



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**PROYECTO DE TITULACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

TEMA: Evaluación del efecto de las nanopartículas metálicas de hierro elemental (NPHE) sobre la población bacteriana de suelos contaminados con TPHs (fenantreno) a nivel de laboratorio.

AUTOR: VARELA CARRIÓN CAROLINA LISETH

DIRECTOR: IZQUIERDO ANDRES. Ph.D

SANGOLQUÍ

2017



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

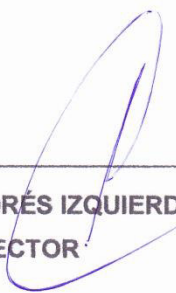
**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, **“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE HIERRO ELEMENTAL (NPHE) SOBRE LA POBLACIÓN BACTERIANA DE SUELOS CONTAMINADOS CON TPHS (FENANTRENO) A NIVEL DE LABORATORIO”** realizado por **CAROLINA LISETH VARELA CARRIÓN**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **CAROLINA LISETH VARELA CARRIÓN** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, Marzo 2017



ANDRÉS IZQUIERDO. PH.D.
DIRECTOR



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **CAROLINA LISETH VARELA CARRIÓN**, con cedula de identidad N° 1721734349 declaro que este trabajo de titulación "**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE HIERRO ELEMENTAL (NPHE) SOBRE LA POBLACIÓN BACTERIANA DE SUELOS CONTAMINADOS CON TPHS (FENANTRENO) A NIVEL DE LABORATORIO**", ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, Marzo 2017

CAROLINA LISETH VARELA CARRIÓN

C.C 1721734349



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **CAROLINA LISETH VARELA CARRIÓN**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, **"EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LAS NANOPARTÍCULAS METÁLICAS DE HIERRO ELEMENTAL (NPHE) SOBRE LA POBLACIÓN BACTERIANA DE SUELOS CONTAMINADOS CON TPHS (FENANTRENO) A NIVEL DE LABORATORIO"** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad. .

Sangolquí, Marzo 2017

CAROLINA LISETH VARELA CARRIÓN

C.C 1721734349

DEDICATORIA

A mis padres Anibal Varela y Mireya Carrión, quienes me dieron alas para triunfar y llegar lejos, por su apoyo durante cada una de las etapas de mi vida y por qué el éxito se alcanza gracias a sus sabias palabras, a mi hermano Anthony un gran artista quien pinta de colores cada uno de mis días.

A mis abuelitos Luchito, Anita, Rosa y Humberto a quienes admiro por sus dedicación y constancia, por darme su confianza y sus sabios consejos.

A mis pequeños Rafa, Arielito, Sofy y Gabo, quienes iluminan mis días con risas, besos y abrazos.

Este éxito es producto de un gran esfuerzo dedicado a cada uno de ustedes por formar parte importante de mi vida.

Carolina Liseth Varela Carrión

AGRADECIMIENTO

A Dios por guiar y cuidar de mi salud día a día, por ser mi fortaleza en los momentos más difíciles y por brindarme el amor absoluto para emprender mi camino.

A mis padres Anibal Varela y Mireya Carrión por el amor incondicional que me brindan, les agradezco por su paciencia y dedicación, por cada palabra de aliento y consejo que me han sabido brindar, por esos abrazos y besos fraternos que nunca me dejaron desfallecer, por darme su mano y enseñarme a caminar.

A mi tutor Andrés Izquierdo por proporcionar los consejos y guías en mi trabajo. A Erika Murgueitio por ser más que una profesora, una amiga que me ha enseñado grandes lecciones tanto en lo académico y personal. A Luis Cumbal por abrirme las puertas del Centro de Nanociencias y Nanotecnología y por sus enseñanzas académicas. Gracias a todos mis maestros que han aportado en mí su confianza y me brindaron sus enseñanzas para ser cada día mejor persona.

A Roque Rivas un compañero y gran amigo que ha sido de apoyo incondicional en este tiempo, gracias amigo por cada risa, pelea y cada palabra de aliento. A mis compañeros del laboratorio Yani, Mopo, Renato y Beto por su amistad, por sus locuras que hicieron que el largo trabajo en el laboratorio sea un tiempo ameno.

A mis amigos Alejo, Rommel, Liz, Gaby y Cris, quienes me han acompañado y hemos compartidos grandes momentos en la universidad, por esas grandes amistades que perduraran. A mis mejores amigas Krups, Gata, Jessy, Andrea y Naty, quienes me han brindado su apoyo incondicional, porque así pasen los años existe una amiga, una hermana que camina a nuestro lado. A Carlitos por brindarme su comprensión y cariño, y alentarme día a día a cumplir cada una de mis metas.

Finalmente quiero agradecer a mis abuelitos, tíos, primos y a toda mi familia que siempre han estado pendiente de mí, brindándome consejos y apoyando mi carrera profesional.

Carolina Liseth Varela Carrión

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	II
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	III
AUTORIZACIÓN	IV
DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTO	VI
LISTADO DE FIGURAS	X
LISTADO DE TABLAS	XII
LISTADO DE ABREVIATURAS	XIII
ABSTRACT	XVI
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema.....	1
1.3 Objetivos de la investigación	2
1.3.1 Objetivo general	2
1.3.2 Objetivos específicos	2
1.4 Marco Teórico	3
1.4.1 Suelos contaminados por hidrocarburos	3
1.4.2 Microbiología del suelo.....	5
1.4.3 Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.....	6
1.4.4 Nanopartículas metálicas en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos	7
1.4.5 Toxicidad de las nanopartículas	12
1.4.6 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.	14
1.4.7 Identificación de bacterias degradadoras de TPH mediante técnicas moleculares	14
1.4.8 Alineamiento múltiple de secuencias	18

1.5	Hipótesis de la investigación.....	20
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....		21
2.1	Participantes	21
2.2	Zona de estudio	21
2.2.1	Fase de campo	21
2.2.2	Fase de laboratorio	21
2.3	Periodo de investigación.....	21
2.4	Diseño experimental	22
2.5	Procedimientos de aislamiento	23
2.5.1	Preparación de medios de cultivo	23
2.5.2	Toma de muestras	24
2.5.3	Procesamiento de la muestra.....	24
2.5.4	Cinética de la población bacteriana degradadora y heterótrofa	26
2.5.5	Obtención de cultivos puros	27
2.5.6	Determinación de las características macroscópicas del cultivo	27
2.5.7	Determinación de las características microscópicas del cultivo	28
2.6	Extracción de ADN	28
2.7	Amplificación del gen 16S rRNA mediante PCR.....	28
2.8	Electroforesis	29
2.9	Análisis de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)	30
2.10	Análisis de secuencias.....	31
2.10.1	Limpieza y ensamblaje.....	31
2.10.2	Análisis de similitud y homología	31
2.10.3	Análisis filogenético.	31
2.11	Determinación del efecto de inhibición de las nanopartículas de hierro elemental	32
2.11.1	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	32
2.12	Preparación del cepario.....	33
2.13	REMOCIÓN DE TPHs (FENANTRENO) POR LA APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE HIERRO ELEMENTAL (NPHE)	34
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....		34

