno de los microtubos el iniciador 8F y en el otro el iniciador 1392R. Las secuencias obtenidas en ambas direcciones, fueron procesadas y comparadas con el banco de datos del Ribosomal Data Base (RDP 8.1) con los programas Phylip Interface y Weighbor[®] (http://rdp8.cme.msu.edu) de la Universidad Estatal de Michigan para establecer la identidad y posición filogenética de estas bacterias.

RESULTADOS

Propiedades del suelo

Los parámetros fisicoquímicos distintivos del suelo arenoso utilizado en este estudio mostraron una alta alcalinidad que puede deberse a la cantidad de sodio aportada por el mar. Se aprecia además un bajo aporte de nutrientes como nitrógeno inorgánico y carbono orgánico, aunque el fósforo no fue limitante. Los bajos niveles de amonio, nitratos y nitritos y los resultados por Kjeldahl, indican que el aporte de nitrógeno fue principalmente orgánico (Tabla 3).

Tabla 3. Prop	piedades	fisicoau	ímicas de	los suelos	utilizados er	n este estudio
1 4014 5. 110	predudes	IISICOqu	mineus ue	105 540105	utilizados el	i obte obtualo

Parámetro	Resultado
pH	8.4
Humedad (%)	11.4
Carbonato de calcio (como CaCO ₃) (%)	1.9
Carbono orgánico total (ppm)	75.8
Amonio (ppm)	<5
Nitratos (ppm)	<10
Nitritos (ppm)	<10
Fosfato como P (ppm)	194
Nitrógeno inorgánico total (ppm)	<10
Nitrógeno total por Kjeldahl (ppm)	84,000

Biodegradación de biodiesel

Análisis de TPH

En el análisis por cromatografía de gas (método de la *EPA 8015B*) se cuantificaron los Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH, por sus siglas en inglés) este método es recomendado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés)

para la determinación de la concentración de compuestos orgánicos volátiles no halogenados en muestras de suelo por medio de cromatografía de gas.

Los análisis revelaron mayor remoción de biodiesel (80%) que diesel (57%) en sistemas donde se evaluó la degradación por atenuación natural del suelo (Tabla 4). La degradación de ambos combustibles se vio mejorada con la adición de nutrientes obteniéndose una remoción del 100%. En los tratamientos de mezcla biodiesel/diesel, se obtuvo una desaparición del 97% de TPH de biodiesel y 69% de TPH de diesel. Estos valores fueron significativamente mayores (p<0.05), a los obtenidos en sistemas contaminados con los combustibles individualmente. Por otra parte, en suelos fumigados con AgNO₃, se observó desaparición del 52% de TPH de biodiesel. Los análisis fueron realizados para los controles S y SB y en estos no se detectó TPH de biodiesel o diesel lo que significa que los valores de TPH obtenidos correspondieron a los combustibles.

		TPH (m		
ID	Sistema	Día 1	Día 41	Remoción (%)
S	Suelo	0	0	-
SN	Suelo nutrientes	0	0	-
SB	Suelo biodiesel	2503	527	80
SBA	Suelo con AgNO ₃	2503	1194	52
SBN	Suelo biodiesel nutrientes	2503	6.83	100
SD	Suelo diesel	1435	616	57
SBD	Suelo con mezcla biodiesel/diesel	1750 ¹ /2000 ²	57 ¹ /623 ²	97 ¹ /69 ²
SDN	Suelo diesel nutrientes	1735	3.6	100

Tabla 4: Remoción de TPH de biodiesel y diesel después de 41 días de tratamiento.

biodiesel.

² diesel.

Mineralización del biodiesel y diesel

Mediante el método de evolución de CO_2 se midió la cantidad de dióxido de carbono producidos en cada sistema. Estos valores representan un porcentaje del dióxido de carbono resultante de la mineralización de los compuestos orgánicos del suelo. Los valores obtenidos en cada periodo de muestreo fueron registrados en forma acumulativa (Apéndice 2). Todos los sistemas que contenían biodiesel y/o diesel presentaron una producción de CO_2 superior a los valores obtenidos en los controles S y SN (p<0.05) esta diferencia corresponde a la mineralización de los combustibles y no de las fuentes de carbono originales del suelo (Tabla 5).

Tabla 5: Mineralización biodiesel y diesel en 41 días de incubación. El CO_2 neto se refiere al producido por mineralización del combustible.

Sistema	Tasa de mineralización	CO ₂ Total	CO ₂ Neto
Sistema	Χ (σ)	Χ (σ)	Χ (σ)
S	27 (0.8)	1162 (54.5)	_
SN	26 (3.6)	1165 (121.3)	_
SB	88 (0.6)	3471 (28.9)	2308 (28.9)
SBN	137(0.0)	4929 (7.2)	3767 (7.2)
SBA	40(3.2)	1667 (109.2)	504 (109.2)
SD	40(6.2)	1758 (212.6)	596 (212.6)
SBD	95(1.6)	3643 (31.3)	2481 (31.3)
SDN	136(0.0)	4875 (0)	3713 (0)

X = promedio, $\sigma =$ Desviación estándar, n = 3.

La curva de evolución de CO_2 para sistemas expuestos a biodiesel tuvo un comportamiento exponencial que indicó una tasa de mineralización de 88 µmoles de $CO_2/día$, esta tasa de mineralización fue el doble de lo obtenido para el diesel que se mineralizó a una tasa de 40 µmoles de $CO_2/día$. Por otro lado, las tasas producción de

 CO_2 en los sistemas bioestimulados para diesel y biodiesel (SDN y SBN) fueron de 136 µmoles de $CO_2/día$ y 137 µmoles de $CO_2/día$ respectivamente lo que representa un incremento de más del 50% de mineralización para ambos combustibles e indica claramente que la adición de nutrientes estimuló positivamente la actividad degradativa de los microorganismos del suelo.

En la mezcla biodiesel/diesel la tasa de mineralización fue de 95 µmoles de CO_2/dia lo cual fue mayor (p<0.05) que en los combustibles biodiesel (SB) y diesel (SD) individualmente. Por otra parte, en los controles abióticos (SBA) se presentaron tasas de producción de CO_2 de 40 µmoles/día lo cual es mayor que los valores obtenidos para los controles no contaminados (S y SN) que fue 27 µmoles de CO_2/dia y 26 µmoles de CO_2/dia respectivamente (Figura 4). Esto indica que en el control abiótico se produjo mineralización del biodiesel que aunque fue significativamente menor que en los sistemas contaminados (SB y SBN), puede indicar la actividad de microorganismos sobrevivientes del tratamiento con AgNO₃.



Figura 4. Curva de mineralización de sistemas expuestos a biodiesel y diesel. S = Suelo (Control); SB = Atenuación natural de suelo contaminado con biodiesel; SN = Suelo nutrientes (Control Nutrientes); SBN = Bioestimulación de suelo contaminado con biodiesel; SBA = Suelo con AgNO₃ (Control Abiótico); SD = Atenuación natural de suelo contaminado con diesel; SBD = Suelo contaminado con mezcla biodiesel/diesel. n = 3.

Densidad bacteriana

En el análisis microbiológico se observó una densidad bacteriana constante durante los primeros 14 días oscilando entre 10^4 a 10^5 NMP/g de suelo en todos los tratamientos. La excepción fue el sistema fumigado con AgNO₃ en el cual la densidad bacteriana se mantuvo relativamente constante en 10^3 NMP/g, mostrando que el tratamiento no consiguió mantener el sistema estéril, pero sí una densidad bacteriana reducida. En el control de nutrientes (SN) se observó el mayor recuento bacteriano (10^7 NMP/g) pero fué disminuyendo significativamente hacia el final de la incubación (Tabla 6).

Tabla 6: Densidad bacteriana cultivable (NMP/g de suelo) durante el tratamiento de degradación de biodiesel y diesel.

