

EFFECTO DE LOS HIDROCARBUROS SOBRE LA DIVERSIDAD DE MICROORGANISMOS EN SUELOS ALTIPLÁNICOS Y DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS

Darío Achá Cordero¹
Lic. Maria Cristina Ruiz²

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos son complejas mezclas de compuestos carbonados que pueden resultar altamente tóxicos para los organismos, cuando son derramados accidentalmente en aguas y suelos. En el caso de un derrame en suelos quizá los organismos más afectados son los microorganismos y dada su importancia en los ecosistemas pueden ser útiles como indicadores de los efectos nocivos de los hidrocarburos en el ecosistema. Por otro lado, la contaminación por hidrocarburos puede ser contrarrestada naturalmente debido a que al menos parte de sus compuestos son susceptibles a ser degradados por bacterias y hongos (Atlas, 1981). Por todo ello en el presente trabajo se ha realizado el primer estudio microbiológico (del que se tenga referencia) del efecto de los hidrocarburos sobre la comunidad de microorganismos cultivables de suelos del Altiplano boliviano y también la primera detección de microorganismos degradadores de estos compuestos.

En el Altiplano al momento no existen pozos petroleros, pero grandes cantidades de hidrocarburos son transportados a través de él y consiguientemente es un área susceptible a derrames petroleros; un ejemplo de ello es el reciente derrame petrolero ocurrido en el río Desaguadero por la empresa Trans Redes.

Se tomaron dos puntos de muestreo para su comparación el primero ubicado en proximidades del Lago Titicaca (19K 0525972, UTM 8210582) y el otro en el río Desaguadero (19K 0496809, UTM 8167630) en proximidades de la población del mismo nombre, en el departamento de La Paz de Bolivia. Ambos puntos estaban alrededor de los 3800 m.s.n.m. El punto en el Lago Titicaca fue seleccionado debido a que se cuenta con datos de investigaciones previas que sugieren la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos. El río Desaguadero fue seleccionado por haber sido afectado por un importante derrame petrolero. Sin embargo el punto de muestreo está en una región no afectada por el mismo, lo que lo hace comparable al punto en el lago Titicaca.

DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

Para ver la variación en la diversidad de los microorganismos, se utilizaron medios selectivos con hidrocarburos como agente tóxico y como única fuente de carbono, los mismos que se compararon

¹ Casilla 9756
La Paz – Bolivia
achadario@revbio.zzn.com

Revista Estudiantil de Biología – F.C.P.N. de la UMSA

² Asesora. Directora ejecutiva de FUND-ECO y docente de Biología de la F.C.P.N. de la U.M.S.A.

con medios sin hidrocarburos. Se utilizaron dos métodos para la determinación de la abundancia (MPN y UFC) y para obtener una idea de la riqueza se contaron morfotipos, tomando en cuenta crecimiento y dominancia en las mismas placas utilizadas para el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC). Además, se observaron diferencias en la dominancia de microorganismos usando parámetros de tamaño de colonias y abundancia. Las placas de UFC también se utilizaron para aislar los microorganismos aparentemente degradadores de hidrocarburos. Estos organismos aislados fueron sometidos a una prueba de degradación en medio líquido y otra en medio sólido.

Puntos de muestreo

El punto del Titicaca está a escasos 100 m del camino y a unos 200 m del lago entre sembradíos de maíz, y un gran número de vertientes naturales de agua. El punto del Desaguadero está a un kilómetro del pueblo del mismo nombre y a unos 250 m del río Desaguadero y del camino. Este punto también se encuentra entre sembradíos, pero estos son de quinua y papa. En ambos puntos el suelo estaba muy húmedo y parcialmente anegado, pero esto es aún más evidente en el caso del Desaguadero.

Colecta de muestras

Las muestras fueron tomadas aleatoriamente de un área de aproximadamente 10000 m², de los primeros 20 cm del suelo con un barreno tirabuzón (Alef y Nanninperi 1995; Atlas et al. 2000). Las muestras debidamente etiquetadas fueron conservadas a 4°C hasta su análisis tres días después.

Se determinó el porcentaje de humedad de la muestra. El pH fue determinado disolviendo 20g de suelo (<2mm) en 50 ml de agua destilada (Alef y Nanninperi 1995).

Medios de cultivo

Se prepararon cuatro medios de cultivo, dos sólidos y dos líquidos. Las sales fueron las mismas para todos los medios, colocándose 4,3g K₂HPO₄, 3,4g KH₂PO₄, 2,0g (NH₄)SO₄ y 30g NaCl₂ por litro de agua destilada. En dos de los medios (uno sólido y otro líquido) se añadieron 0,9g de extracto de carne por litro y en los medios sólidos se añadieron 15g de agar bacteriológico. De esta forma se obtuvo un medio sólido sin extracto de carne (MSC), un medio líquido sin extracto de carne (MLSC), un medio sólido con extracto de carne (MCC) y un medio líquido con extracto de carne (MLCC). El extracto de carne proporcionó medios más completos, con aminoácidos libres, péptidos y factores de crecimiento.

Abundancia de microorganismos

Recuento de UFC

Para cada muestra se disolvieron 20g de suelo tamizado con 2mm (Colores G. et al. 2000) en 50ml de agua destilada estéril. A partir de esta solución se prepararon diluciones de 1:100, 1:10000 y 1:1000000. Luego se sembraron 100µl de cada una de las diluciones en 6 cajas petri con medio sin extracto de carne (MSC) y en 6 cajas petri con medio con extracto de carne (MCC). A la mitad de las cajas con MSC y MCC se les añadió 200µl de aceite de motor obteniéndose así 3 cajas con

medio sin extracto de carne con aceite (MSCA) y 3 cajas con extracto de carne y aceite (MCCA) para cada dilución. Después de preparadas e inoculadas las placas se las cultivó a 25°C, realizando controles a las 24 horas y 48 horas, y contándolas a 7 días y 14 días.

Los datos obtenidos se analizaron por la prueba *t* para dos tratamientos, tal como recomienda Alef K. (1995). Para comparar más de dos tratamientos se utilizó ANOVA. Utilizando para ello el programa ESStats Lite, versión 1.2.0.201.

Recuento con MPN

De la misma forma que para el recuento de UFC se prepararon 4 diluciones: 4×10^{-3} , 4×10^{-5} , 4×10^{-7} y 4×10^{-9} g. Luego se sembraron 100µl de cada dilución en 6 tubos con medio líquido sin extracto de carne (MLSC) y en 6 tubos con medio líquido con extracto de carne

(MLCC). A la mitad de los tubos de cada medio se les añadió 200µl de aceite de motor. De esta forma se obtuvieron 12 tubos con MLSC, 12 con medio líquido sin extracto de carne con aceite (MLSCA), 12 con MLCC y otros 12 con medio líquido con extracto de carne y aceite (MLCCA). Para los cálculos de MPN se utilizó el programa *MPN Calculator* de Mike Curiale versión 14.

Los datos obtenidos se analizaron por la prueba *t* para dos tratamientos, tal como recomienda Alef K. y Nannipieri P. (1995). Para comparar más de dos tratamientos se utilizó ANOVA. Utilizando para ello el programa ESStats Lite, versión 1.2.0.201.

Abundancia de microorganismos degradadores de hidrocarburos

Durante 49 días se evaluó el MPN tomando como crecimiento positivo la degradación de 200µl aceite. De esta forma se obtuvo un número aproximado de los microorganismos degradadores de hidrocarburos presentes (Macnaughton S. et al. 1999).

Número de morfotipos

El análisis de riqueza se hizo simplemente por recuento de morfotipos en las placas con diluciones de 4×10^{-3} y 4×10^{-5} g. El número de morfotipos fue luego promediado y tratado estadísticamente de la misma forma que los datos de abundancia.