3.1	Cinética de la población bacteriana degradadora y heterótrofa.....	34
3.2	Remoción de fenantreno mediante la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental (NPHE)	38
3.3	Cultivos puros obtenidos.....	40
3.4	Características microscópicas de los cultivos.....	41
3.5	Extracción de ADN	44
3.6	Amplificación del gen 16S rRNA.....	44
3.7	RFLPs en gel de agarosa	46
3.8	Secuencias de las bacterias aisladas	50
3.9	BLAST	51
3.10	Construcción del árbol filogenético	53
3.11	Efecto de inhibición de las nanopartículas de hierro elemental (NPHE) sobre la población bacteriana.....	56
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN		60
4.1	NANOPARTÍCULAS DE HIERRO ELEMENTAL EN LA REMOCIÓN DE TPHs (FENANTRENO) Y SU INCIDENCIA SOBRE LA POBLACIÓN BACTERIANA	60
4.2	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS BACTERIAS DEGRADADORAS Y HETERÓTROFAS.	62
4.3	EFFECTO DE INHIBICIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS DE HIERRO ELEMENTAL (NPHE) SOBRE LA POBLACIÓN BACTERIANA	70
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES.....		73
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES		75
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA.....		76

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1 Estructura molecular del fenantreno	5
Figura 2 Modelo de las nanopartículas de Fe ⁰	10
Figura 3 Micrografías TEM.....	12
Figura 4 Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa.....	16
Figura 5 Regiones conservadas e hipervariables de un gen 16S rRNA.	17
Figura 6 Preparación de las nanopartículas de hierro elemental	25
Figura 7 Esquema del protocolo experimental.....	26
Figura 8 Diluciones y siembra de muestras para conteo de microorganismos	27
Figura 9 Cinética poblacional bacteriana del Ensayo 1: solución de nanopartículas de hierro elemental sin filtrar aplicado al suelo contaminado con fenantreno.....	36
Figura 10 Cinética poblacional bacteriana del Ensayo 2: solución de nanopartículas de hierro elemental filtradas aplicado al suelo contaminado con fenantreno.....	38
Figura 11 Cinética de remoción del fenantreno Ensayo 1: solución de nanopartículas de hierro elemental sin filtrar aplicado al suelo contaminado con fenantreno.....	39
Figura 12 Cinética de remoción del fenantreno Ensayo 2: solución de nanopartículas de hierro elemental filtrada aplicado al suelo contaminado con fenantreno.....	40
Figura 13 Cepas de cultivos puros.....	41
Figura 14 Tinción Gram de cepas bacterianas identificadas observadas con el objetivo de 100X (Olympus CX21)	42
Figura 15 Tamaño de bacterias. Fotografías Cámara Motican, 10 MP. Vista microscópica a 100X.....	43
Figura 16 Amplificación del gen 16S rRNA de las muestras de las bacterias degradadoras y heterótrofas	45
Figura 17 Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, Ensayo N° 1, cepas de bacterias degradadoras del suelo.....	46

Figura 18	Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, Ensayo N° 1, cepas de bacterias degradadoras del sobrenadante.	46
Figura 19	Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, Ensayo N° 1, cepas de bacterias heterótrofas del suelo.....	47
Figura 20	Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, Ensayo N° 1, cepas de bacterias heterótrofas del sobrenadante.	47
Figura 21	Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, Ensayo N° 2	48
Figura 22	Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, Ensayo N° 2.	48
Figura 23	Electroferogramas de la secuencia complementaria	51
Figura 24	Árbol filogenético basado en las secuencias 16S rRNA	55
Figura 25	Inhibición de NPHE en el crecimiento bacteriano por método de microdilución.	56
Figura 26	Aparición de zonas inhibitorias en placas de agar a diferentes concentraciones de nanopartículas de hierro elemental.	57
Figura 27	Cinética de crecimiento <i>Lysinibacillus fusiformis</i> y <i>Bacillus megaterium</i> en presencia de NPHE.....	58

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1	Resumen de propiedades físicas y químicas del fenantreno.....	5
Tabla 2	Diseño Completamente al Azar (DCA), de tratamientos de remoción de TPHs (fenantreno) con la aplicación de nanopartículas de hierro elemental.	22
Tabla 3	Cebadores utilizados para la amplificación de ARNr 16S.....	29
Tabla 4	Cantidades de los componentes de la PCR, kit GoTaq® Green Master Mix.	29
Tabla 5	Componentes del protocolo de análisis con enzimas de restricción para un volumen final de 20 µL por muestra.....	29
Tabla 6	Número más probable de bacterias heterótrofas y degradadoras de fenantreno bajo la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental sin filtrar.....	35
Tabla 7	Número más probable de bacterias heterótrofas y degradadoras de fenantreno bajo la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental filtradas.....	37
Tabla 8	Remoción de fenantreno del suelo posterior a la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental sin filtrar.	38
Tabla 9	Remoción de fenantreno del suelo posterior a la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental filtradas.	38
Tabla 10	Agrupaciones según el patrón de fragmentos de restricción (RFLP)	47
Tabla 11	Bacterias degradadoras y heterótrofas identificados en suelos contaminados artificialmente con fenantreno posterior al tratamiento con NPHE.	52
Tabla 12	Número de cepas aisladas de cada bacteria degradadora y heterótrofa identificada.....	53
Tabla 13	Resumen de los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano con la aplicación de NPHE por el método de microdilución	58
Tabla 14	Actividad inhibitoria de las NPHE sobre las bacterias.	57

LISTADO DE ABREVIATURAS

LB: Luria-Bertani

SS: Solución Salina

NPs: Nanopartículas

NTs: Nanotubos

NPHE: Nanopartículas de hierro elemental

nZVI: nanopartículas de hierro de valencia cero

TPH: Hidrocarburos totales de petróleo

HAP: Hidrocarburo aromático policíclico.