Díoc			¹ Hete	erótrofos t	otales (NN	/IP/g)		
Dias	S	SB	SN	SBN	SBA	SD	SBD	SDN
1	$3.4 ext{ x10}^4$	$2.3 \text{ x} 10^4$	$3.4 ext{ x10}^4$	1.8 x10 ⁴	$3.8 ext{ x10}^3$	1.6 x10 ⁴	1.6 x10 ⁴	1.6 x10 ⁴
2	$3.7 \text{ x} 10^4$	4.9 x10 ⁴	5.1 x10 ⁴	9.5 x10 ⁴	$3.8 ext{ x10}^3$	$2.3 \text{ x} 10^4$	7.4 x10 ⁴	$6.0 ext{ x10}^4$
5	1.3 x10 ⁵	5.1 x10 ⁵	6.5 x10 ⁵	$3.2 ext{ x10}^{5}$	$3.8 ext{ x10}^3$	1.9 x10 ⁵	1.2 x10 ⁵	3.8 x10 ⁵
14	$2.5 ext{ x10}^{5}$	7.5 x10 ⁵	9.3 x10 ⁵	$4.5 ext{ x10}^{5}$	$4.2 ext{ x10}^3$	$3.3 ext{ x10}^{5}$	2.7 x10 ⁵	$6.7 ext{ x10}^{5}$
29	3.5 x10 ⁶	2.1 x10 ⁵	$1.9 \text{ x} 10^7$	$2.9 ext{ x10}^{6}$	3.1 x10 ⁴	1.0 x10 ⁶	3.9 x10 ⁵	3.1 x10 ⁶
41	$4.9 ext{ x10}^{6}$	$2.0 ext{ x10}^{5}$	$2.4 \text{ x} 10^5$	2.9 x10 ⁶	$3.8 ext{ x10}^3$	$4.0 ext{ x10}^{5}$	6.6 x10 ⁵	6.3 x10 ⁵

¹Promedio, n = 3.

Todos los sistemas expuestos a biodiesel y diesel presentaron densidades bacterianas bajas en relación con la alta tasa de mineralización. Se aprecia en la figura 5 y 6 que las densidades bacterianas no aumentaron rápidamente ni alcanzaron recuentos superiores a los sistemas no expuestos (S, SN). Tampoco se observa diferencias substanciales en las densidades bacterianas de los sistemas de atenuación natural contaminados con biodiesel versus los contaminados con diesel (Figura 5) donde se presentó una mayor

mineralización de biodiesel que de diesel. En sistemas bioestimulados se observó que la densidad bacteriana aumentó 10 veces en suelos contaminados con biodiesel mientras que los suelos contaminados con diesel no experimentaron cambios significativos con la bioestimulación (Figura 6). Por otra parte, la mezcla de biodiesel/diesel no generó cambios en la densidad bacteriana (cultivable) en suelos expuestos a biodiesel y diesel (Figura 7). Esto se aprecia en la figura 7A y 7B, tabla 6, donde los recuentos bacterianos de los suelos contaminados con la mezcla no fueron mayores que los obtenidos en suelos expuestos a los combustibles individualmente (SD, SB).



Figura 5: Comparación entre el crecimiento bacteriano (NMP/g de suelo) y la mineralización (μ moles de CO₂) en tratamiento de Atenuación Natural de suelos contaminados con biodiesel y diesel. S = Suelo (Control); SB = Atenuación natural de suelo contaminado con biodiesel; SD = Atenuación natural de suelo contaminado con diesel.



Figura 6: Comparación entre el crecimiento bacteriano (bact/g de suelo) y mineralización (µmoles de CO_2) en suelos contaminados con biodiesel y diesel mediante tratamiento de Atenuación Natural y Bioestimulación. (A) Suelo contaminado con biodiesel; (B) Suelo contaminado con diesel; SN = Control de nutrientes; SB = Atenuación natural de suelo contaminado con biodiesel; SD = Atenuación natural de suelo contaminado con biodiesel; SD = Bioestimulación de suelo contaminado con biodiesel; SDN = Bioestimulación de suelo contaminado con diesel.



Figura 7: Comparación entre el crecimiento bacteriano (bact/g de suelo) y la mineralización (µmoles de CO_2) en suelos contaminados con biodiesel y diesel en sistemas expuestos a un solo combustible (SB y SD) y en sistemas expuestos a la mezcla (SBD). (A) Suelo contaminado con biodiesel; (B) Suelo contaminado con diesel; S = Suelo (Control); SB = Atenuación natural de suelo contaminado con biodiesel; SD = Atenuación natural de suelo contaminado con diesel. SBD = Suelo contaminado con mezcla biodiesel/diesel.

Durante los periodos de recuento se aislaron 292 cultivos bacterianos de los cuales se seleccionaron 190 que crecieron en medio con biodiesel (Caldo Bushnell-Hass [1.5 g], agar bacteriológico [1.5 g], biodiesel filtro esterilizado [5 g] y agua destilada [100 ml]). Estas cepas estuvieron distribuidas en 127 bacilos gram-positivos (67%), 50 bacilos gram-negativos (26%) y 13 cocos gram-positivos (7%). Para la caracterización de los cultivos se seleccionaron 36 morfotipos representativos de los cuales 18 utilizan biodiesel como única fuente de carbono.

Diversidad bacteriana

Para evaluar la diversidad genética de los aislamientos se utilizó ARDRA, que incluyó la amplificación de un fragmento de aproximadamente 1,500 pb usando los iniciadores universales 8F y 1932R. De la digestión de estos fragmentos con tres enzimas de restricción se generaron patrones de restricción constituidos por 2 a 5 bandas de entre 100 a 1,200 pb (Figura 8). Con la información derivada de los patrones de restricción de los 36 cultivos aislados se generó un dendograma (Figura 9) que revela la existencia de una amplia variación genética entre los cultivos aislados. Un valor de corte de 0.1 DE (distancia euclidiana) fue seleccionado para establecer el número de unidades taxonómicas operacionales (UTO) que diferencian los patrones de bandas observados.

Ninguno de los cultivos presentó analogía con las cuatro especies de *Pseudomonas* cuyos patrones de ARDRA, para las tres enzimas de restricción utilizadas fueron tomados como patrones de comparación y que fueron utilizados como poblaciones de referencia por su conocida capacidad de utilizar hidrocarburos. Tampoco estuvieron genéticamente relacionados con las 7 bacterias degradadoras de gasolina (aisladas del biorreactor de lecho fluidizado que operó en el RUM durante el 2003) (Ara, 2004).

Los 36 cultivos aislados de los suelos contaminados con biodiesel se diferenciaron en 26 UTO. De los 26 grupos, 12 crecen en medio con biodiesel como única fuente de carbono. Todos los integrantes de los grupos 12 y 14 poseen esta capacidad y del grupo 13 por lo menos el 80% crecen en medios con biodiesel como única fuente de carbono.

Dos de los grupos (el grupo 9 y 10) mostraron ser incapaces de usar este compuesto como única fuente de carbono.



Figura 8: ARDRA de 4 cepas cortado con *Hae*III (carriles 1 al 4), *Hinf*I (carriles 5 al 8) y *Rsa*I (carriles del 9 al 12). M: marcador (pGEM). A la derecha se muestra el tamaño en pb del marcador.

El análisis basado en morfología macro y microscópica, reacción de Gram, presencia de endosporas, y crecimiento en medio con biodiesel como única fuente de carbono, revela que existe diversidad fenotípica y fisiológica entre algunos miembros de un mismo grupo genético establecido por ARDRA. Sin embargo, las cepas de géneros distintos (designadas mediante la secuenciación del gen 16S rDNA) aparecen en UTO distintos.



Figura 9: Análisis de grupo de patrones ARDRA de 36 cultivos bacterianos presentes en el proceso de biodegradación de biodiesel y diesel. Círculo indica cepas que crecen en medio con biodiesel como única fuente de carbono. Cuadro indica cepas gram negativas.

Mediante Biolog^{*} rue examinado en 22 cepas el perfil de utilización de fuentes de carbono. En este análisis, se observó una gran diversidad metabólica de las bacterias analizadas, inclusive algunos miembros del mismo grupo de ARDRA presentaron patrones metabólicos distintos lo que puede indicar que la diversidad bacteriana de los suelos contaminados con biodiesel es mayor que la establecida genéticamente. Sólo 4 cepas fueron identificadas taxonómicamente por Biolog. Estas corresponden a *Staphylococcus saprophyticus, Corynebacterium urealyticum y Tsukamurella* (Figura 10).



Figura 10: Dendograma de cepas degradadoras de biodiesel basado en Biolog[®] GP, GN. D.E = Distancia euclidiana. B1: *Corynebacterium variabile*, B10: *Tsukamurella inchonenesis*, B13: *Staphylococcus saprophyticus*, B27: *Corynebacterium urealyticum*.