Además de la riqueza se observó si es que había una clara predominancia de algún microorganismo, realizándose una comparación del crecimiento, tamaño de la colonia, en las placas con y sin hidrocarburos. Las placas fueron fotografiadas y filmadas con aproximación para tener una comparación menos ambigua.

Aislamiento de cepas potencialmente degradadores

Las cepas fueron aisladas inicialmente por duplicado en MCC. Para asegurar el aislamiento se sembraron las cepas aisladas por desgaste en el medio MCC. Luego fueron repicadas y probadas en MLCCA tomando con el asa las colonias del área donde habría mayor desgaste en la siembra.

Después de someter las cepas a la prueba de degradación en los mismos MLCCA se las resembró en MCC para su descripción y para verificar que no haya contaminación.

Prueba de degradación

La degradación fue verificada mediante una variación de la prueba descrita por April et al. (1999). Brevemente se trata de comparar el crecimiento (tamaño relativo de la colonia) de los microorganismos en medio sólido con aceite y en medio sólido sin aceite. En esta prueba April y sus colegas asumen que los microorganismos que tienen un mayor crecimiento en aceite son degradadores. Para mejorar la prueba se utilizaron cuatro medios (MCC, MCCA, MSC y MSCA). Se asumió que los microorganismos que crecieron mejor en MSCA eran degradadores y se los aisló para otra prueba de degradación.

La segunda prueba de degradación se utilizó para verificar que estos microorganismos sean realmente degradadores de hidrocarburos. Esta segunda prueba consistió en aislar a cada microorganismo en MLCCA y observar si eran capaces de degradar 200µl de aceite. Se tomó el tiempo aproximado de degradación total para calcular la tasa aproximada de degradación.

RESULTADOS

El pH de la muestra del Desaguadero fue de 7,42; mientras que el pH del Titicaca fue de 6,11. La humedad relativa en el Desaguadero fue del 20% en peso, mientras que en el Titicaca fue del 14,14%.

Abundancia por UFC

Los datos de UFC obtenidos para la muestra del Desaguadero a los 7 días (Cuadro 1) muestran una diferencia significativa (con un nivel de confianza del 95%) en la abundancia promedio de microorganismos entre el MSC y MSCA, y entre MCC y MCCA (figura 1A). Mientras que las diferencias entre MCCA y MSC, y entre MCC y MSCA no son significativas (Figura 1A). A los 14 días (Cuadro 1) la única diferencia fue que la diferencia entre MSC y MSCA dejó de ser significativa (Figura 1B). La diferencia entre MCC y MCCA también se redujo, pero se mantuvo significativa (Figura 1B).

Cuadro 1. Recuento de UFC en las muestras del Desaguadero (Des.) y del Titicaca (Tit.)

Tratamiento	7 días Des.	14 días Des.	7 días Tit.	14 días Tit.
MCC	3,50E+07	5,50E+07	2,58E+07	2,58E+07
MCCA	9,59E+05	9,20E+06	3,38E+08	2,60E+08
MSC	8,30E+05	8,80E+06	1,75E+05	1,67E+06
MSCA	1,83E+07	2,00E+07	6,50E+07	7,50E+07

A diferencia de lo observado en el Desaguadero, en la muestra del Titicaca (Cuadro1) las diferencias entre los tratamientos fueron significativas en todas las comparaciones con al menos un 95% de confianza (Figura 2).

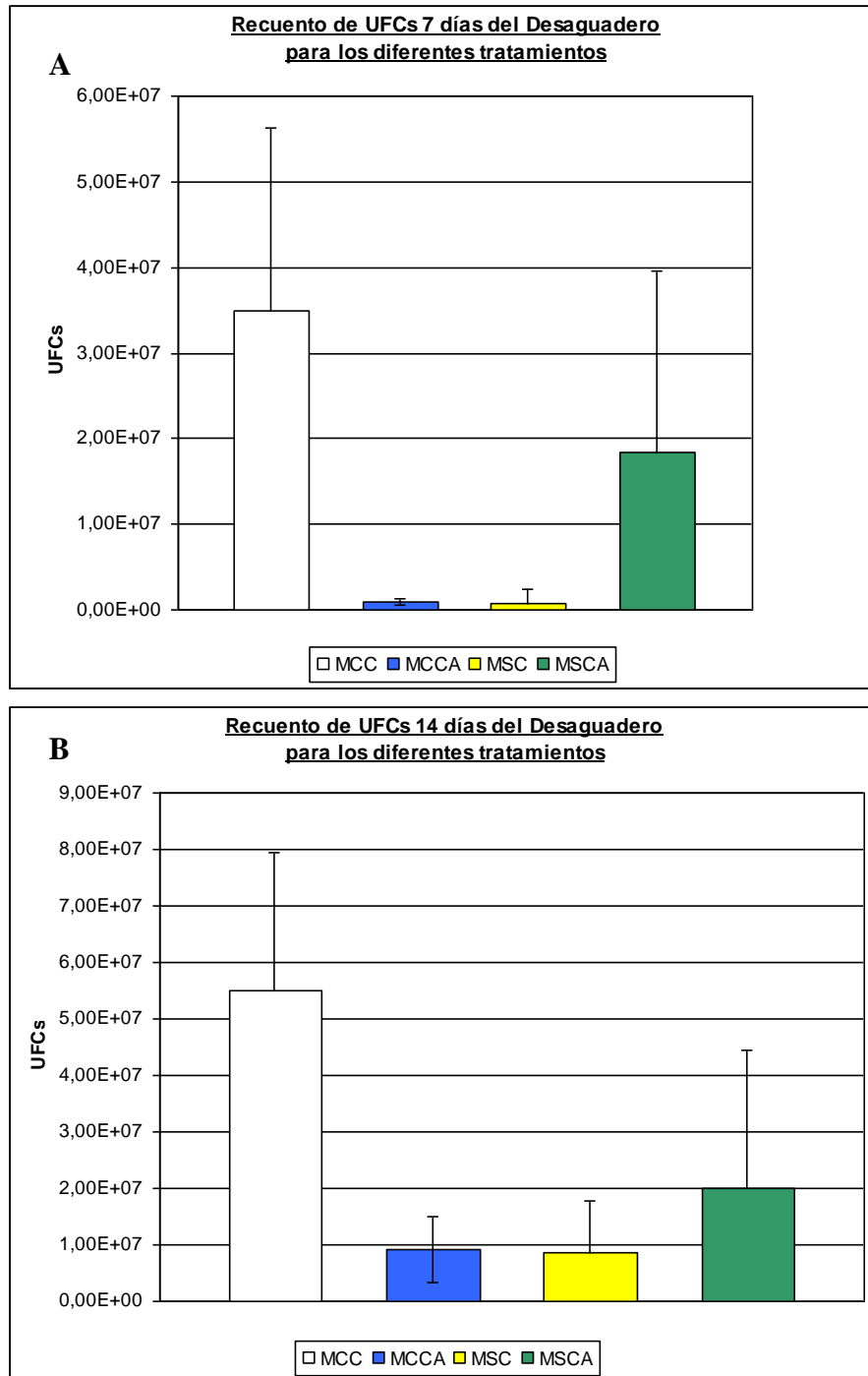


Figura 1. Comparación de la abundancia de microorganismos en la muestra del Desaguadero por tratamiento, evaluada mediante recuento de UFCs. Datos obtenidos a los 7 (A) y 14 (B) días.

Se observó una mayor abundancia en MCCA que en el MCC (figura 2) y a su vez una mayor abundancia en MSCA que en MSC (figura 2). De la misma forma se observó una mayor abundancia en MCCA con relación a MSCA (figura 2) y en MCC con relación a MSC (figura 2). Se verificó que las diferencias eran significativas mediante Anova con un 95% de confianza. Confirmándose de esta forma que las diferencias son significativas.