MAE: Ministerio del Ambiente

SOTE: Sistemas de Oleoducto Transecuatoriano

SIPAS: Sistema de Indicadores Pasivos Ambientales y Sociales.

EPA: Agencia de Protección Ambiental.

NMP: Número más probable

UFC: Unidades formadoras de colonias

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

pH: Potencial Hidrógeno

°C: Grados Centígrados

spp: species pluralis (latinismo para la pluralización de especies)

ARN: Ácido Ribonucleico

ADN: Acido Desoxirribonucleico

m.s.n.m: Metros Sobre el Nivel del Mar

NCBI: National Center for Biotechnology Information

rRNA: ácido ribonucleico ribosomal

BLAST: Basic Local alignment Search Tool

μL: microlitros

μM: micromolar

mM: milimolar

ng: nanogramos

pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

h: horas

mL: mililitros

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfatos

TAE: Tris, acetato y EDTA

Kb: Kilobase

V: Voltio

A: Amperio

RESUMEN

El Ecuador es afectado por derrames a causa de la explotación petrolera, lo que ha provocado problemas de contaminación ambiental en suelos y aguas. En este estudio se aplicó la solución de nanopartículas de hierro elemental (NPHE) para remover el fenantreno de un suelo proveniente de Concordia contaminado artificialmente a nivel de laboratorio con 2000 ppm de fenantreno y se determinó el efecto de las nanopartículas sobre la cinética poblacional bacteriana nativa de los suelos contaminados. En el transcurso de 10 días de tratamiento se removi6 del 22% al 50% de fenantreno, analizado por cromatografía de gases; además se observó una reducción significativa en la población bacteriana tanto para la población bacteriana heter6tropa como para la degradadora. Posterior al tratamiento con NPHE se identificaron 13 especies de bacterias a través de técnicas moleculares como es la amplificación del gen 16S rRNA las cuales son: *Enterobacter xiangfangensis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter genomosp*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus toyonensis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus xylanilyticus* y *Acinetobacter lwoffii*. Se realizaron pruebas de inhibición de las NPHE por el método de microdilución en el cual se evidenci6 una disminución de las unidades formadoras de colonias al existir mayor tiempo de contacto entre la bacteria y la solución de NPHE. La aplicación de nanopartículas es una técnica favorable para remover contaminantes, sin embargo el efecto sobre la población bacteriana evidencia una disminución de las bacterias nativas del suelo.

PALABRAS CLAVE:

- **NANOPARTÍCULAS**
- **CINÉTICA BACTERIANA**
- **CINÉTICA DE REMOCIÓN**
- **GEN 16S rRNA**
- **INHIBICIÓN BACTERIANA**

ABSTRACT

Ecuador is affected by spills due to oil exploitation, which has caused problems of environmental pollution in soils and waters. In this study the elemental iron nanoparticle solution (NPHE) was applied to remove phenanthrene from an artificially contaminated Concordia soil at the laboratory level with 2000 ppm phenanthrene and the effect of the nanoparticles on native bacterial population kinetics of contaminated soils. During the course of 10 days of treatment, 22% to 50% of phenanthrene was removed, analyzed by gas chromatography; In addition a significant reduction in the bacterial population was observed for both the heterotrophic bacterial population and the degrading bacterial population. Following the treatment with NPHE, 13 species of bacteria were identified through molecular techniques such as 16S rRNA gene amplification, which are: *Enterobacter xiangfangensis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter genomosp*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus Aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus toyonensis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Inhibition tests of NPHE were performed by the microdilution method in which a decrease of the colony forming units was evidenced by the longer contact time between the bacteria and the NPHE solution. The application of nanoparticles is a favorable technique to remove contaminants; however the effect on the bacterial population evidences a decrease of the native bacteria of the soil.

KEYWORDS:

- **NANOPARTICLES**
- **BACTERIAL KINETICS**
- **REMOVAL KINETICS**
- **16S rRNA**
- **BACTERIAL INHIBITION**

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El Ecuador es un país con exuberante biodiversidad, dedicado a la explotación petrolera como principal fuente de ingresos económicos, el descuido del manejo ambiental años atrás ha generado daños ambientales como contaminación de suelos, aguas, acuíferos provocando serios problemas de salud en los habitantes de las zonas aledañas. En el recinto el Rosario, cantón Quinindé se produjo un derrame a causa del robo de gasolina, el cual alcanzó el acuífero somero y ha generado una pluma de contaminación con una extensión aproximada de 4 hectáreas, evidenciada por la contaminación de los ríos aledaños con TPHs.

El proyecto propone evaluar el efecto de la aplicación de nanopartículas para transformar los TPHs de los suelos afectados e identificar la población bacteriana resistente al tratamiento con nanopartículas, con la intención de aplicar una combinación de nanopartículas y bioestimular a dicha población bacteriana que degrade los TPHs transformados de una manera más rápida y eficiente en próximos proyectos, y en el futuro aplicar esta nueva técnica en un emplazamiento contaminado. Dado que las nanoestructuras son elementos con características físico-químicas diferentes a los mismos materiales a escala convencional es necesario evaluar el efecto o riesgos que pueden causar, razón por la cual este estudio propone evaluar el efecto de las nanopartículas de hierro elemental sobre la población bacteriana presente en el suelo contaminado artificialmente con TPHs (fenantreno).

1.2 Justificación del problema

El Ecuador a causa de la explotación petrolera o por donde circula el oleoducto se ha visto afectado por derrames que han provocado serios problemas de contaminación ambiental en suelos y aguas, gran parte de la amazonia Ecuatoriana como otros sectores de nuestro país se encuentran

contaminados por petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Existe la necesidad de remediar y recuperar dichas áreas contaminadas, por tanto es necesario buscar técnicas de remediación que ayuden a recuperar los suelos y aguas de manera rápida y que no afecten a más compartimientos ambientales.

Por estas razones es muy importante aplicar la combinación de técnicas de biorremediación con una de las técnicas prometedoras como es la nanoremediación, siendo este uno de los primeros estudios que se realizará en el país que pretende combinar técnicas de remoción de TPHs (fenantreno) en suelos contaminado artificialmente mediante la aplicación de nanopartículas y determinar el efecto de las nanopartículas en la población bacteriana.