Finalmente, el 16S rDNA de 9 poblaciones que crecen en medios con biodiesel fue amplificado, secuenciado y comparado con las secuencias de la base de datos del "Ribosomal Data Base Project" (RDP 8.1) para establecer su identidad y posición filogenética. El análisis de estas cepas generó secuencias parciales de entre 600 a 700 pb que representan cerca del 40% de la longitud del 16S rRNA bacteriano. Esta información permitió determinar homologías con coeficientes de similitud superiores a 0.94, con secuencias de la base de datos del RDP.

El resultado de la comparación con la base de datos del RDP es mostrado en la tabla 7 y el análisis filogenético de las mismas mediante el programa Phylip Interface y Weighbor[®] en la figura 11. En general, las cepas estuvieron filogenéticamente relacionadas con dos divisiones bacterianas: *Firmicutes y Actinobacteria*.

Сера	B ¹	Longitud de bases	Identificación según RDP ²	CS ³	Familia	División filogenética
2	+	733	Bacillus cereus	0.99	Bacillaceae	Firmicutes
5	+	670	Bacillus megaterium	0.94	Bacillaceae	Firmicutes
10	-	696	Paenibacillus	0.96	Paenibacillaceae	Firmicutes
24	+	689	Bacillus cereus	0.98	Bacillaceae	Firmicutes
25	+	544	Bacillus thuringiensis	0.94	Bacillaceae	Firmicutes
28	-	540	Bacillus	0.97	Bacillaceae	Firmicutes
30	-	535	Bacillus	0.94	Bacillaceae	Firmicutes
32	+	336	Micrococcus	0.87	Micrococcaceae	Actinobacteria
40	+	535	Bacillus subtilis	1.00	Bacillaceae	Firmicutes

Tabla 7: Análisis de las secuencias del 16S rDNA de 9 cepas aisladas de suelos contaminados con biodiesel.

¹Crecimiento en medio con biodiesel como única fuente de carbono.

²Ribosomal Data Base Project.

³Coeficiente de similitud.



Figura 11: Árbol filogenético de cepas degradadoras de biodiesel.

DISCUSIÓN

La tasa de degradación microbiana de hidrocarburos en un suelo es afectada por varios parámetros fisicoquímicos y biológicos que incluyen el número y especies de microorganismos en el lugar, las condiciones para la actividad biodegradativa (Ej. presencia de nutrientes, oxígeno, pH, y temperatura), la biodisponibilidad del contaminante así como las características del suelo (Ej. tamaño y distribución de partícula) (Margesin y Shinner, 1997). El suelo utilizado es uno de origen costero caracterizado por ser arenoso, pH alcalino y humedad media (11 g/g de suelo) (Tabla 3). Por su textura y humedad parece no tener limitaciones por oxígeno. Sin embargo, los análisis fisicoquímicos revelaron un déficit de nitrógeno inorgánico (<10 ppm) y carbono orgánico, macronutrientes esenciales para el desarrollo microbiano. Por otra parte, el área de muestreo posee un historial de exposición a hidrocarburos ocasionado por la industria petroquímica que operó durante años y las actividades industriales que allí son desarrolladas. Bajo estas condiciones de disturbios y deficiencias de nutrientes microbianos, la degradación del biodiesel se observó a niveles superiores de 80% en tratamientos de atenuación natural y bioestimulación, indicando así que el biodiesel es fácilmente utilizable por los microorganismos para su metabolismo de obtención de carbono y energía.

Después de 41 días de tratamiento, los valores de TPH representaron una remoción del 80% del biodiesel bajo la atenuación natural del suelo y del 100% en tratamiento de bioestimulación. De forma igual sucedió con el diesel el cual fue removido en un 57% mediante atenuación natural y 100% luego de bioestimulación con nutrientes (Tabla 4). La mineralización de los combustibles también se vio mejorada con la adición de nutrientes (Tabla 5, Figura 6). Este fenómeno de estimulación de la degradación microbiana por adición de nutrientes inorgánicos ha sido reportado previamente por Atlas y Bartha (1992); Lindstrom *et al*, (1991); Morgan y Watkinson (1989) y Rosenberg *et al*, (1992), Entre otros. En estos trabajos se observó que la biodegradación

de petróleo y otros hidrocarburos mejora mediante la adición de nutrientes inorgánicos como nitrógeno y fósforo los cuales suelen limitar la actividad microbiana.

La fuerte actividad biodegradativa en los suelos contaminados puede apreciarse en la evolución de CO₂ de los sistemas. De acuerdo a este parámetro, el biodiesel presentó una rápida mineralización (88 µmoles de CO₂/día con atenuación natural y 137 µmoles de CO₂/día en sistemas bioestimulados) durante 41 días de tratamiento. La curva de mineralización tuvo un comportamiento exponencial que se mantuvo constante hasta el final de la incubación revelando que en este periodo, no se había agotado totalmente las fuentes de carbono constituyentes de biodiesel. Es decir, la mineralización no es completa. Por otro lado, los valores de TPH por cromatografía de gases indicaron desaparición casi completa del biodiesel. Esto que parece contradictorio puede explicarse de la siguiente manera: La mineralización de un compuesto conlleva una serie de reacciones de oxidación que inicia en la ruptura parcial de las cadenas carbonadas hasta la degradación del sustrato a CO2 y H2O. Una parte del CO2 es liberado y puede ser cuantificado pero otra parte es incorporada a la célula para su crecimiento. El método de cromatografía de gas mide la desaparición primaria de los sustratos a compuestos que son identificados bajo un índice de detección. Es posible que muchos de estos hidrocarburos pudieran ser transformados biológicamente a compuestos no detectados por la técnica de cromatografía de gas y sin embargo, estar disponibles como fuente de carbono en el suelo.

Los suelos no contaminados S y SN (control de atenuación natural y control de bioestimulación) mostraron una tasa de mineralización de 26-27 µmoles de $CO_2/día$ respectivamente, estos valores son mucho menores que los contaminados con biodiesel SB y SBN que fueron de 88 y 137 µmoles de $CO_2/día$ respectivamente (Tabla 5). De acuerdo a estas observaciones, la diferencia entre el CO_2 producido se debe a la mineralización del biodiesel y no de las fuentes de carbono originarias del suelo, resultado que refuerza el postulado de que el biodiesel es utilizado por las bacterias para su metabolismo de obtención de carbono y generación de energía.

Los resultados mostraron que la degradación del biodiesel es mucho más rápida que la del diesel. El análisis de TPH revela que el biodiesel se degradó en un 80% mientras que el diesel en 57% dentro del mismo periodo de tratamiento. De igual forma, la mineralización del biodiesel se realiza de forma más rápida a una tasa de 88 µmoles de CO₂/día mientras que el diesel fue de 40 µmoles de CO₂/día (Tabla 5, Figura 5). Estos resultados son concordantes con los obtenidos por Zhang y colaboradores (1998) en los que se reporta mayor degradación de biodiesel que diesel en ambientes acuáticos y su mineralización en 28 días. Los autores sugieren que en presencia de biodiesel, los microorganismos pueden usar los ácidos grasos del biodiesel como fuente de energía para promover la degradación del diesel.

La tasa de reacción catalítica de un compuesto es regulada por la cantidad de enzimas catalizadoras que se presentan en la célula es decir, para que un proceso bioquímico pueda ocurrir rápidamente, debe haber disponibilidad de enzimas apropiadas. Biodiesel consiste en puros ácidos grasos (Zhan *et al.*, 1998), que pueden servir como nutrientes microbianos (Madigan *et al.*, 1990). En su utilización, las bacterias disponen de enzimas lipasas con las cuales pueden romper enlaces éster para dejar libre los ácidos grasos que posteriormente oxidan hasta *acetil coenzima A* y ácidos grasos con menor número de carbonos mediante un proceso de β oxidación. Además el biodiesel es un hidrocarburo muy oxigenado, que lo hace biológicamente activo y consecuentemente, fácilmente atacable por los microorganismos.

En este estudio se encontró que la mineralización de la mezcla diesel (2000 mg/Kg) con biodiesel (1750 mg/Kg) es cuatro veces mayor que la obtenida en el suelo contaminado con diesel puro (1500 mg/Kg). En éste, la velocidad de mineralización fue dos veces mayor (Tabla 5, Figura 7). Aunque el CO₂ producido en este sistema corresponda a la mineralización de ambos combustibles, se puede apreciar que la mezcla no tiene efecto negativo en la mineralización del diesel ni el biodiesel. Este efecto también puede evidenciarse por la remoción de TPH investigada a los 41 días de tratamiento en el cual se observó una disminución de TPH de diesel del 57% cuando fue adicionado en estado puro al suelo y 69% cuando se adicionó en mezcla con biodiesel.