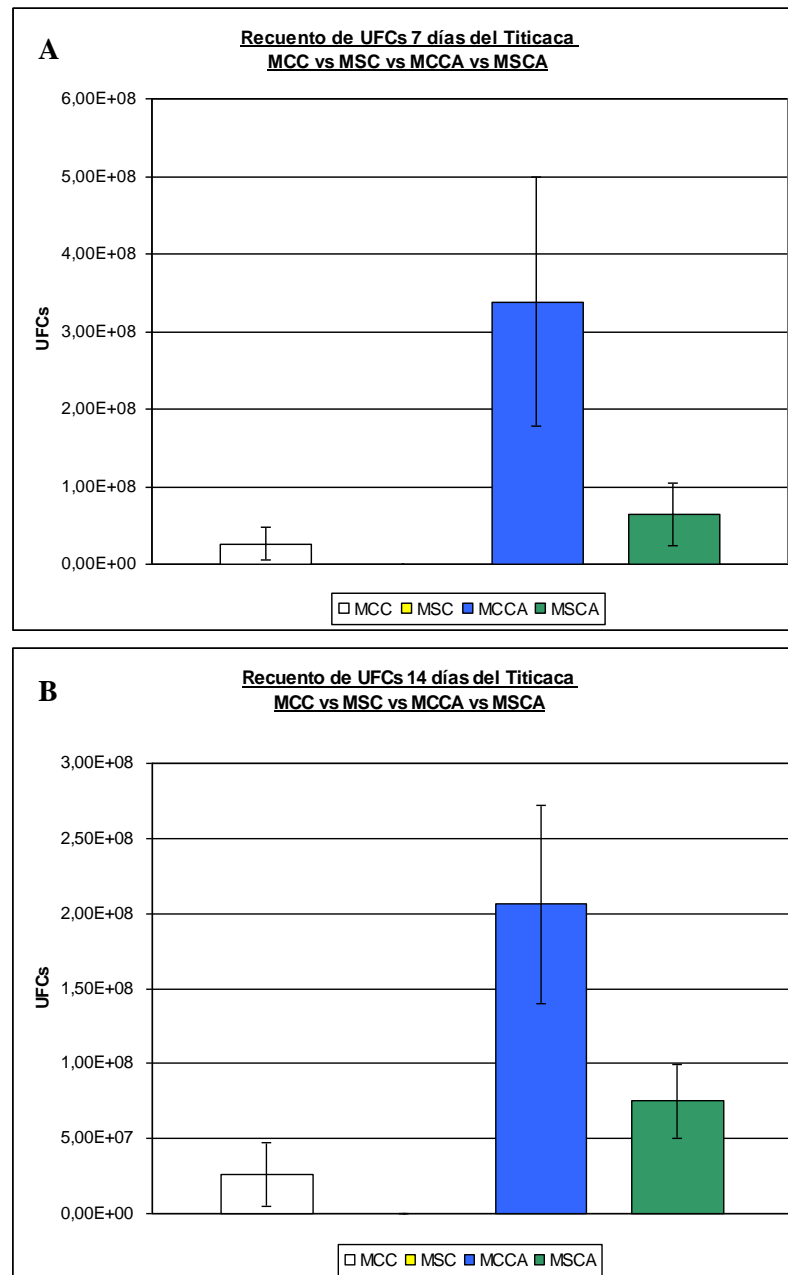


Figura 2. Comparación de la abundancia de microorganismos en la muestra del Titicaca por tratamiento, evaluada mediante recuento de UFCs. Datos obtenidos a los 7 (A) y 14 (B) días.

Abundancia por MPN

Tabla 2: Numero Más Probable de Río Desaguadero

Tiempo	7 días	14 días	21 días
MLCC	1,20E+03	1,20E+03	1,20E+03
LI 95%*	1,20E+02	1,20E+02	1,20E+02
LS 95%	1,10E+04	1,10E+04	1,10E+04
MLCCA	2,70E+04	1,20E+05	1,20E+05
LI 95%	6,30E+03	1,10E+04	1,10E+04
LS 95%	1,10E+05	1,40E+06	1,40E+06
MLSC	0,00E+00	0,00E+00	8,30E+01
LI 95%	0,00E+00	0,00E+00	9,80E+00
LS 95%	0,00E+00	0,00E+00	7,00E+02
MLSCA	0,00E+00	4,30E+06	4,30E+06
LI 95%	0,00E+00	1,10E+06	1,10E+06
LS 95%	0,00E+00	1,70E+07	1,70E+07

*LI y LS 95% corresponden al limite inferior y superior respectivamente con un 95% de confianza

Tabla 3: Numero Más Probable de lago Titicaca

Tiempo	7 días	14 días	21 días
MLCC	5,00E+04	5,00E+04	5,00E+04
LI 95%*	1,20E+04	1,20E+04	1,20E+04
LS 95%	2,00E+05	2,00E+05	2,00E+05
MLCCA	1,70E+03	1,70E+03	1,20E+05
LI 95%	6,20E+01	6,20E+01	1,10E+04
LS 95%	4,90E+04	4,90E+04	1,40E+06
MLSC	0,00E+00	0,00E+00	1,00E+02
LI 95%	0,00E+00	0,00E+00	1,40E+01
LS 95%	0,00E+00	0,00E+00	7,20E+02
MLSCA	0,00E+00	6,00E+02	7,90E+02
LI 95%	0,00E+00	1,40E+02	1,50E+02
LS 95%	0,00E+00	2,60E+03	4,10E+03

*LI y LS 95% corresponden al limite inferior y superior respectivamente con un 95% de confianza

En el análisis de MPN en diferentes medios se tomaron en consideración todos los tipos de crecimiento visibles como positivos. Además, se tomó nota de cada tipo de crecimiento realizándose un análisis desglosado de cada uno (datos no presentados). Los datos fueron tomados cada 7 días hasta los 35 días, pero no hubieron variaciones después de los 21 días, por lo que solo son presentados los datos hasta los 21 días (tabla 2 y 3).

En el caso del Desaguadero (tabla 2) se encontró un MPN significativamente mayor en MLCCA con relación al MLCC y un MPN significativamente mayor para MLSCA con relación al MLSC (figura 3). El que alcanzó el mayor MPN al cabo de los 21 días fue el MLSCA (figura 3). Se observa que en todos los medios el MPN tiende a incrementarse en el tiempo.

En el caso del Lago Titicaca se encontró (tabla 3), al igual que en el Desaguadero, que el MPN de MLCCA es mayor que el de MLCC (figura 4) y el MPN de MLSCA es mayor que el de MLSC (figura 4). A diferencia de lo observado en el caso del Desaguadero se encontró que el medio con mayor MPN fue el MLCCA (figura 3) y no el MLSCA.

En ambas muestras los mayores MPN se presentaron en los tratamientos con aceite.

Abundancia de microorganismos degradadores

Después de determinar el MPN por simple crecimiento visible, se paso a considerar la degradación de los hidrocarburos en MLSCA y MLCCA como crecimiento positivo y la no degradación como crecimiento negativo. De esta forma se calculó el MPN de microorganismos degradadores de hidrocarburos. La observación se hizo hasta la séptima semana (49 días) después de la inoculación. Los datos se presentan en las tablas 4 y 5. Tanto en la muestra del Desaguadero como en la del lago Titicaca se observa que el mayor número de microorganismos degradadores se da en el MLSCA (figura 5). De la misma forma se observó que hay una mayor abundancia de microorganismos degradadores en la muestra del Desaguadero que en la del Titicaca.