Posteriormente se realizará el aislamiento e identificación de las bacterias al finalizar el tratamiento con nanopartículas, para su potencial aplicación en un futuro en técnicas de bioaumentación y bioestimulación de las bacterias identificadas con la finalidad de que al combinar la bioestimulación de las bacterias y las nanopartículas se obtenga un mejor proceso de remediación, ya que si la nanopartícula deja de actuar las bacterias van a continuar con el proceso de degradación de los contaminantes.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar el efecto de las nanopartículas metálicas de hierro elemental (NPHE) sobre la población bacteriana de suelos contaminados con TPHs (fenantreno) a nivel de laboratorio.

1.3.2 Objetivos específicos

- Preparar medios de cultivo específicos para la identificación de bacterias degradadoras de TPHs (fenantreno).

- Estudiar la cinética bacteriana en la degradación de TPHs (fenantreno) contenidos en los suelos contaminados aplicando nanopartículas de hierro elemental.
- Evaluar la inhibición de la población bacteriana aisladas de los suelos contaminados al aplicarse nanopartículas de hierro elemental metálicas.
- Identificar bacterias del suelo antes, durante y posterior a la remediación de los suelos contaminados con TPHs (fenantreno) al tratarse con nanopartículas de hierro elemental.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Suelos contaminados por hidrocarburos

Los procesos de combustión dan lugar a un tipo de contaminación difusa que afecta mayoritariamente a la atmósfera, pero que a causa de procesos de precipitación y lixiviado se puede acumular en suelos y sedimentos (*Casellas, 1995*)

El Ecuador posee varios antecedentes de contaminación producida a causa de derrames petroleros. Un claro ejemplo se dio antes del año 1993, ya que las actividades de exploración y producción de hidrocarburos en el Ecuador por consorcio Texaco – Gulf, luego CEPE – TEXACO y PETROECUADOR- TEXACO, no tenían regulaciones ambientales. Durante este periodo estas actividades generaron lo que ahora se denomina como pasivos ambientales. Se registran numerosos derrames, operaciones accidentales y piscinas para depósitos de residuos que en general fueron construidas alrededor de las instalaciones industriales (*PEPDA, 2002*).

La industria petrolera ha impulsado la economía del país pero también ha provocado graves daños al medio ambiente, un claro ejemplo de esto se dio entre los años de 1972 y 1993, ya que se vertieron más de 114 mil millones de desechos tóxicos y petróleo sin refinar en las tierras y vías fluviales de la Amazonia Ecuatoriana (*Hurting, 2004*).

Según datos del Ministerio del Ambiente (MAE) la media de accidentes que han causado derrames petroleros fue casi de 50 anuales entre el 2000 y 2010, y la causa del 28% de dichos accidentes es la corrosión de las tuberías del Sistema de Oleoducto Transecuatoriano (SOTE). De acuerdo al MAE, existen otras causas para el total de 539 derrames producidos entre 2000-2010, entre los que se encuentran: atentados (26%), fallas mecánicas (17.8%), sin datos de causa (14.5%), fallas humanas (11.8%) y desastres naturales (1.5%) (*Gil, 2013*).

Los datos del Sistema de Indicadores Pasivos Ambientales y Sociales (SIPAS), perteneciente al MAE, indica que las provincias con mayor cantidad de daño ambiental son Sucumbíos y Orellana, provincias en las que se llevan a cabo la mayor cantidad de actividades petroleras. Hasta el año 2009, se calcula que el número de derrames en Sucumbíos fue de 396 y en Orellana 398, tomando en cuenta únicamente los eventos en los que más de 5 barriles fueron vertidos (*Ecuador., 2013*). Adicionalmente, la superficie afectada ha sido valorada, lo que reporta que más de 1 millón de metros cuadrados han sido contaminados con hidrocarburos en cada provincia (*Ecuador., 2013*).

El Ecuador constantemente ha sufrido derrames a causa del petróleo unos conocidos por entidades públicas mientras que otros continúan siendo desconocidos, sin embargo no se ha encontrado una solución exacta para remediar el daño causado por estos.

1.4.1.1 Fenantreno

El fenantreno (Figura 1) es un HAP de bajo peso molecular que está compuesto de tres anillos bencénicos (*Irwin, Mouwerik, Stevens, Seese, & Basham, 1997*)

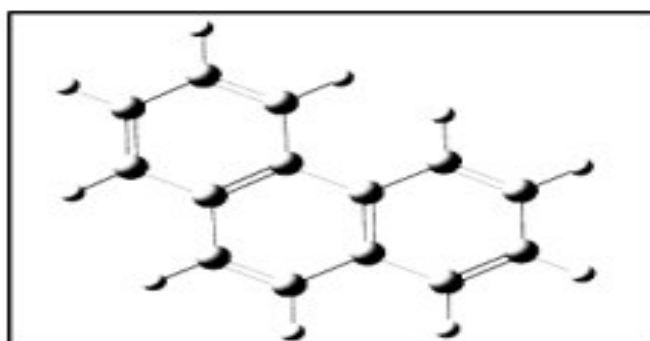


Figura 1 Estructura molecular del fenantreno

En la Tabla 1 se presenta el resumen de las propiedades físicas y químicas del fenantreno (*Irwin, Mouwerik, Stevens, Seese, & Basham, 1997*).

Tabla 1

Resumen de propiedades físicas y químicas del fenantreno

CAS N° (Chemical Abstract Service)	85-01-8
Peso Molecular	178,2 g/mol
Color	Incoloro
Estado físico	Forma plana, cristales, hojuelas
Punto de Fusión	100 °C
Punto de ebullición	340 °C
Olor	Suave olor aromático
Solubilidad del agua	1,2 – 1,3 mg/L a 25 °C: soluble en benceno, etanol, éter, tolueno, tetracloruro de carbono y disulfuro de carbono.
Coefficientes de partición:	
Log K_{ow}*	4,45 - 4,57
Log K_{oc}**	4,15 – 4,36
Presión de vapor a 25 °C	6,8 x 10 ⁻⁴ mmHg
Constante de Ley de Henry a 25 °C	2,56 x10 ⁻⁵ atm m ³ /mol
Factor de conversión	1 ppm = 7,3 mg/m ³ 1 mg/m ³ = 0,137 ppm

*Kow Coeficiente de partición del compuesto orgánico en octanol – agua.

**Koc Coeficiente de partición de carbono orgánico en suelo.

Fuente: USACHPPM. Document No: 39-EJ1138-01K (2006).