La composición del diesel es químicamente más complicada para el ataque microbiano que la del biodiesel, ya que además de estar constituido por alcanos y alquenos con cadenas de hidrocarburos de 10-20 carbonos, el diesel comercial posee un alto contenido de hidrocarburos aromáticos (alrededor del 30%) pudiendo así ser más tóxico que algunos petróleos crudos (Wilson y Bradley, 1996) y más resistente a la degradación que las cadenas de alifáticos. Además, en diesel no hay oxígenos unidos por lo que no es muy fácilmente degradable biológicamente.

La principal ruta de degradación de los alcanos implica la oxidación del grupo metil terminal de la molécula mediante la acción de monooxigenasas seguido de la formación de hidrocarburos con grupo alcohol convirtiéndose en una molécula más reactiva. Finalmente el grupo alcohol es oxidado a un aldehído y por último a un carboxilo similar a ácido graso que puede ser transformado por proceso de β-oxidación hasta *acetil CoA* (Madigan *et al.*, 1990). En este estudio fueron aislados poblaciones bacterianas asociadas genéticamente a cepas degradadoras de hidrocarburos que pudieron realizar en forma individual o en consorcio, reacciones de oxidación para degradar el diesel.

Diversidad y abundancia bacteriana

Durante la incubación de los sistemas estudiados, se monitoreó la densidad bacteriana cultivable a través del proceso de biodegradación de los combustibles usando el método de número más probable (NMP) en plato de agar R2A. Este medio es recomendado por sus cualidades de mejorar la recuperación de bacterias heterótrofas ambientales (Atlas, 1993). En los resultados se observó que la abundancia bacteriana no fue consistente con las altas tasas de mineralización (Figuras 5 y 6). Tampoco los recuentos bacterianos de los sistemas contaminados fueron significativamente distintos al obtenido en sistemas no contaminados. Los resultados pueden obedecer a que en los suelos contaminados con

biodiesel y diesel ocurre una selección de poblaciones que dio como resultado la disminución en la cantidad de heterótrofos totales. Los cambios en la estructura de poblaciones bacterianas son esperados. Por ejemplo, Song y Bartha (1990) observaron que durante el desarrollo de la degradación de hidrocarburos aromáticos y alicíclicos, los niveles de bacterias degradadoras aumentaba mientras que los recuentos de heterótrofos cultivables disminuía en todos los sistemas contaminados. Por otra parte, MacNaughton *et al*, (1999), reportaron cambios en la estructura de la población bacteriana durante la biorremediación de un derrame experimental de petróleo en un suelo costero, al observar diferencias entre poblaciones bacterianas de suelos contaminados y no contaminados. Ellos plantearon que la estructura y diversidad de las comunidades dominantes de bacterias cambia substancialmente tras un evento de contaminación con hidrocarburos.

Múltiples substratos y metabolitos presentes en suelos impactados con hidrocarburos seguramente proveen un ambiente favorable para el desarrollo de una comunidad bacteriana compleja (Van Hamme *et al.*, 2003). Morfológicamente la comunidad bacteriana (cultivable) de los suelos contaminados con biodiesel y diesel estuvo constituida en su mayoría por bacilos gram positivo (67%) seguido de bacilos gram negativos (26%) y en menor abundancia cocos gram positivos (7%). Características fenotípicas y genotípicas fueron utilizadas para identificar cepas degradadoras y determinar la diversidad bacteriana de los suelos contaminados con biodiesel y diesel. A través del análisis de grupo de patrones de bandas generados por ARDRA de 36 cultivos seleccionados se determinaron 26 grupos genéticamente diferentes (Figura 9).

El análisis de ARDRA está basado en la generación de patrones de bandas cuyo número y tamaño depende de la presencia o ausencia de sitios de restricción en el interior de los genes de 16S rDNA sin embargo, esta técnica tiene tres limitaciones: (1) genera una restringida cantidad de datos a partir de las moléculas de 16S rDNA (sólo utiliza lugares de restricción), (2) no permite establecer si dos patrones iguales se deben a sitios de restricción con igual ubicación en las moléculas de DNA de las que proceden y (3)

genera inconsistencias topológicas en los dendogramas por la limitada capacidad discriminatoria de las enzimas de restricción con respecto a la extensa variedad de organismos que ocurren naturalmente (Ara, 2004). Por lo tanto, al igual que Massol-Deyá *et al*, (1997); Rodríguez (1998) y Ara (2004), los resultados de ARDRA sólo se utilizan para establecer una medida de diversidad entre los organismos probados y una presuntiva identificación para diferenciar grupos genéticos cuyos integrantes pueden pertenecer a una o más especies.

La diversidad de la comunidad bacteriana presente en los suelos contaminados con biodiesel y diesel fue también examinada por su perfil de utilización de fuentes de carbono mediante Biolog[®]. En este método se estudiaron 22 cepas de las cuales sólo 4 fueron identificadas (Figura 10). El bajo porcentaje de identificación (23%) puede deberse a que la base de datos no cuenta con información suficiente para la identificación de bacterias aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos. En Biolog, la cepa B1 se identificó como *Corynebacterium variabile*, la B27 como *Corynebacterium urealyticum*, pertenecientes la subdivisión Actinobacteria. La cepa B13 fue identificada como *Staphylococcus saprophyticus* de la subdivisión Firmicutes. Ambos grupos; Firmicutes y Actinobacteria, contienen miembros caracterizados por su capacidad de degradar hidrocarburos (Grifoll *et al.*, 1992; Zaitsev *et al.*, 1991; Joseph y Colwell *et al.*, 1990).

Aunque no se hallaron reportes que relacionen estas especies bacterianas con degradación de hidrocarburos, otras cepas de este mismo grupo (Actinobacteria) como *Arthrobacter globiformi* y *Corynebacterium sepedonicum* tienen la capacidad de degradar dicloro-benceno y otros compuestos aromáticos (Zaitsev *et al.*, 1991). Otras del género *Arthrobacter* son referidas por su capacidad de degradar dicloro-benceno y utilizar fluoreno como única fuente de carbono y energía (Grifoll *et al.*, 1992).

Corynebacterium variabile y Corynebacterium urealyticum son habitantes del suelo y colonizan la piel de animales y el hombre. Su importancia es principalmente clínica

debido a que es patógeno oportunista del aparato urinario de hombre y animales produciendo enfermedades en vías urinarias altas y bajas. Además es resistente a múltiples antibióticos (Collins *et al.*, 1999; García-Bravo *et al*, 1996). *Corynebacterium variabile*, anteriormente conocido como *Caseobacter polimorphus* y renombrado como *Corynebacterium mooreparkense* (Gelsomino *et al.*, 2005; Brennan *et al.*, 2001), es aislado con frecuencia por contaminar quesos durante la maduración (Breenan *et al.*, 2002). Por su actividad lipolítica se ha propuesto para bioaumentación en la eliminación de grasas durante el tratamiento de aguas residuales de panaderías (Kenan *et al.*, 2001). En este trabajo, ambos cultivos se caracterizaron por su capacidad de usar biodiesel como única fuente de carbono. Estas características, nos permiten proponer que estas bacterias podrían participar vigorosamente en la degradación de biodiesel.

La secuenciación parcial del 16S rDNA de 9 poblaciones degradadoras de biodiesel las identificó como pertenecientes a la división filogenética *Firmicutes* a excepción de la B32 que estuvo identificada en la división *Actinobacteria* (Figura 11). Las cepas denominadas como B2, B24, B25, y B28 estuvieron relacionadas con *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus cereus*, ambas especies, se caracterizan por su amplia distribución ambiental.

Bacillus cereus ha sido aislada de suelos fuertemente contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos y fue señalada por Kazunga *et al*, (2001) y Crawford (1976) por su capacidad de degradar fluoranteno. Varios miembros de este género, como *B. benzoevorans, B. brevis, B. laterosporus y B. circulans* fueron reportados por su capacidad de degradar benceno y usar compuestos aromáticos como única fuente de carbono (Lang, 1996). *Bacillus thuringiensis* no se conoce como degradadora de hidrocarburos y su importancia es más que todo fitopatológica.