Tabla 4: MPN de degradadores de hidrocarburos, Desaguadero

Tiempo	35 días	42 días	49 días
MLCCA	4,2E+02	7,9E+02	2,5E+04
LI 95%*	1,0E+02	1,5E+02	5,7E+03
LS 95%	1,7E+03	4,1E+03	1,1E+05
MLSCA	1,2E+05	8,3E+05	8,3E+05
LI 95%	1,2E+04	9,8E+04	9,8E+04
LS 95%	1,1E+06	7,0E+06	7,0E+06

*LI y LS 95% corresponden al límite inferior y superior respectivamente con un 95% de confianza

Tabla 5: MPN de degradadores de hidrocarburos, Titicaca

Tiempo	35 días	42 días	49 días
MLCCA	0,0E+00	1,0E+02	1,0E+02
LI 95%*	0,0E+00	1,4E+01	1,4E+01
LS 95%	0,0E+00	7,2E+02	7,2E+02
MLSCA	7,9E+02	1,0E+03	1,0E+03
LI 95%	1,5E+02	1,4E+02	1,4E+02
LS 95%	4,1E+03	7,2E+03	7,2E+03

*LI y LS 95% corresponden al límite inferior y superior respectivamente con un 95% de confianza

Número de morfotipos y análisis de dominancia

En placas con los distintos tratamientos utilizados se procedió al recuento de morfotipos y a la evaluación de las diferencias en la dominancia. Para el recuento de morfotipos se tomo en cuenta solo la dilución 4×10^{-3} g por ml⁻¹. En la muestra del Desaguadero se encontró que no había diferencia significativa entre el número de morfotipos de MCC y MCCA a los 14 días después de la inoculación, pero sí entre MSC y MSCA donde éste último tenía el mayor número (tabla 6). A los 21 días después de la inoculación se encontró que MCC y MCCA tenían prácticamente el mismo número de morfotipos, mientras que MSCA se mantenía con un número de morfotipos significativamente mayor al observado en MSC (tabla 6 y figura 6A). Además, se observó que en MSCA las colonias eran significativamente más grandes que las del MSC (figura 7). Más aún en el MSC era muy difícil observar las colonias debido a su reducido tamaño.

En el caso de la muestra del lago Titicaca se consideraron los datos tomados a los 7 y a los 14 días después de la inoculación (tabla 7). A diferencia de lo observado en la muestra del Desaguadero, el número de morfotipos en MCC fue significativamente mayor al del MCCA y la diferencia entre MSC y MSCA no fue significativa a los 7 días. A los 14 días la diferencia entre MCC y MCCA se mantuvo significativa aunque se redujo un poco (figura 6). Al mismo tiempo se observó una mayor diferencia entre MSC y MSCA, en la que el MSC presentaba un número de morfotipos significativamente mayor que MSCA (figura 6). Los datos a los 21 días para la muestra del lago no son presentados debido a que son los mismos que los obtenidos a los 14 días. En las placas con aceite (MSCA y MCCA) se evidenció una clara predominancia de hongos filamentosos que muchos de los casos llegaron a cubrir gran parte o el total de placa (figura 7). Estas observaciones sugieren que la riqueza de microorganismos en la muestra del Titicaca se ve negativamente afectada por los hidrocarburos.

Las comparaciones del crecimiento de microorganismos en placa en los diferentes medios (MSC, MSCA, MCC y MCCA) dio una mejor idea sobre como habría variado la diversidad de los microorganismos por la presencia de los hidrocarburos. Tanto en la muestra del Desaguadero (figura 7) como en la del Titicaca (figura 7) se observó una dominancia clara de hongos filamentosos que parecen verse favorecidos por la presencia de hidrocarburos. Estos hongos fueron, más adelante, evaluados en su capacidad de degradación estos compuestos.

La comparación detallada de las placas de los distintos medios sugiere que existe un claro efecto de los hidrocarburos en la composición de la población microbiana en ambos suelos. Al mismo tiempo sugiere que el efecto en los suelos no es el mismo, debido a que en la muestra del Titicaca se

observa una reducción drástica de la riqueza a tiempo que en el Desaguadero parece haber más bien un proceso de desplazamiento en el que hongos filamentosos pasan a ser predominantes.

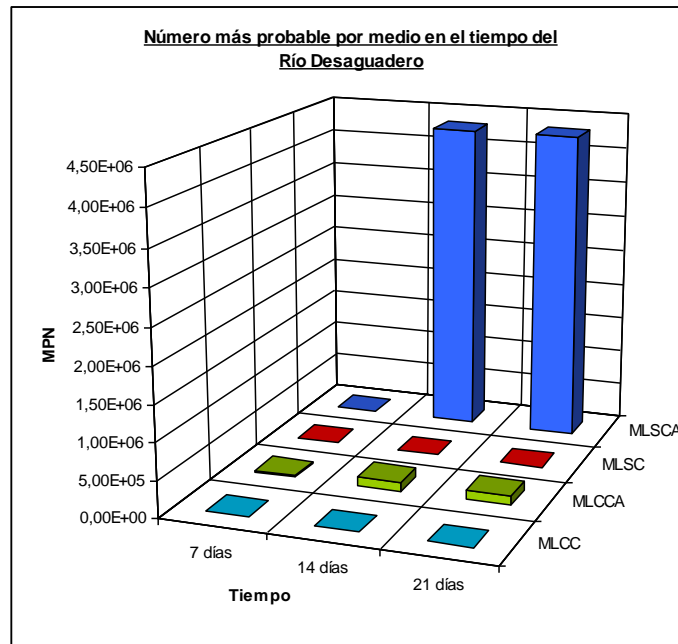


Figura 3. Comparación del número más probable de microorganismos por tratamiento, muestra del Desaguadero. Los medios con aceite son los que presentan la mayor cantidad de microorganismos.

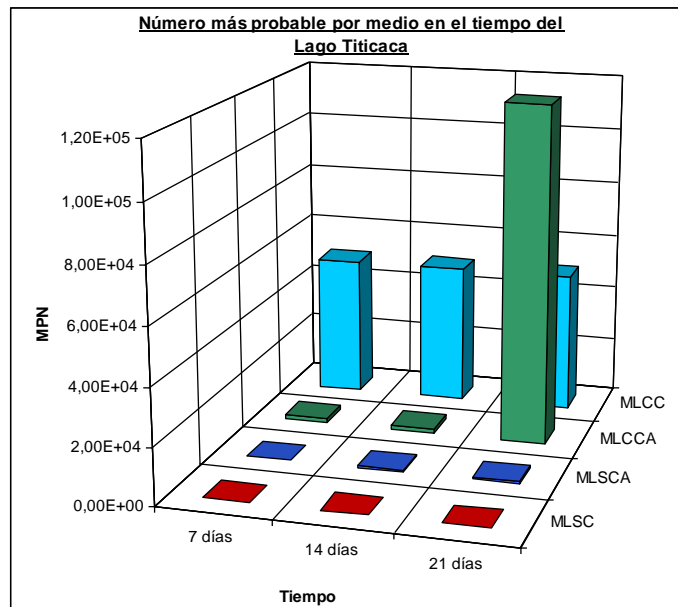


Figura 4. Comparación del número más probable de microorganismos por tratamiento, muestra del Titicaca. Los medios con extracto de carne son los que presentan mayor cantidad de microorganismos.