1.4.2 Microbiología del suelo

La microbiología del suelo es una de las ramas de la edafología que estudia los microorganismos que en el habitan, sus funciones y sus actividades. En el suelo se desarrollan tanto microorganismos eucariotas (algas, hongos y protozoos) y procariotas (bacterias y arqueas). La actividad

biológica depende de algunas propiedades del suelo, como la estructura, el volumen de los poros y la permeabilidad, además la comunidad microbiana favorece al suelo en su fertilidad, ciclos biogeoquímicos y así como también el uso potencial de microorganismos específicos (bacterias) para las aplicaciones ambientales. Las bacterias llegan a presentarse en poblaciones de 10^{10} células por gramo de suelo (*Cepeda, 1991*).

1.4.3 Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados es una opción que presenta ventajas con respecto a los métodos físicos y químicos, puesto que son sencillas de implementar. Por otro lado, también son efectivas y ambientalmente seguras, ya que los contaminantes se destruyen o transforman, sin requerir en la mayoría de los casos, tratamientos adicionales; representando tecnologías considerablemente económicas (*Volke & Velasco, 2003*).

La biorremediación es una tecnología basada en la utilización de los microorganismos y su potencial metabólico degradador para eliminar o transformar los contaminantes del medio en productos inocuos (*Alexander, 1999*). Tiene ciertas ventajas respecto a los métodos físico-químicos (excavación, extracción química e incineración), ya sea por su bajo coste económico (*Ulrici, 2000*), optimización de los recursos y no causa afectación a otros compartimentos ambientales (*Exner, 1994*).

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, frente a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación. La bioestimulación de la población microbiana indígena, tanto hongos como bacterias, puede acelerar el proceso de biodegradación de los contaminantes (*Alexander, 1999*).

Los procesos metabólicos de los microorganismos se llevan a cabo con la presencia de un aceptor de electrones, que generalmente es el oxígeno, considerando que la superficie del suelo siempre está en contacto con la

atmosfera este es un proceso que se lleva a cabo fácilmente (EPA, 1994). Los microorganismos oxidadores de hidrocarburos crecen de forma inmediata en la superficie del petróleo especialmente si la temperatura y la presencia de nutrientes es favorable, esto se debe a que en condiciones aerobias, la oxigenasa se encarga de introducir átomos de oxígeno en el hidrocarburo, lo que conlleva una cascada de procesos bioquímicos que permite la posterior mineralización o degradación de hidrocarburos (Madigan, Martinko, & Parker, 2004).

1.4.4 Nanopartículas metálicas en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Métodos de remediación ambiental se pueden clasificar por adsorción o reactivo, también si son *in situ* o *ex situ* (Tratnyek & Johnson, 2006; Hodson, 2010). Las aplicaciones *in situ* en el suelo y de aguas subterráneas parecen ser más prometedoras, ya que son en general menos costosas. Métodos de contaminación del suelo afectan indirectamente a la calidad de las aguas subterráneas, y viceversa.

El suelo y recuperación de aguas subterráneas es generalmente muy caro, y los métodos convencionales de remediación no siempre tienen éxito o toman un largo tiempo para que la remediación se haga efectiva (Mueller & Nowack, 2010). Karn *et al.* (2009) afirman que los métodos de tratamiento por bomba requieren 18 años de operación, en promedio, en comparación con 1-2 años para un tratamiento con nanopartículas de hierro de valencia cero (nZVI), siendo este un nuevo y eficaz método.

El Departamento de Ingeniería Química, Universidad Complutense de Madrid, ha realizado un trabajo que estudia la remediación de un B20 (20% biodiesel, el 80% de diesel) en suelos contaminados: mezcla de biodiesel (1000 mg kg⁻¹) con persulfato activado por el hierro. Tres fuentes diferentes de hierro (Fe (II)), hierro granular de valencia cero (gZVI), y una suspensión de nanopartículas de hierro de valencia cero (nZVI), sin ajuste de pH se probaron. Además, el efecto de la adición de agentes quelantes, tales como

citrato trisódico (SC), o ácido cítrico (CIA), ha sido también estudiado. Con respecto a las tres fuentes diferentes de hierro utilizados como activadores, Fe (II), gZVI y nZVI, en ausencia de una agente quelante, bajo pH ácido y mediante la adición de la misma cantidad de hierro, la conversión TPH más alta se obtuvo con ZVI (alrededor de 60%), mientras que se obtuvo una conversión de aproximadamente 40% con la adición de Fe (II). El valor máximo de conversión de TPH se logró en un tiempo más corto usando nZVI. En cuanto a la eficacia de eliminación de cada fracción de biodiesel disminuyó, ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) fueron más fáciles de oxidar logrando así el 100% de la conversión, ya sea mediante el uso de Fe (II) o nZVI activa con persulfato (Pardo, Rosas, Santos, & Romero, 2015).

El Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, NEIKER-Tecnalia, está investigando actualmente una estrategia para la remediación de suelos contaminados con compuestos organoclorados como el DDT, andrín, dieldrín, endosulfan, hexaclorociclohexano, toxafeno, clordecona, mirex, etc. La innovadora técnica consiste en combinar la aplicación de nanopartículas de hierro cero con técnicas de biorremediación. El proceso de biorremediación consta de dos estrategias principales: la bioestimulación y la bioaumentación. La primera consiste en estimular las bacterias presentes en el terreno, mediante la aportación de nutrientes, humedad, oxígeno, etc. La bioaumentación, por su parte, se basa en aplicar al suelo, bacterias con la capacidad de degradación deseada. Para ello se recogen muestras de suelos contaminados, se aísla en laboratorio las bacterias más eficaces y son estas las que se “cultivan” en zonas con los compuestos organoclorados. Este es el primer paso para crear un banco de cepas de interés para su uso en biorremediación (Scaliter, 2016).

1.4.4.1 Nanopartículas de hierro elemental (NPHE)

Existen dos maneras de utilizar las NPHE en la remediación en el agua subterránea y el suelo contaminados (Tratnyek & Johson, 2006; Nowacs, 2009).

- NPHE se inyecta para formar una barrera reactiva de partículas hierro.
- NPHE se inyecta en forma modificada en la superficie (por ejemplo revestido con polielectrolitos, agentes tensioactivos o de celulosa / polisacáridos) para establecer una columna de hierro reactiva, que destruye los contaminantes orgánicos dentro de la fase acuosa.