Las cepas B2 y B24 cuya similitud con *Bacillus cereus/thuringiensis* fue mayor de 0.98 (según secuenciación parcial del 16S rDNA) están estrechamente relacionadas en ARDRA (Figura 9), pero presentaron un perfil de utilización de fuentes de carbono

distinto (Figura 10). Estas bacterias podrían pertenecer al mismo género y posiblemente la misma especie, pero con comportamiento fisiológico distinto. Las otras cepas identificadas mediante la secuenciación parcial del 16S rDNA como similares fueron B24, B25 y B28 a pesar de mostrar diferencias genéticas mediante ARDRA. En este caso las bacterias comparten el mismo género, pero podrían pertenecer especies distintas. Aún cuando en la secuenciación parcial del 16S rDNA se obtuvo un porcentaje de similitud con cepas de la base de datos del RDP mayores de 0.94, el porcentaje de nucleótidos empleados para la comparación (40-50% aproximadamente) no necesariamente es suficiente. Por tanto se reconoce que pertenecen al mismo género de *Bacillus*, pero pueden ser de diferentes especies según el RDP.

Las cepas B5 y B30 estuvieron relacionadas con *Bacillus megaterium* (0.94% de similitud), B32 con *Micrococcus luteus* (0.87% de similitud), y B40 con *Bacillus subtilis* (1.00% de similitud). Alexander (1997) y Tornabene (1976), citan a *Corynebacterium, Staphylococcus, Bacillus y Micrococcus* como los géneros bacterianos más frecuentemente aislados del suelo y junto a *Penibacillus* hacen parte de aislamientos de suelos contaminados con hidrocarburos. Uno de estos miembros, *Micrococcus luteus*, es reportado como productor de hidrocarburos (Tornabene *et al.,* 1976) y *Micrococcus roseus* fue reportado por Wright *et al.*, (1993) por su capacidad de degradar un hidrocarburo sintético llamado "Emkarate" compuesto por una mezcla de hidrocarburos alifáticos como octanoato, decanoato y 1,1,1-tris (hidroxi metil) propano. La cepa B32 también mostró un perfil nutricional similar a *Micrococcus luteus* aunque el porcentaje de identificación fue muy bajo. Sin embargo, las características morfológicas y de reacción Gram son consistentes con este grupo.

Una característica importante de la cepa B32, fue su capacidad de usar biodiesel como única fuente de carbono. Esto puede obedecer a un alto potencial lipolítico como el determinado por Delamarre y Batt (1999) quienes asilaron cepas de *Micrococcus* causantes de deterioro de margarinas. Ellos sugieren que para esta función la bacteria produce lipasas y sulfactantes para la utilización de los lípidos. La cepa B32 posiblemente corresponde a una especie de *Micrococcus* lipolítico capaz de degradar biodiesel y posiblemente otros hidrocarburos como los alifáticos constituyentes del diesel.

La cepa B10 fue identificada genéticamente como perteneciente al género *Penibacillus*. Este género es reconocido principalmente por tener miembros causantes de la enfermedad conocida como "Loque Americana" (AFB, por sus siglas en inglés) que ataca las abejas obreras (*Apis mellifera*) en su estado larvario o de pupa (López *et al.*, 2002). La especie mas destacada como agente causal es *P. larvae* y fue previamente descrita como *Bacillus larvae* (Alipi *et al.*, 2002) *Paenibacillus*, ha sido aislado de diversas fuentes ambientales formando parte de consorcios bacterianos reductores de hierro en sedimentos contaminados con uranio (Petrie *et al.*, 2003). Algunas especies son nitrato reductoras y presentan capacidad para utilizar el acetato como única fuente de carbono. Recientemente incluyeron en este grupo cepas con capacidad de degradar hidrocarburos poliaromáticos (Daane *et al.*, 2003). Aunque la cepa B10 no creció en medios de cultivo con biodiesel como única fuente de carbono, podría ser parte de consorcios microbianos capaces de degradar variados hidrocarburos como el biodiesel y los componentes del diesel.

La misma cepa B10 fue identificada fisiológicamente como *Tsukamurella inchonensis* (Figura 10) que pertenece a un grupo filogenético distinto a *Paenibacillus*. Este corresponde a la subdivisión Firmicutes y *Tskamurella* a Actinobacteria (Yassin *et al.*, 1995). Esta última se caracteriza por contener gran cantidad de ácido mícólico en su pared celular y su importancia radica principalmente en que es patógeno oportunista de pacientes en post operatorio. Teniendo en cuenta el porcentaje de similitud de la secuencia parcial de la cepa (0.96), la bacteria corresponde posiblemente al género *Paenibacillus* que aunque se diferencia en el linaje genético, comparte algunas características metabólicas con una cepa *Tskamurella* según la base de datos de Biolog[®].

En general, los suelos sometidos a contaminación con hidrocarburos ya sea por derrames accidentales, existencia de plantas procesadoras de hidrocarburos u otras actividades antropogénicas, experimentan un incremento en el potencial oxidativo de la comunidad microbiana que coexiste en ese ambiente (Leahy y Colwell, 1990). Bajo condiciones apropiadas, las comunidades microbianas pueden degradar muchos o todos los constituyentes de hidrocarburos o pueden ser estimulados con manipulaciones sencillas como la adición de nutrientes. El suelo utilizado en este estudio presenta un historial de exposición a hidrocarburos lo que pudo influir en el rápido establecimiento de poblaciones con alto potencial biodegradativo y por consiguiente, en la eficiente biodegradación del biodiesel y diesel.

CONCLUSIONES

- La constitución de origen natural del biodiesel permite que sea fácilmente reconocido y transformado por enzimas de origen microbiano mediante atenuación natural.
- La adición de nutrientes inorgánicos estimula el crecimiento y actividad bacteriana, incrementando así la biodegradación del diesel y el biodiesel.
- La biodegradabilidad del biodiesel es superior al diesel derivado del petróleo.
- Suelos contaminados con mezclas de diesel y biodiesel pueden ser fácilmente biorremediados.
- En suelos contaminados con biodiesel se presenta una alta diversidad bacteriana demostrada por el polimorfismo genético de las poblaciones y la variedad de fuentes de carbono empleadas por miembros de un mismo grupo genético.
- La comunidad bacteriana presente en el proceso de degradación del biodiesel está constituida principalmente por bacilos gram positivos.
- Dentro de la comunidad bacteriana dominan cepas pertenecientes al género Bacillus, Penibacillus y Micrococcus, de las divisiones filogenéticas Firmicutes y Actinobacteria. Estas divisiones son ampliamente reconocidas por aislarse de suelos contaminados con hidrocarburos.
- Las comunidades microbianas seleccionadas en suelos impactados por biodiesel podrían incluir microorganismos lipolíticos de importancia clínica o fitopatológica.

LITERATURA CITADA

- Agarwal, A.K. 2005. Experimental investigations of the effect of biodiesel utilization on lubricating oil tribology in diesel engines. *J. automobil. eng.* 11: 703 713
- Alexander, M. 1997. Introduction to soil microbiology. Wiley, New York, pp. 350 467.
- Alippi, A.M., A.C. López, y O.M. Aguilar. 2002. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subs. Larvae, the cause of American Foulbrood of Honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes Encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3655 3660.
- Al-Widyan, M.I., A.O, y Al-Shyoukh. 2002. Experimental evaluation of the transesterification of waste palm oil into biodiesel. *Bioresour.Technol.* 85: 253 -256.
- Atlas, R.M. 1993. Handbook of Microbiological Media. New York, CRC Prees.
- Atlas, R.M. y Bartha. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spills bioremediation. *Adv. Microb. Ecol.* 12: 287 - 338.
- Atlas, R.M. y R. Bartha. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Education. S.A. Madrid, pp. 255 261.
- Antolin, G., F.V. Tianut, Y. Briceño, V. Castaño, C. Pérez, y A.I. Ramírez. 2002. Optimization of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresours. Technol.* 85: 253 - 256.
- Ara, S.L. 2004. Comunidad Bacteriana Degradadora de Gasolina en un Reactor de Lecho Fluidizado. Tesis MS. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez. P.R, p. 49.
- Bachoon D.S., R. Araujo, M. Molina, y R.E. Hodson. 2001. Microbial community dynamics and evaluation of bioremediation strategies in oil-impacted salt marsh sediment microcosms. J. Ind. Microbiol. Biotech. 27: 72 - 79
- Ball, H.A., H.A. Johnson, M. Reinhard, y A.M. Spormann. 1996. Initial reactions in anaerobic ethylbenzene oxidation by a denitrifying bacterium, strain EB1. J. Bacteriol. 178: 5755 - 5761.
- Bartha, R. y D. Pramer. 1970. Metabolism of acrylanilide herbicides. *Adv. Appl. Microbiol.* 13: 317 341.