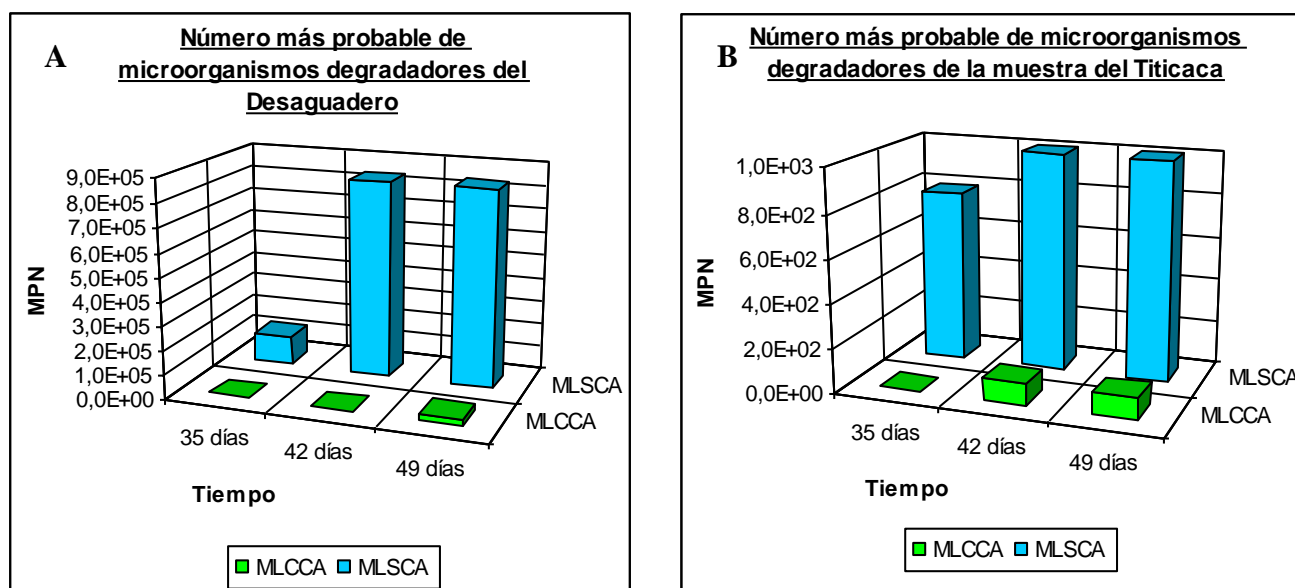


Figura 5. Comparación de los números más probables de microorganismos degradadores de hidrocarburos de la muestra del Desaguadero (A) y de la muestra del lago Titicaca (B). Se observa que la mayor abundancia se da en ambos casos en el MLSCA. También se observa que la abundancia es mayor en el Desaguadero.

Aislamiento de cepas potencialmente degradadoras

Las cepas seleccionadas para su aislamiento fueron 3 provenientes del Desaguadero y 4 provenientes del Titicaca. Las cepas fueron escogidas fundamentalmente en función a 2 parámetros propuestos por April y sus colegas en 1999. El primero es el que la cepa haya podido desarrollarse en un medio con una capa de hidrocarburos. El segundo es que su desarrollo haya sido semejante o superior al observado en la placa sin hidrocarburo, pero en este caso solo se consideró las cepas que habrían tenido un mayor desarrollo en el medio con hidrocarburos y sin extracto de carne (MSCA), ya que existe la posibilidad de que la cepa esté utilizando a los aminoácidos como una fuente alternativa de carbono. Esto podría llevar a confundir a las cepas degradadoras de las resistentes. Además, solo se escogió a las cepas más representativas o predominantes en las placas.

Todas las cepas seleccionadas fueron hongos filamentosos por lo que recibieron las siguientes denominaciones: Los provenientes del Desaguadero fueron denominados HD1, HD2 y HD3, y los provenientes del Titicaca HL1, HL2, HL3 y HL4. Aunque el medio no era lo más aconsejable para estos hongos se mantuvo el medio previamente utilizado y se realizó una siembra con estría para aislamiento por desgaste. Luego fueron sometidos a una prueba de degradación en medio líquido.

Tabla 6: Recuento de morfotipos en la muestra del Desaguadero

Medio	Dilución	14 días	21 días
MCC	0,004 g/ml	16,33	15,33
MCCA	0,004 g/ml	13,67	15,33
MSC	0,004 g/ml	6,67	8,33
MSCA	0,004 g/ml	11,33	11,33

Tabla 7: Recuento de morfotipos en la muestra del Titicaca

Medio	Dilución	7 días	14 días
MCC	0,004 g/ml	15,00	19,00
MCCA	0,004 g/ml	7,33	12,00
MSC	0,004 g/ml	5,67	16,67
MSCA	0,004 g/ml	4,33	6,33

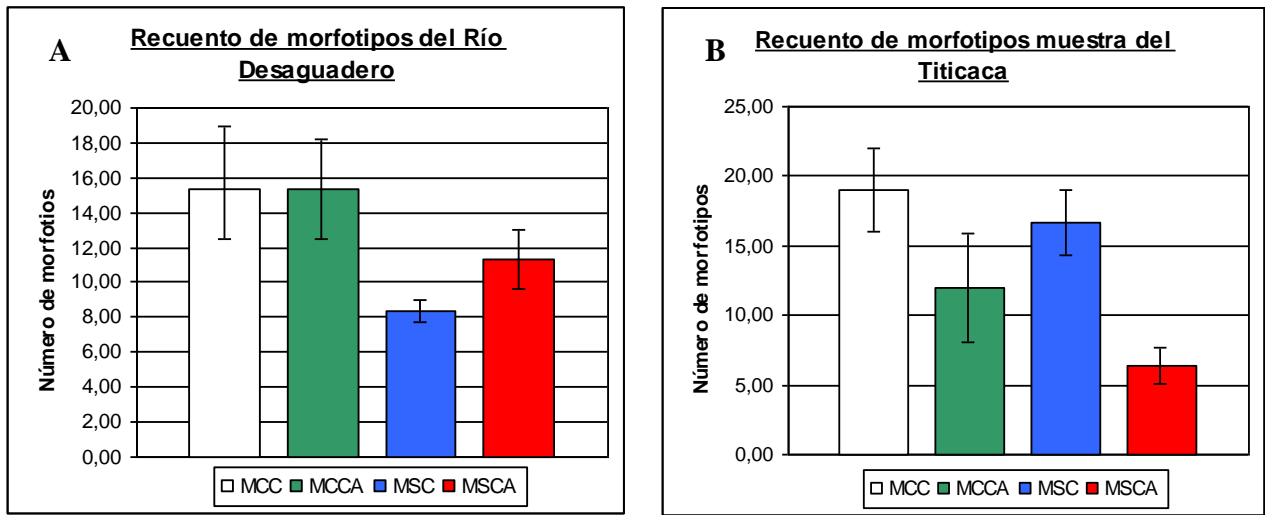
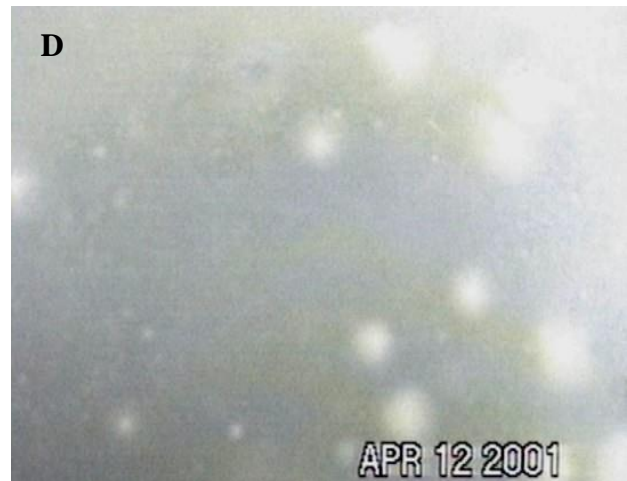
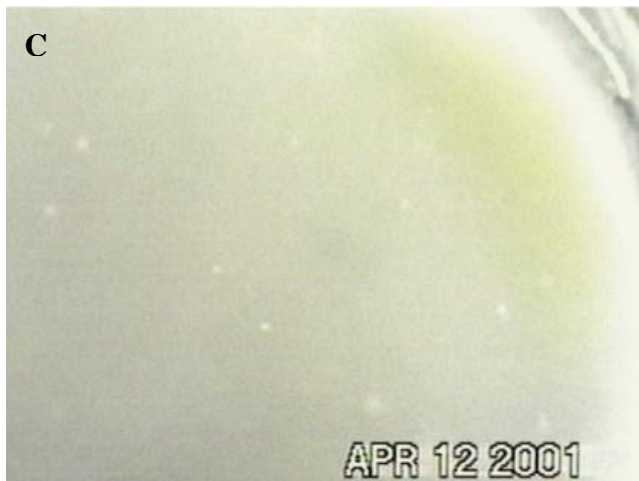
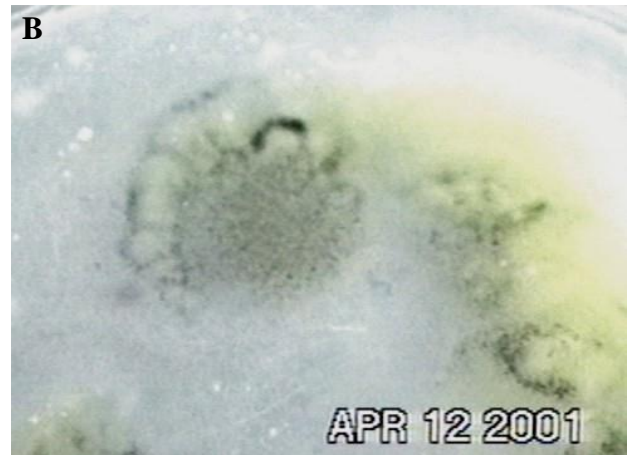