Varios estudios han demostrado que NPHE utilizado en una barrera reactiva es muy eficaz en la degradación reductiva de derivados halogenados disolventes, tales como metanos clorados, bromados metanos, trihalometanos, etenos clorados, clorados bencenos y otros hidrocarburos policlorados, en las aguas subterráneas (Zhang, 2003; Schorr, 2007). También NPHE ha demostrado ser eficaz contra los pesticidas y colorantes (Zhang W. , 2003), como también presenta una eliminación eficaz de hidrocarburos aromáticos policíclico (HAP) adsorbidos en suelos a temperatura ambiente (Chang *et al.*, 2005; 2007). En los Estados Unidos, es común combinar la NPHE con otros metales, tales como paladio, para aumentar la reactividad. En Europa, tales partículas bimetálicas no se utilizan debido a su posible toxicidad y el beneficio adicional limitado (Mueller & Nowack, 2010).

Tratnyek & Johson (2006) afirman que una alta reactividad de los sitios superficiales tiende a correlacionarse con baja selectividad de los materiales del medio ambiente. Por esta razón, la remediación con NPHE puede ser ineficiente porque estas partículas pueden reaccionar con sustancias no objetivo, incluyendo oxígeno disuelto, sulfato, nitrato y agua. Esto también implica que NPHE tendrá una vida útil limitada en medios porosos y las reinyecciones de las partículas pueden ser necesarias, lo que origina que el tratamiento sea más costoso. Por otra parte, la vida corta *in situ* de NPHE puede ser beneficiosa por la prevención de la exposición no deseada del medio ambiente y los seres humanos a NPHE (Mueller & Nowack, 2010).

Se han realizado experimentos de laboratorio para evaluar la remoción del pireno del suelo utilizando nanopartículas de hierro cero-valente, dichos experimentos por lotes indicaron que las nanopartículas sintetizadas fueron más eficientes en la eliminación de pireno en comparación con las nanopartículas comerciales de microescala ($< 10\mu\text{m}$). La cinética de la reacción de eliminación de pireno fue dominado por la dosis de hierro y aproximada a un modelo pseudo-primer orden. Los resultados de este estudio indican que la adición de nanopartículas de hierro cero valente produce condiciones fuertemente reductoras y sugieren que la remediación de suelos contaminados con pireno utilizando partículas de hierro cero valente es una tecnología prometedora (*Chang & Kang, 2009*).

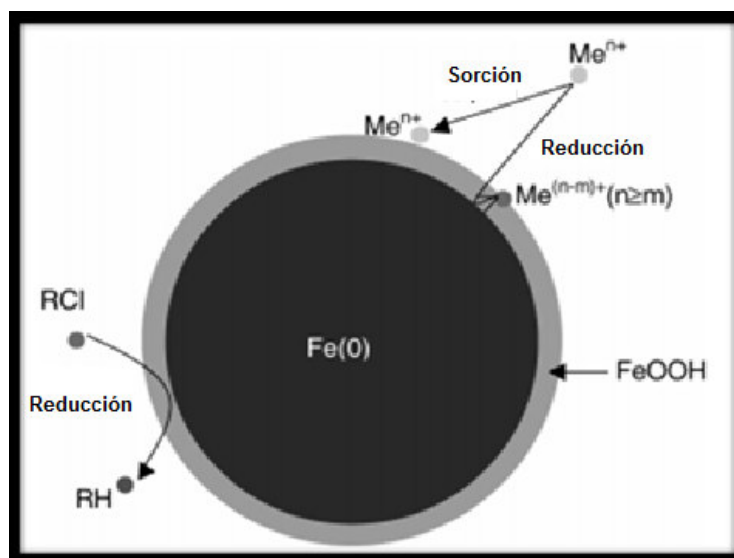


Figura 2 Modelo de las nanopartículas de Fe°

Fuente: (Li *et al.*, 2006)

1.4.4.1.1 Síntesis de las nanopartículas de hierro elemental

Un método sencillo de síntesis de nanopartículas es en solución, en el cual se parte de sales de hierro (por ejemplo, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_2 \cdot (\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, o $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), que son reducidas mediante un reductor como hidracina, borohidruro de sodio o hidrógeno, o bien algún otro medio especial de reducción (*Elliott & Zhang, 2001*). El agente reductor utilizado más habitualmente es el borohidruro de sodio sin embargo es un reactivo altamente tóxico, tiene un poder reductor adecuado para varios metales en

condiciones normales. El borohidruro de sodio debe encontrarse en exceso respecto del cloruro férrico o ferroso para conseguir un rápido y uniforme crecimiento de los cristales de hierro. Aunque es un proceso físicamente sencillo, la reducción mediante borohidruro de sales metálicas acuosas es una reacción compleja, que es sensible a un variado número de parámetros, entre los que se encuentran el pH (influye en el tamaño de las partículas), la concentración de la solución de borohidruro y su velocidad de adición (que alteran la composición de los productos de reacción) (*Zhang W. , 2003*).

En los últimos años, la biosíntesis de nanopartículas metálicas se ha estudiado como una alternativa de síntesis frente a los procesos convencionales (*Kharissova, Rasika, Kharisov, Olvera, & Jiménez, 2013*). En algunos de los procesos de biosíntesis se emplean materiales inocuos para el medio ambiente como son las hojas o la corteza de árboles y plantas (*Machado, et al., 2013*). Los extractos obtenidos a partir de esta biomasa contienen antioxidantes, entre los cuales los más importantes son los compuestos polifenólicos, y en menor medida azúcares reductores, bases nitrogenadas y aminoácidos. Las nanopartículas se forman por contacto directo extracto-disolución del metal, produciéndose la reducción de los cationes metálicos en disolución, actuando el extracto con capacidad antioxidante como un sustituto del NaBH_4 que se emplea en el método de reducción convencional (*Makarov, Makarova, & Love, 2014*).

La clave del proceso de biosíntesis de nanopartículas es la riqueza en polifenoles de los extractos, ya que son los componentes presentes que aportan la mayor parte de su capacidad antioxidante o reductora. Se puede considerar por tanto que las nanopartículas se forman como consecuencia de la reacción redox que se produce entre los cationes metálicos con el alto contenido en compuestos polifenólicos de los extractos y en menor medida con otros posibles componentes orgánicos reductores (*Casal, 2015*).

Los extractos de *P. Serotina* (capulí) y *V. floribundum* (mortiño) son una gran fuente de polifenoles y antioxidantes naturales (Vasco, Ruales, & Karnal-Eldin, 2008). Según Murgueitio y otros (2016) afirma que la

concentración de los polifenoles de los extractos de capuli y mortiño se encuentran en 1494 ± 385 (mg GAE / 100 g de muestra) y 2167 ± 835 respectivamente.