- Bossert, I. y R. Bartha. 1984. The fate of petroleum en soil ecosystem. En: Atlas R.M. Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Co. New York, pp. 550 600.
- Bregnard, T.P.A., P. Höhener, A. Häner, y J. Zeyer. 1996. Degradation of weathered diesel fuel by microorganisms from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 299 307.
- Bregnard, T.P.A., P. Höhener, A. Häner, y J. Zeyer. 1997. Anaerobic degradation of pristane in nitrate-reducing microcosms and enrichment cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2077 - 2081.
- Brennan, N.M., R. Brown, M. Goodfellow, A.C. Ward, T.P. Beresford, P.J. Simpson, P.F. Fox, y T.M. Cogan. 2001. Corynebacterium mooreparkense sp. nov. and Corynebacterium casei sp. nov., isolated from the surface of a smear-ripened cheese. J. Syst. Evol. Microb. Vol 51: 843 - 852.
- Britton, L.N. 1984. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbon. En: Atlas, R.M y R. Bartha. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Education. S.A. Madrid, pp. 255 261.
- Burland, S. y E. Edwards. 1999. Anaerobic benzene biodegradation linked to nitrate reduction. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 529 533.
- Chen, C.I. y R.T. Taylor. 1997. Thermophilic biodegradation of BTEX by two consortia of anaerobic bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 121 128.
- Coates, J.D., R.T. Anderson, y D.R. Lovely. 1996. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1099 1101.
- Coates, J.D., D.J. Ellis, E.L. Blunt-Harris, C.V. Gaw, E.E. Roden, y D.R. Lovley. 1998. Recovery of humic-reducing bacteria from a diversity of environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1504 - 1509.
- Collins, M.D., L. Hoyles, P.A. Lawson, E. Falsen, R.L. Robson, y G. Foster. 1999. Phenotypic and phylogenetic characterization of a new *Corynebacterium* species from dogs: Description of *Corynebacterium auriscanis* sp. nov. J. Clin. *Microbiol*. 37: 3443 - 3447.
- Collins, M.D., J. Smida, y E. Stackebrandt. 1989. "Phylogenetic evidence for the transfer of *Caseobacter polymorphus* (Crombach) to the genus Corynebacterium." *Int. Syst. Bacteriol.* 39: 7 9.
- Cote, L.G. 2000. Manual de laboratorio de suelos agrícolas. Editorial de la Universidad Industrial de Santander, Colombia, pp. 10.

- Cvengros, J. y F. Povazanec. 1996. Production and treatment of rapeseed oil methyl ester as alternative fuels for diesel engines. *Bioresour. Technol.* 55: 145 152.
- Daane, LL., I. Harjono, GJ. Zylstra, y M.M. Häggblom. 2001. Isolation and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacteria associated with the rhizosphere of salt marsh plant. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2683 2691.
- Delamarre, S.C. y A. Batt. 1999. The microbiology and historical safety of margarine. *Food. Microbiol.* 16: 327 333.
- Ehrenrich, P., A. Behrends, J. Harder, y F. Widdel. 2000. Anaerobic oxidation of alkanes by newly isolated denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 173: 58 64.
- Elshahed, M.S. y M.J. McInerney. 2001. Is interspecies hydrogen transfer needed for toluene degradation under sulfate reducing conditions?. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 35: 163 169.
- Erickson, M., A. Swartling. y Dalhammar G. 1998. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid-phase micro-extraction and GC - MS. *Appl. Microbiol biotechnol.* 50: 129 - 134.
- Fuentes, F. y A.A. Massol-Deyá. 1996. Ecología de microorganismos. Manual de laboratorio. Editorial de la Universidad de Puerto Rico. Mayagüez, P.R, pp. 195 - 201.
- Gallego L.R., J. Laredo, J.F. Llamas, F. Vázquez, y J. Sánchez. 2002. Bioremediation of diesel contaminated soils: Evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*. 12: 325 335.
- García-Bravo M., J.M. Aguado, J.M. Morales. y A.R. Noriega. 1996. Influence of external factors in resistance of *Corynebacterium urealyticum* to antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents. Chemother*. 40: 497 499.
- Gelsomino, R., M. Vancanneyt, C. Snauwaert, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, T.M. Cogan, y J. Swings. 2005. "Corynebacterium mooreparkense, a later heterotypic synonym of Corynebacterium variabile." Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55: 1129 1131.
- Grifoll, M., M. Casellas, J.M. Bayona y A.M. Solanas. 1992. Isolation and characterization of a fluorine-degrading bacterium: Identification of ring oxidation and ring fission products. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2910 2917.
- Grishchenkov, V.G., R.T. Townsend, T.J. McDonald, R.L. Autenrieth, J.S. Bonner y A.M. Boronin. 2000. Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative

anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Process. Biochem.* 35: 889 - 896.

- Haigler, B.E., C.A. Pettigrew y J.C. Spain. 1992. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas sp.* strain JS150. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2237 – 2244
- Jamison, V.M., R.L. Raymond, y J.O. Hudson. 1975. Biodegradation of high-octane gasoline in groundwater. *Dev. Ind. Microbiol.* 16: 305 312.
- Joseph G., Leahy y R. Colwell. 1990. Microbial Degradation of hydrocarbon in the environment. *Environ. Microbiol. Rev.* Sept: 305 315.
- Kaiser, S.K. y J.B. Guekert. 1998. Comparasion of activated sludge microbial communities using Biolog microplates. *Wat. Sci. Tech.* 37: 57 63.
- Kazumi, J., M.E. Caldwell, JM. Suflit, D.R. Lovely y L.Y. Young 1997. Anaerobic degradation of benzene in diverse anoxic environments. *Environ. Sci. Technol.* 31: 813 - 818.
- Kazunga C., M.D. Aitken, A. Gold, R. Sangaiah. 2001. Fluoranthene-2,3-and-1,5-dion Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in Arthrobacter globiformis, Corynebacterium sepedonicum and Pseudomonas cepacia strains are novel products from the bacterial transformation of fluoranthene. Environ. Sci. Technol. 35: 917 - 922.
- Keenan, D. y A. Sabelnikov. 2000. Biological augmentation eliminates grease and oil in bakery wastewater. *Water Environ. Res.* 72: 141 146.
- Kivisaar, M.A., J.K. Habicht, y A.L. Heinaru. 1989. Degradation of phenol and mtoluate in *Pseudomonas sp.* strain EST1001 and its *Pseudomonas putida* transconjugants is determined by a multiplasmid system. J. Bateriol. 9: 5111 -5116.
- Lang, E. 1996. Diversity of bacterial capabilities in utilizing alkylated benzenes and other aromatic compounds. *Lett. Appl. Microbiol.* 23: 257 60.
- Lang X., A.K. Dalai, N.N. Bakhsi, M.J. Reaney, y P.B. Hertz. 2001. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils. *Bioresour. Technol.* 80: 53 - 62.
- Langenhoff, A.M., D.L. Brouwers-Ceiler, H.L Engelberting, J.J. Quist, P.N Wolkenfelt, J.B Zehnder, y G. Schraa. 1997. Microbial reduction of manganese coupled to toluene oxidation. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 22: 119 - 127.