Figura 6. Recuento de morfotipos a los 21 días (A) de la muestra del río Desaguadero y (B) a los 14 días de la muestra del lago Titicaca



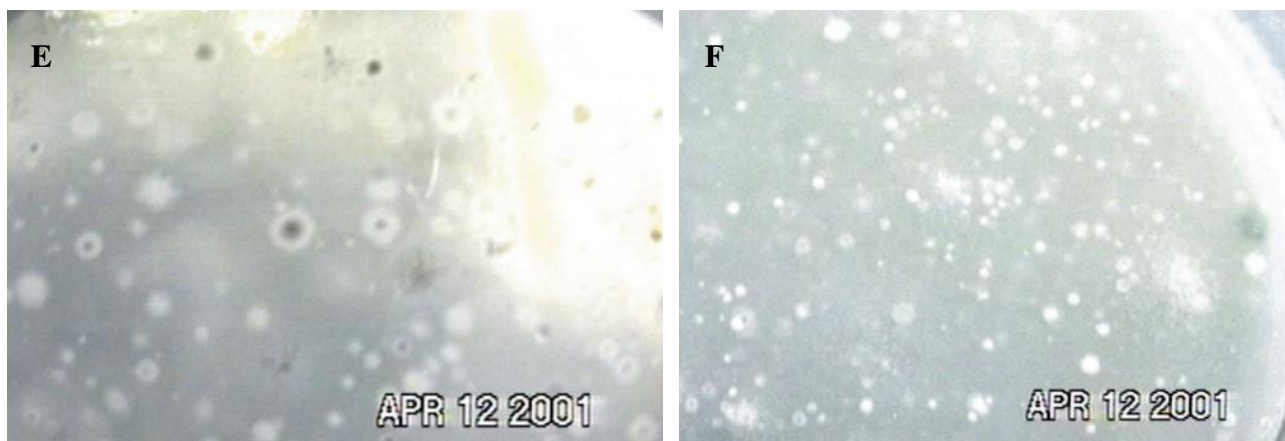


Figura 7. Se observa como en el MCCA (A y C) y en el MSCA (B y D) existe una clara predominancia de hongos filamentosos. Esto es valido tanto para la muestra del Desaguadero (A y B) como para la muestra del Titicaca (C y D), que se diferencian en que en el primer caso se mantiene bastante diversidad mientras que en el segundo hay muy poca diversidad. En contraste en el MSC (E y F) no hay una dominancia ni de los hongos ni de algún otro grupo, habiendo mayor riqueza

Prueba de degradación

La primera prueba de degradación de las cepas seleccionadas está implícita en el proceso mismo de selección. Si la cepa es degradadora se esperarí que tenga un mayor crecimiento en presencia de los hidrocarburos que en su ausencia. Este mayor desarrollo se debería a que utiliza a estos compuestos como fuente de carbono. La segunda prueba es más clara y definitiva porque solo considera la degradación claramente visible del hidrocarburo por la cepa.

Las cepas aisladas fueron sembradas en MLCCA y durante dos semanas se controló si es que había una degradación visible del hidrocarburo de la superficie. Ya a los 7 días se observó una significativa degradación de los hidrocarburos con una clara reducción del volumen del volumen de hidrocarburos en el medio.

A los 14 días la degradación de los hidrocarburos era a simple vista casi total, en la mayor parte de los casos (figura 8). Esto también permitió calcular una tasa de degradación de los hidrocarburos de aproximadamente $14,29\%$ por día en condiciones ideales. Sin embargo esta estimación es sumamente relativa.

El crecimiento de las distintas cepas se dio coincidentemente en la parte superficial del medio, donde se encontraba flotando el aceite (figura 8). Todas las cepas crecieron en forma de una densa masa de hifas tan compacta en algunos casos que era posible poner el medio de cabeza sin que el líquido cayera. Es decir, que la masa era tan compacta que actuaba como una especie de tapón.

En uno de los casos se observó que el medio de cultivo había cambiado de color. Este cambio de color quizá se debe a la degradación incompleta de los hidrocarburo y a la emulsificación de los restantes.

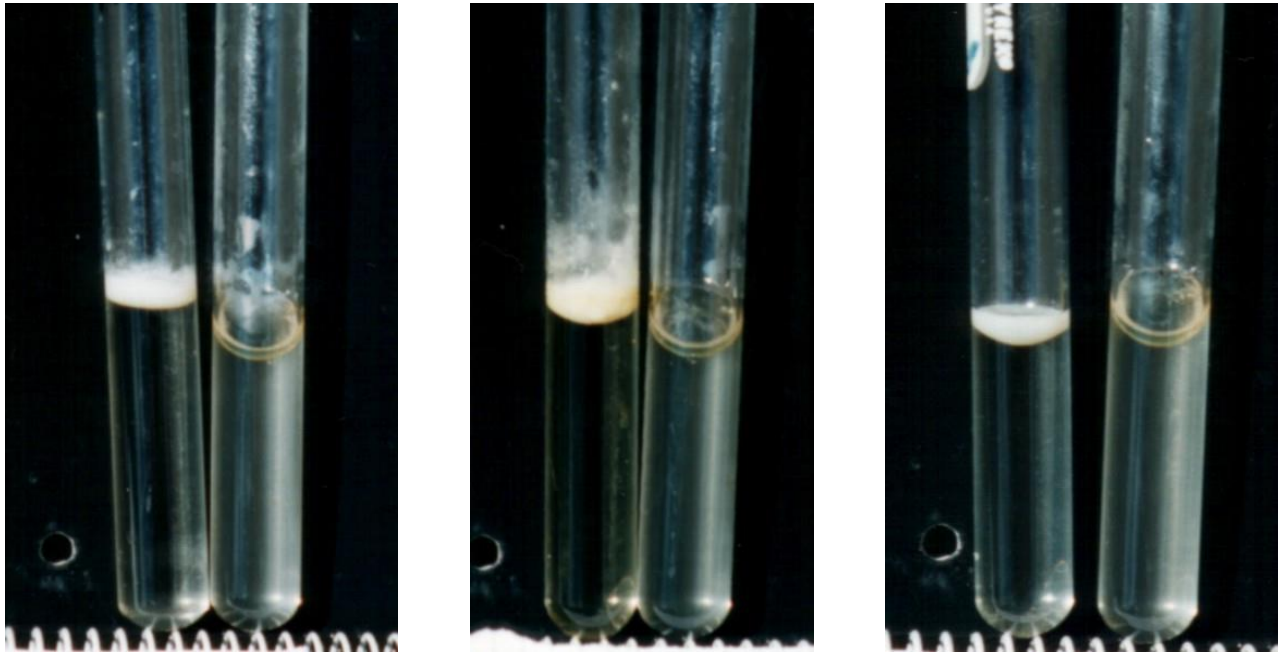


Figura 8. Prueba de degradación en medio líquido con carbono y con 200 ul de aceite de motor. El positivo de degradación debe consumir la mayor parte del hidrocarburo en la superficie. A la izquierda el tubo con la cepa siendo probada y a la derecha el tubo control negativo, que como se puede ver presenta el aceite intacto. Las cepas siendo evaluadas son hongos filamentosos provenientes del Titicaca (C) y del Desaguadero (A y B). A) HD1, B) HD3 y C) HL2