En este estudio se promueve la síntesis de nanopartículas con extractos naturales “polifenoles” específicamente el mortiño por ser una planta nativa del Ecuador y su alto contenido de polifenoles, con el fin de aplicar tecnología verde y reducir el efecto toxico de las nanopartículas.

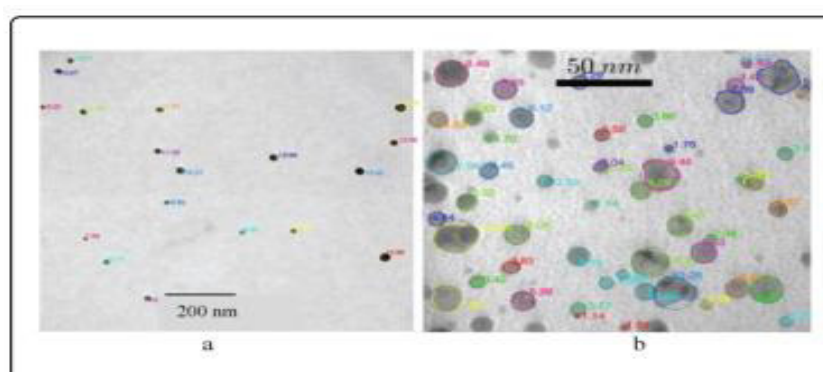


Figura 3 Micrografías TEM.

Fuente: (Murgueitio *et al.*, 2016).

Nota: (a) NPHE 0,1 M. *P. serotina* y (b) NPHE 0,1M *V. floribundum*; Proporción 10: 1 (v / v).

1.4.5 Toxicidad de las nanopartículas

La reducción del tamaño de partícula y el aumento de la reactividad son propiedades que pueden hacer que una sustancia sea más tóxica. Por lo tanto, las mismas propiedades hacen que las nanopartículas sean tecnológicamente interesante y pueden ser colocadas en una nueva categoría de sustancias toxicas. En general, estos estudios sugieren que las partículas más pequeñas son más tóxicas, a pesar de las grandes diferencias entre las diferentes partículas, factores tales como la composición, estructura, peso molecular, el punto de fusión / intervalo de ebullición punto, el coeficiente de reparto octanol-agua, solubilidad en agua, la actividad, la agregación de partículas / desagregación potenciales, recubrimientos de superficie y la estructura pueden ser importantes variables

que influyen en la toxicidad de diferentes partículas y su comportamiento en el medio ambiente (Nowack & Bucheli, 2007).

El tema de la toxicidad y ecotoxicidad es especialmente importante para todas las técnicas de nano-remediación, porque en la mayoría de las nanopartículas se añaden directamente al suelo o las aguas subterráneas, y por lo tanto la exposición del medio ambiente sin duda se produce (Mueller & Nowack, 2010).

Sólo existen unos pocos estudios disponibles sobre la toxicidad de NPHE. Li, *et al.* (2009) encontraron que los nano-hierro puede inducir daño oxidativo en embriones de peces y perturbar el equilibrio antioxidante en los peces adultos.

El riesgo asociado con NPHE no sólo depende de su toxicidad pero también de la medida de exposición. Tratnyek & Johnson (2006) han llegado a la conclusión que la exposición a NPHE será mínima debido a la rápida aglomeración de las partículas, la movilidad limitada de partículas y rápida oxidación a óxido de hierro.

1.4.5.1 Toxicidad de las nanopartículas en la población microbiana del suelo

En el suelo, los microorganismos juegan un rol muy importante en el mantenimiento de sus funciones como ecosistema y están muy relacionados con su uso para la producción agrícola. Existen diferentes rutas por las cuales las nanopartículas (NPs) pueden ingresar a diferentes ecosistemas naturales, y sin embargo, sus propiedades ecotoxicológicas y riesgos aún no han sido completamente caracterizadas (*Palencia, Combatt, & Palencia, 2013*). Por ejemplo, la toxicidad microbiana para ambientes acuáticos se ha reportado para TiO₂, nanotubos (NTs), fullerenos, AgNPs, NPs de ZnO (ZnONPs) y NPs de Au (AuNPs) (Shah & Belozeroва, 2009; Nowacs, 2009; Somasundaran, *et al.*, 2010; Fang *et al.*, 2009).

Los efectos de las NPs sobre los microorganismos dependen de varios factores, entre ellos, de sus propiedades fisicoquímicas, de la dosis, el tiempo de contacto, del tipo de microorganismo, de las condiciones locales, y de la composición del medio de crecimiento que en algunas ocasiones pueden interactuar en sinergia para dañar o lisar las células microbianas (Gutarowska *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2011)

1.4.6 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Bacterias capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía, la mayoría de las bacterias conocidas hoy en día con esta capacidad fueron aisladas de zonas contaminadas como por ej. Suelos cercanos a las refinerías o donde se conozcan derrames de hidrocarburos. Entre las bacterias más importantes encontramos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia rubidae*, *Bacillus sp*, *Micrococcus sp*, *Brevibacterium sp*, *Spirillum sp*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes sp*, etc (Maposita, Calle, Fiallos, & Burgos, 2011).

1.4.7 Identificación de bacterias degradadoras de TPH mediante técnicas moleculares

Mediante técnicas moleculares se puede identificar la estructura y composición de comunidades microbianas asociadas a ambientes contaminados por crudos de petróleo; el uso de estas técnicas provee una apreciación clara de varias características importantes de las comunidades, específicamente la biomasa viable, la estructura de la comunidad y el estado nutricional o la presencia de respuestas a estrés en bacterias Gram negativas (Pérez, Camacho, Gómez, Ábalos, & Viñas, 2008).

1.4.7.1 Extracción de ADN

El aislamiento de ADN a partir de células se lo realiza por distintos métodos tradicionalmente, estos implican la aplicación de disolventes orgánicos (por ejemplo, fenol y cloroformo) (Bruno, Kaiser, & Montville,

1992), que interactúan con componentes hidrófobos de la proteína y la lipoproteína, causando la desnaturalización, las fuerzas que mantienen los interiores hidrófobos de las proteínas, sus conformaciones nativas, se superan por exposición a disolventes hidrófobos, lo que resulta en el despliegue y la precipitación de la proteína (Bovill, Shallcross, & Mackey, 1994). El precipitado del material celular desnaturalizado permanece dentro de la fase orgánica, que está separada por centrifugación.