- Leahy, J. y R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305 315.
- Lebtomaki, M. y S. Niemela. 1975. Improving microbial degradation of oil in soils. *Ambio.* 4: 126 129.
- Lindstrom, J.E., R.C. Prince, J.C. Clark, M.J. Grossmann, T.R. Yeager, J.F. Braaddock, y E.J. Brown. 1991. Microbial population and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spills. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2514 - 2525.
- López, J.M. 1979. Distribution of trace contaminants in water and sediments of Guayanilla and Tallaboa bays. En: *Proceedings of the Symposium on Energy Industry and the Marine Environment in Guayanilla Bay.* Jose M. López, ed. CEER, University of Puerto Rico - U.S. Department of Energy Mayagüez, P.R, pp: 93.
- López, A.C. y O.M. Aguilar. 2002. Differentiation of *Paenibacillus larvae* subs. Larvae, the cause of American Foulbrood of Honeybees, by using PCR and restriction fragment analysis of genes encoding 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3655 - 3660.
- Loser, C., H. Seidel, A. Zehnsdorf, S. Stottmeister, 1998. Microbial degradation of hydrocarbons in soil during aerobic/anaerobic changes and under purely aerobic conditions. *Appl. Microbiol. Biotech.* 49: 631 - 636.
- Lyman, W., Reehl y D.H. Roseblat. 1990. Handbook of Chemical Property Estimation Methods - Environmental Behavior of organic compounds. Am. Chemical. Soc. Washinton, D.C.
- Madigan M.T., J.M. Martinko, y J. Parker. 1990. Brock Biología de los Microorganismos. Prentice Hall Iberia. Madrid, pp. 219 224.
- Margesin. R y F. Shinner. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2660 2664.
- Margesin, R. y F. Shinner. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3127 - 3133.
- Meckenstock, R.U., E. Annweiler, W. Michaelis, H.H. Richnow, y B. Schink. 2000. Anaerobic naphthalene degradation by a sulfate-reducing enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2743 - 2747.

- Meyer, S., R. Mose, A. Neef, U. Stahl, y P. Kämpfer. 1999. Differential detection of key enzymes of polyaromatic hydrocarbon-degrading bacteria using PCR and gene probes. *Microbiology*. 145: 1731 1741.
- Milcic-Terzic, J., Y. López-Vidal, M.M. Vrvic, y S. Saval. 2001. Detection of catabolic genes in indigenous microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil. *Bioresour. technol.* 78: 47 54.
- Morgan, P. y R.J. Watkinson. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *Crit. Rev. Biotechnol.* 33: 1 12.
- Peterson, C y D. Reece. 1996. Emission characteristics of ethyl and methyl ester of rapeseed oil compared with low sulfur diesel control fuel in chassis dynamometer test of pickup truck. *Trans. ASAE*. 39: 805 81.
- Phelps, C.D y L.Y. Youngn. 1999. Anaerobic biodegradation of BTEX and gasoline in various aquatic sediments. *Biodegradation* 10: 15 25.
- Piehler, M.F., J.G. Swistak, J.L. Pinckney, y H.W. Paerl. 1999. Stimulation of diesel fuel biodegradation by indigenous nitrogen fixing bacterial consortia. *Microb. Ecol.* 38: 60 - 78.
- Randall von Wedel. 1999. Technical Handbook for Marine Biodiesel in Recreational Boats. http://www. cytoculture.com/Biodiesel%20Handbook.htm. (Accesado en: Julio del 2005).
- Raymond, R.L., J.O. Judson y V.W. Jamison. 1976. Oil degradation in soil Appl. Environ. Microbiol. 31: 522 - 535.
- Rodríguez, C.M. 1998. Diversity of Aerobic Toluene-degrading Bacteria from Tropical Soils. Tesis MS. Univ. de Puerto Rico. Mayagüez, P.R.
- Rosenberg, E., R. Legman, A. Kashmir, R. Tube, E. Adler, y E.Z. Ron. 1992. Petroleum bioremediation-a multiphase problem. *Biodegradation*. 3: 337 350.
- Salimen, J.M., P.M. Tuomi, A.M. Suortti y K.S. Jørgensen. 2004. Potential for aerobic and anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons in boreal subsurface. *Biodegradation* 15: 29 39.
- Sambroock, J., E.F. Fritsh, y T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. N.Y.
- MacNaughton S.J, J.R. Stephen, D.A. Venosa, A.G. Davis, Y.J. Chang, y C. David. 1999. Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill. *Appl. Envir. Microbiol.* 65: 3566 3574.

- Serdari, A., K. Fragioudakis, S. Kalligeros, S. Stournas, y E. Lois. 2000. Impact of use biodiesel of different origin and additives on the performance of stationary diesel engine. J. Eng. Of Gas Turbines and Power. 4: 624 - 631.
- So, C.M y L.Y. Young. 2001. Anaerobic biodegradation of alkanes by enriched consortia under four different reducing conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 473 478.
- Song H.G y R. Bartha. 1990. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Appl Environ Microbiol*. 56: 646 651.
- Song. H.G., Wang y Bartha.1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 652 656.
- Staat, F., E. Vallet. 1994. Vegetable oil methyl ester as a diesel substitute. *Chem. Ind.* 863 865.
- Swannell, R.P., K. Lee, y M. McDonagh. 1996. Field evaluations of marine oil spill bioremediation. *Microbiol. Rev.* 60: 342 365.
- Tempest, D.W. 1978. The biochemical significance of microbial growt yields: areassesment. *Trends. biochem. sci.* 3: 180 184.
- Tomita Y., N. Roy, A. Nakano, N. Sugawara-Tomita, S. Watanabe, N. Okai, N. Abe, y. Kamio. 2003. Cloning, expression and cell surface localization of *Paenibacillus sp.* Strain W-61 xylanase 5, a multidomain xylanase. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6969 6978.
- Tornabene, T.G. 1976. Microbial formation of hydrocarbons. En:. Schelegel H.G y J. Barnea. Microbial Energy conversión reports of the UNITAR/BMFT Göttingen Seminar. Pergamon press, New York, pp.281 - 299.
- Venosa, A.D., M.T. Cuidan, B.A. Wrenn, K.L. Strohmeier, J.R. Jaines, B.L. Eberhart, D. King, y Holder. 1996. Biorremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware bay. *Environ. Sci. Technol.*. 30: 1764 - 1776.
- Wallworth J.L. y M.C. Reinolds. 1995. Biorremediation of a petroleum contaminated cryc soil: Effects of phosphorous, nitrogen and temperature. J. Soil. Contamin. 4: 299-310.
- Ward, D.M. y T.D. Brock. 1976. Environmental factors influencing the rate of hydrocarbon oxidation in temperate lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 764 772.

- Wedel, R.J., J.F. Mosquera, C.D. Goldsmith, G.R. Hater, A. Wong, T.A. Fox, W.T. Hunt, M.S. Paules, J.M. Quiroz, y J.W. Wiegand. 1988. Bacterial biodegradation of Petroleum hydrocarbons in groundwater: In situ augmented bioreclamation with enrichment isolates in California. *Water. Sci. Technol.* 20: 501 - 503.
- Woomer, P. 1994. Most Probable Number Counts. In: Methods Soil Analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties. Soil. Science. Society of America.
- Wright M.A., F. Taylor, S.J. Randles, D.E. Brown, y I.J. Higgins. 1993. Biodegradation of a synthetic lubricant by *Micrococcus roseus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1072-1076.
- Yassin, A.F., F.A. Rainey, H. Brzezinka, J. Burghardt, H.J. Lee, y K.P. Schaal. 1995. "Tsukamurella inchonensis sp. nov." Int. J. Syst. Bacteriol. 45 :522-527.
- Zaitsev, G.M., T.V. Tsoi, V.G. Grishenkov, E.C. Plotnikova, y A.M. Boronin. 1991. Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in Arthrobacter globiformis, Corynebacterium sepedonicum and Pseudomonas cepacia strains. FEMS. Microbiol. Lett. 65:171 - 176.
- Zhang, X., C. Peterson, D. Rece, R. Haws, y G. Moller. 1998. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. *Trans. ASAE*. 41: 1423 1430.

APÉNDICE

Sistema							D	ias						
	2	8	11	14	17	20	23	26	28	31	33	36	38	41
S	95.8	271	354.2	437.5	504.2	570.8	637.5	721	779	863	912.5	996	1079	1163
SB	95.8	546	829.2	1113	1396	1679	1963	2246	2379	2663	2745.8	3029	3188	3471
SN	83.3	282	369.2	456.7	527.5	598.3	669.2	740	790	861	910.83	982	1057	1160
SBN	79.2	529	979.2	1429	1879	2329	2779	3229	3679	4129	4329.2	4529	4729	4929
SBA	83.3	258	375	508.3	591.7	675	758.3	917	1008	1167	1258.3	1350	1508	1667
SD	91.7	433	583.3	758.3	833.3	908.3	983.3	1108	1208	1333	1433.3	1533	1633	1758
SBD	85	535	843.3	1152	1460	1768	2077	2385	2535	2843	3043.3	3243	3443	3643
SDN	75	525	975	1425	1875	2325	2775	3225	3675	4125	4300	4475	4675	4875

Apéndice 1: CO₂ (µmoles) acumulados durante el tratamiento de degradación de biodiesel y diesel.