DISCUSIONES

La abundancia de microorganismos en la muestra del río Desaguadero determinada por recuento de UFC mostró ser significativamente afectada por los hidrocarburos. En el caso de los medios con extracto de carne se pudo evidenciar un efecto aparentemente tóxico, ya que en MCCA se observó una abundancia mucho menor a la encontrada en MCC (figura 1). Sin embargo, el efecto de los hidrocarburos fue el inverso en el caso del medio sin extracto de carne, ya que la abundancia en MSCA es mayor que la observada en MSC (figura 1A). Esto sugiere que en este caso el aceite posibilitó el desarrollo de más microorganismos seguramente por haber proporcionado una fuente de carbono inexistente en MSC.

En conjunto, lo observado en los medios con extracto y en los medios sin extracto para la muestra del Desaguadero sugieren que existen microorganismos capaces de utilizar a los hidrocarburos como fuente de carbono. Además, sugieren que, como se esperaba, el extracto de carne no solo sirve como fuente de aminoácidos libres, péptidos y factores de crecimiento, sino que además sirve como fuente de carbono.

En realidad se esperaría que el MCCA presente la mayor abundancia debido a que tiene una composición más completa que debería permitir el desarrollo de los que utilizan los hidrocarburos

más los que solo requieren del extracto, sin embargo tiene prácticamente la misma abundancia que el MSC. Esto podría deberse, como ya se señaló, a que los hidrocarburos resultan tóxicos, pero también a que la combinación del extracto de carne y los hidrocarburos dan una ventaja muy amplia a los microorganismos capaces de utilizar los hidrocarburos. Es decir que estos microorganismos desplazan al resto, lo que se puede verificar al comparar las placas (figura 7).

A los 14 días se observó que la diferencia entre MSC y MSCA se volvía insignificante. Lo que no implica que el efecto de los hidrocarburos haya desaparecido, sino que este efecto fue menor a nivel de la abundancia (Macnaughton et al. 1999). No obstante, la poca significancia de las diferencias entre los tratamientos esta ligada a una elevada desviación estándar, atribuible a que las diluciones sucesivas para el estudio no eran de 1:10 como suele recomendarse (Madigan et al. 1998; Alef K. y P. Nannipieri, 1995). Las diluciones sucesivas fueron de 1:100 lo que podría haber incrementado la desviación estándar (Alef K. y P. Nannipieri, 1995).

Los datos de MPN para el Desaguadero contradicen la mayor parte las diferencias entre tratamientos encontrada por recuento en placa de UFC. La excepción se da en el caso de la diferencia entre MSC y MSCA. Según el MPN el MLSCA tiene más microorganismos que el MSC. Es importante tratar los datos de MPN con mucho cuidado ya que si bien los medios tienen básicamente la misma composición que sus homólogos sólidos, la técnica considera solamente a los microorganismos cuyo crecimiento es claramente visible en el medio líquido (Alef K. y P. Nannipieri, 1995). Es decir, que resulta difícil comparar los datos de MPN y UFC. Más aún, se ha encontrado mucha diferencia en la cantidad de microorganismos encontrada por cada método.

En el caso de que no haya una diferencia significativa en la abundancia de microorganismos por efecto de los hidrocarburos, a pesar de un fuerte efecto en la riqueza, se pone en duda la utilización de la biomasa microbiana como indicador del impacto de los hidrocarburos. Ello porque la abundancia de microorganismos puede no variar a pesar de la fuerte contaminación, ya que parece ser que tal contaminación provoca un proceso de sustitución y no necesariamente de reducción de la población microbiana. Es decir que estudios de abundancia deben ser complementados con estudios de riqueza u otros más específicos para ser fiables como indicadores de impacto ambiental.

En el caso de la muestra del lago Titicaca las diferencias encontradas por medio del recuento de UFC en placa sí fueron significativas con al menos un 95% de confianza, en todos los casos. Las desviaciones estándar fueron también grandes, aunque no tan grandes como las observadas en el caso del Desaguadero. Sin embargo, el que las diferencias sean significativas en todos los casos se atribuye fundamentalmente a que las diferencias son mucho más amplias (figura 2) y no a que la desviación estándar es menor. Estos datos sugieren que los hidrocarburos sí provocan un cambio significativo en la abundancia de los microorganismos, al menos en ciertas comunidades microbianas.

La mayor abundancia en los medios con aceite (figura 2A y B) plantea que al menos ciertos microorganismos fueron favorecidos por la presencia de los hidrocarburos y que de alguna forma utilizan este recurso. La diferencia encontrada entre MCCA y MSCA sugiere que muchos de estos microorganismos favorecidos en el medio con aceite no necesariamente lo utilizan como fuente de carbono o que requieren algo proporcionados por extracto de carne. Por otro lado, la diferencia entre el MSC y el MSCA, tanto en el número de UFC (figura 2) como en el tamaño de las colonias (figura

7) sugiere que hay microorganismos que utilizan a los hidrocarburos como fuente de carbono (April et al. 2000) sin necesitar más que las sales proporcionadas.

Los datos de MPN para la muestra del lago Titicaca muestra diferencias poco significativas dados los amplios intervalos de confianza. Algunos datos son en cierta medida contradictorios con los obtenidos por recuento de UFC y podrían explicarse en relación a que posiblemente no muchos de los microorganismos considerados en el recuento de UFC tenían un crecimiento discernible en medio líquido. De todas formas las diferencias entre MLCC y MLCCA, y entre MLSC y MLSCA respaldan plenamente lo observado por recuento de UFC.

Por los datos de abundancia parecería que no existe un efecto tóxico sobre los microorganismos, pero ello queda descartado mediante la comparación de las placas (figura 7) y por las diferencias en el número de morfotipos entre MSC y MSCA (figura 6). Es decir, que en este caso parece que la diferencias en abundancia no son un buen indicador del impacto de los hidrocarburos. Esto respalda la hipótesis de que no se puede utilizar solamente la abundancia de microorganismos como indicador de impacto de los hidrocarburos. Además, los datos colectados para la muestra del Titicaca plantean que no es posible utilizar un mismo modelo para cada caso, ya que existen grandes diferencias entre lo encontrado en esta muestra y en la del Desaguadero.

De acuerdo a las comparaciones del crecimiento en las placas (figura 7) y el recuento de morfotipos (figura 6), se pudo determinar que los cambios más significativos de la diversidad microbiana se dieron a nivel de la riqueza, en el caso del suelo del Titicaca, y a nivel de la composición de la comunidad microbiana tanto para la del Titicaca como para la del Desaguadero. En ambos casos se pudo observar que los hongos filamentosos pasaban a ser predominantes en las placas con aceite (figura 7), desplazando a la mayor parte de las bacterias, mientras que en las placas sin aceite no se podía distinguir una clara dominancia (figura 7). Esto no es de extrañarse ya que otros estudios más finos han reportado que en determinados cambios de condiciones ambientales ciertos grupos llegan a desplazar a otros (Skirnisdottir S. 2000; Borneman J. y E. Triplett, 1997) y también se ha visto ese fenómeno durante procesos de bioremediación de derrames petroleros (Macnaughton S. et al. 1999).