Número de respuestas positivas por nivel de dilución	Población estimada	Número de respuestas positivas por nivel de dilución	Población estimada
1-2-3-4-5-6		1-2-3-4-5-6	
1-0-0-0-0	1.9	5-5-4-2-0-0	2159
1-1-0-0-0-0	4.0	5-5-4-3-0-0	2716
2-0-0-0-0	4.4	5-5-5-0-0-0	2305
2-1-0-0-0-0	6.8	5-5-5-0-1-0	3126
3-0-0-0-0	7.7	5-5-5-1-0-0	3282
3-1-0-0-0-0	10	5-5-5-1-1-0	4532
3-2-0-0-0	13	5-5-5-2-0-0	4922
4-0-0-0-0-0	12	5-5-5-2-1-0	6918
4-1-0-0-0-0	16	5-5-5-3-0-0	7797
4-2-0-0-0	21	5-5-5-3-1-0	10702
4-3-0-0-0-0	27	5-5-5-3-2-0	13826
5-0-0-0-0	23	5-5-5-4-0-0	12753
5-0-1-0-0-0	31	5-5-5-4-1-0	16902
5-1-0-0-0-0	33	5-5-5-4-2-0	21589
5-1-1-0-0-0	45	5-5-5-4-3-0	27150
5-2-0-0-0	49	5-5-5-0-0	23054
5-2-1-0-0-0	69	5-5-5-0-1	31225
5-3-0-0-0-0	78	5-5-5-1-0	32720
5-3-1-0-0-0	107	5-5-5-1-1	45261
5-3-2-0-0-0	138	5-5-5-2-0	49224
5-4-0-0-0-0	127	5-5-5-2-1	69148
5-4-1-0-0-0	169	5-5-5-3-0	78727
5-4-2-0-0-0	216	5-5-5-3-1	107022
5-4-3-0-0-0	270	5-5-5-3-2	138269
5-5-0-0-0-0	230	5-5-5-4-0	127528
5-5-0-1-0-0	312	5-5-5-4-1	169028
5-5-1-0-0-0	327	5-5-5-4-2	215899
5-5-1-1-0-0	453	5-5-5-4-3	271557
5-5-2-0-0-0	488	5-5-5-4-4	334051
5-5-2-1-0-0	692	5-5-5-5-0	230546
5-5-3-0-0-0	780	5-5-5-5-1	328192
5-5-3-1-0-0	1070	5-5-5-5-2	492238
5-5-3-2-0-0	1387	5-5-5-5-3	781272
5-5-4-0-0-0	1275	5-5-5-5-4	1312535
5-5-4-1-0-0	1690		

Apéndice 2: Tabla del Número Más Probable utilizado para estimar la densidad bacteriana.

1= Respuesta positiva. 0 = Respuesta negativa. Esta es la densidad poblacional estimada asumiendo 1 ml del inóculo. Este factor se ajusta multiplicándolo por el factor de dilución y el volumen del inóculo.

Сера	Morfología de Colonia ¹	Morfología celular	Refacción de Gram	Presencia de esporas	Crecimiento en biodiesel ²	Grupo ARDRA
B1	Circular, rosa	Coco bacilo	+	-	+	22
B2	Circular, naranja	Bacilo	+	-	+	12
В3	Rizoide, blanca	Bacilo	+	+	-	26
B4	Circular, crema	Bacilo	+	+	+	13
B5	Umbilicada, blanca	Bacilo	+	+	-	7
B6	Irregular, blanca	Bacilo	+	+	+	8
B7	Circular, rosa pálido	Bacilo	-	-	-	3
B8	Umbilicada, crema	Bacilo	+	-	+	4
В9	Circular, blanca, seca	Bacilo	+	+	+	6
B10	Irregular, translucida	Bacilo	+	-	-	20
B11	Irregular, crema	Bacilo	+	+	-	16
B12	Irregular, blanca	Bacilo	+	+	+	17
B13	Circular, blanca	Coco	+		-	15

Apéndice 3: Características de las cepas aisladas de los suelos contaminados con biodiesel y diesel.

A (1:	$(\mathbf{C}, \mathbf{u}, \mathbf{t}; \mathbf{u}, \mathbf{u}, \mathbf{u}; \mathbf{t}, \mathbf{u})$
Apenalce 5	(Continuacion)

Сера	Morfología de Colonia ¹	Morfología celular	Refacción de Gram	Presencia de esporas	Crecimiento en biodiesel ²	Grupo ARDRA
B14	Embonada, crema	Bacilos	-	+	-	13
B15	Circular, amarilla	Bacilos	+	-	+	18
B16	Irregular, blanca	Bacilos	+	-	+	14
B17	Irregular, translucida	Bacilo	+	-	-	9
B18	Umbilicada, blanca	Bacilo	+	-	-	14
B19	Umbilicada, crema	Bacilo	+	+	-	9
B20	Umbilicada, blanca	Bacilo	+	-	+	13
B21	Rizoide, blanca	Bacilo	+	-	+	14
B23	Umbilicada, blanca	Bacilo	+	+	-	10
B24	Circular, blanca	Bacilo	+	-	+	12
B25	Circular, blanca	Bacilo	+	+	+	5
B28	Irregular, crema	Bacilo	+	+	-	21
B29	Puntiforme, crema	Bacilo	–	-	-	10

Apéndice 3 (Continuación)

Сера	Morfología de Colonia ¹	Morfología celular	Refacción de Gram	Presencia de esporas	Crecimiento en biodiesel ²	Grupo ARDRA
B30	Puntiforme, blanca	Bacilo	+	+	-	30
B31	Circular, blanca	Bacilo	+	+	-	13
B32	Circular, amarillo	Coco	+	-	+	25
B35	Irregular, blanca	Bacilo	+	+	+	11
B36	Puntiforme, blanca	Bacilo	-	-	+	23
B37	Puntiforme, amarilla	Coco	+	-	-	24
B39	Rizoide, crema	Bacilo	+	+	-	1
B40	Mucoide, translucida	Bacilo	+	-	+	14

¹: Morfología de colonia en plato de agar R2A.
²: Crecimiento en medio con biodiesel como única fuente de carbono.

Сера	Especie relacionada ¹	Prob	Familia	División filogenética	% ID ²
B1	Corynebacterium variabile	73	Corynebacteriaceae	Actinobacteria	0.503
B2	Clavibacter agropyri	-	-	-	0.495
B3	Geobacillus thermoglucosidasius	-	-	-	0.403
B4	Brevibacterium casei	-	-	-	0.249
B5	Bacillus sphaericus	-	-	-	0.115
B8	Brevibacterium otitidis	-	-	-	0.312
B9	No ID	-	-	-	-
B10	Tsukamurella inchonensis	98	Corynebacteriaceae	Actinobacteria	0.693
B12	Bacillus megaterium	-	-	-	0.312
B13	Staphylococcus saprophyticus	82	Estaphylococcaceae	Firmicutes	0.658
B14	Empedobacter brevis	-	-	-	0.101
B18	Geobacillus stearothermophilus	-	-	-	0.002
B19	No ID	-	-	-	-
B23	Bacillus cereus	-	-	-	0.150
B24	Gordonia rubropertinctus	-	-	-	0.482
B27	Corynebacterium urealyticum	96	Corynebacteriaceae	Actinobacteria	0.570
B28	Bacillus cereus	-	-	-	0.416
B29	Bacillus cereus	-	-	-	0.308
B32	Micrococcus luteus (ATCC 9341)	1	Micrococcaceae	Actinobacteria	0.007
B35	Bacillus cereus	-	-	-	0.003
B37	No ID	-	-	-	-
B40	No ID	-	-	-	0.3

Apéndice 4: Perfil de utilización de Fuentes de carbono de 22 cepas analizadas por $Biolog^{\mathbb{R}}$.

¹ Especie de la base de datos del software Microlog (Biolog[®]) relacionada con la cepa analizada. ² Porcentaje de identificación. No ID = No identificada.