El que hayan sido los hongos los que hayan desplazado a los demás microorganismos en las placas con aceite, en especial en el caso de la muestra del Titicaca, puede atribuirse a una serie de ventajas que presentan los hongos filamentosos en la utilización de hidrocarburos como fuente de carbono (Atlas T. Et al. 2000). A diferencia de las bacterias los hongos no se ven restringidos en su crecimiento debido al ambiente hidrofóbico generado por los hidrocarburos (Atlas T. Et al. 2000). Muchos hongos pueden introducir sus hifas en ambientes anóxicos, son xero y osmotolerantes, y poseen enzimas extracelulares que pueden ayudar al metabolismo inicial de estos compuestos (Atlas T. et al. 2000).

La selección de las cepas para ser evaluadas por la segunda prueba de degradación se baso en la comparación del crecimiento en MSCA y MSC, ya que un mayor crecimiento en MSCA sugiere que el microorganismo utiliza al menos uno de los hidrocarburos presentes como fuente de carbono (Atlas T. et al. 2000). Esta selección podría ser discutible pero una prueba semejante fue aplicada en un estudio de degradación de hidrocarburos en Canadá y comparada con una prueba con cromatografía de gases (Atlas T. et al. 2000) encontró una coincidencia entre ambas pruebas muy aceptable. En ese estudio solo hubieron 3 de 64 que dieron positivo en la prueba de crecimiento y no

dieron positivo en la prueba con cromatografía gaseosa, lo que implica que hay un error en la prueba de crecimiento en placa de solo 4,7% en relación a la otra prueba. Si bien esto no certifica la prueba de crecimiento en placa con el hidrocarburo, le ofrece el necesario respaldo.

La segunda prueba solo permite aceptar como degradadores de hidrocarburos a los que son capaces de degradar al menos una gran cantidad de ellos (figura 8) y seguramente no es lo suficientemente sensible para detectar microorganismos degradadores de solo un hidrocarburo a menos que solo se proporcione este hidrocarburo. Sin embargo, todas las cepas probadas dieron positivo a la prueba, degradando la mayor parte de los hidrocarburos presentes en los 200 µl de aceite (figura 8).

Solo se asilaron 7 cepas aunque seguramente hay muchos más microorganismos capaces de degradar hidrocarburos, pero que los métodos utilizados no permiten aislar o incluso detectar. Para ello se requiere complementar este trabajo con un estudio de diversidad y de detección de microorganismos degradadores de hidrocarburos más fino utilizando técnicas más sensibles como las moleculares (Macrae A. 2000).

De acuerdo al número más probable de microorganismos degradadores de hidrocarburos (Macnaughton S. et al. 1999) encontrado para cada sitio de muestreo se puede decir que la comunidad microbiana del punto del Desaguadero tiene mayor cantidad de microorganismos que podrían ser utilizados para impulsar un proceso de bioremediación, que el punto de Lago Titicaca. Sin embargo, aunque Macnaughton y sus colegas (1999) sugieren MPN para cuantificar los microorganismos degradadores, esta cuantificación resulta algo ambigua, ya que seguramente no todos los microorganismos degradadores pueden crecer en las condiciones del MPN. Quizá el mayor problema esté en que al adicionar los 200ml de aceite se creó un ambiente relativamente anaeróbico no viable para todos los degradadores. De todas formas este problema puede ser solucionado y el método puede proporcionar una buena aproximación al número de degradadores presentes, aunque se debe buscar la forma de respaldarlo por métodos más finos.

CONCLUSIONES

Este estudio presenta una serie de datos que permiten tener un punto de referencia sobre el efecto de los hidrocarburos y la capacidad de respuesta en suelos del Altiplano boliviano. Los datos que aporta sobre el efecto de los hidrocarburos sobre la diversidad microbiana son importantes pero deben ser complementados mediante técnicas más sensibles como métodos que utilizan el 16s RNA (Macrae A. 2000), ya que menos del 1% de los microorganismos son cultivables (Fry J. 2000; Staley et al. 1997). Sin embargo, los datos son valiosos en especial por ser de los primeros que se tienen en este campo dentro del país y dada la importancia que tiene el investigar en esta área.

Aunque los puntos seleccionados para el estudio no presentan grandes diferencias en ubicación geográfica se puede ver claramente que existe una gran diferencia en cuanto al efecto de los hidrocarburos sobre la comunidad microbiana. En el caso de la muestra tomada a orillas del Titicaca el efecto de los hidrocarburos se dio más a nivel de la riqueza y no así a nivel de la abundancia. En cambio en el caso de la muestra tomada a orillas del desaguadero el efecto se hizo más evidente a nivel de la abundancia y no tanto así a nivel de la riqueza. Lo que si parece ser válido para ambos casos es que hay un fuerte efecto sobre la composición de la comunidad microbiana.

Estos resultados plantean que no es posible utilizar solo la abundancia o riqueza de la comunidad microbiana como un indicador para el impacto de los hidrocarburos. Además, plantean claros desafíos a estudios comparativos en especial si lo que se trata es de evaluar el impacto ambiental. Sin embargo, los datos sugieren que estudios finos de diversidad podrían ser una buena alternativa para evaluar impacto ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

- ATLAS R. 1981. Microbial degradation of hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiology Reviews*, 45: 180-209 en April T. et al. 2000.
- ALEF K. y P. NANNIPIERI, 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press, San Diego EE.UU. pp. 40-42, 49-51, 146-173.
- APRIL T., J. FOGHT y R. CURRAH, 2000. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 46: 38-49.
- BORNEMAN J. y E. TRIPLETT, 1997. Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 2647-2653.
- FRY J. 2000. Bacterial diversity and 'unculturables'. *Microbiology Today* 27: 186-188.
- MACRAE A. 2000. The use of 16S rDNA methods in soil microbial ecology. *Brazilian Journal of Microbiology* 31: 77-82
- MADIGAN, M., MARTINKO, J. y J. PARKER, 1998. Brock: *Biología de los microorganismos*. 8ª edición, Editorial Prentice Hall, España, pp 156-157.
- MACNAUGHTON S., J. STEPHEN, A. VENOSA, G. DAVIS, Y. CHANG y D. WHITE, 1999. Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3566-3574.
- NYNS E., AQUIERE J. Y A. WIAUX, 1968. Taxonomic value of the property of fungi to assimilate hydrocarbons. *Antonie van Leeuwenhoek*, 34: 441-457 en Atlas et al. 2000.
- COLORES G., R. MACUR, D. WARD y W. INSKEEP, 2000. Molecular Analysis of Surfactant-Driven Microbial Population Shifts in Hydrocarbon-Contaminated Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2959-2964.
- SKIRNISDOTTIR S. G. HREGGVIDSSON, S. RLEIFSDOTTIR, V. MARTEINSSON, S. PETURSDOTTIR, O. HOLST y J. KRISTJANSSON, 2000. Influence of Sulfide and Temperature on Species Composition and Community Structure of Hot Spring Microbial Mats. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2835-2841.
- STALEY J., R. CASTENHOLZ, R. COLWELL, J. HOLT, M. KANE, N. PACE, A. SALYERS y J. TIEDJE, 1997. *The Microbial World: Foundation of The Biosphere*. American Academy of Microbiology. American Society for Microbiology

AGRADECIMIENTOS

Por supuesto a mi familia sin cuyo apoyo hubiera sido imposible realizar este trabajo. También debo un agradecimiento especial a Sergio Colque por toda la paciencia y ayuda prestada en laboratorio.