En general, el fenol es un agente desnaturalizante eficaz de proteínas, mientras que el cloroformo será más eficaz para los materiales polisacáridos. Así, para la extracción de ADN de células bacterianas, las mezclas de fenol/cloroformo son más eficaces. El método estándar para recuperar ADN a partir de lisados y suspensiones celulares se realiza mediante el uso de desnaturalización reversible de alcohol (es decir, etanol o isopropanol) y la subsiguiente precipitación (Bhupathiraju, Hernandez, Landfear, & Alvarez, 1999), seguido por centrifugación.

1.4.7.2 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La reacción de la cadena de la polimerasa o PCR constituye un avance importante en una rama de la ciencia: biología molecular. En 1985 Kary Mullis revoluciono en el mundo con la invención de la reacción de la cadena de la polimerasa, la cual debe su nombre a la actividad de la enzima ADN polimerasa que permite crear una cadena de ADN a partir de su cadena complementaria (Ramírez, Méndez, Cocotle, & Arenas, 2003) (Harris, 1998).

La amplificación se logra a través de una serie de ciclos; cada ciclo incluye el uso de tres temperaturas diferentes y la adición de diversos reactivos según la temperatura de reacción, definiendo tres fases:

1. Desnaturalización a 94°C: se da por la separación de dos hebras de ADN.
2. Alineación: adición de iniciadores e hibridación de los mismos con su secuencia complementaria.

3. Extensión: la ADN polimerasa extiende una región de ADN que es complementaria al ADN blanco, con base a la posición del primer iniciador, en dirección 5'a 3'. Estos pasos se repiten de 25 a 35 veces, usando como blanco el fragmento inicial de ADN así como los productos creados en cada ciclo (Harris, 1998).

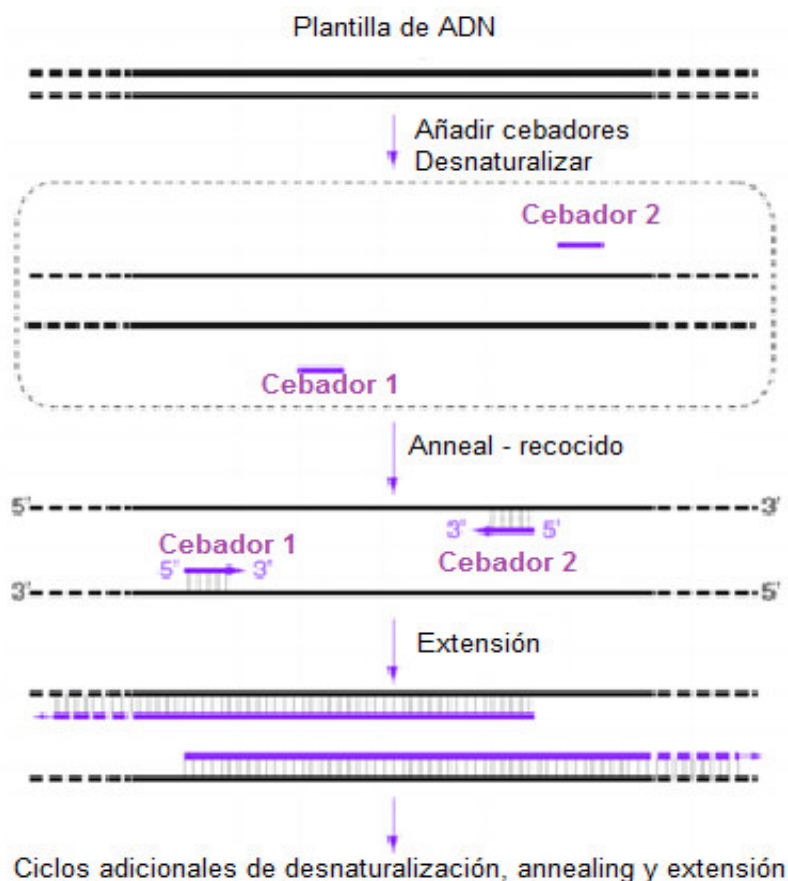


Figura 4 Etapas de la reacción en cadena de la polimerasa

Fuente: Modificado de Dale & Von (2002)

1.4.7.3 Gen ribosomal 16S

El gen ribosomal 16S rRNA es considerado un excelente marcador molecular debido a la cantidad de regiones conservadas a lo largo del gen 16S rRNA que sirven de blanco para un gran espectro de iniciadores. Entre estas regiones altamente conservadas, se encuentran regiones variables que permiten detectar un amplio número de individuos filogenéticamente diversos. Adicionalmente, la posibilidad de divergencia intragenómica debido

a una posible transferencia horizontal de genes ribosomales es prácticamente nula (*Atlas & Phillips, 2005*).

La fácil secuenciación de los rRNA 16S ha llevado al establecimiento de bases de datos amplias y en constante crecimiento, gracias a la aparición de programas informáticos que hacen posible determinar coeficientes de asociación; lo cual hace de este análisis una herramienta práctica y muy útil en la identificación bacteriana (*Rodicio & Mendoza, 2004*).

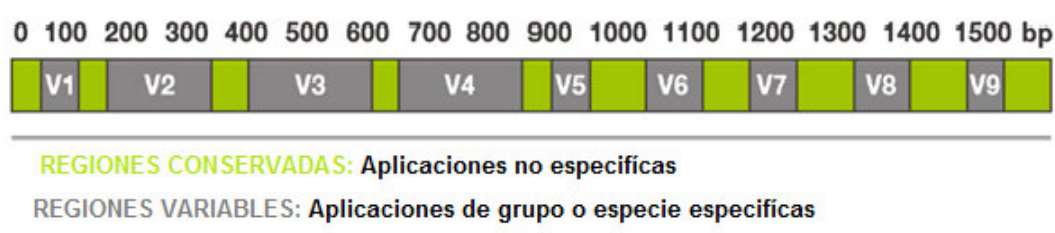


Figura 5 Regiones conservadas e hipervariables de un gen 16S rRNA,

Fuente: Alimetrics, 2017.

1.4.7.4 RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

La forma más directa de detectar polimorfismo es la secuenciación del ADN, pero por su costo y disponibilidad, se suele acudir a otras técnicas entre las que se encuentra, el análisis de polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), donde intervienen enzimas de restricción las cuales presentan una gran especificidad de reconocimiento de una secuencia corta (de 4 a 6 nucleótidos) de ADN dúplex y la consiguiente hidrólisis de un enlace fosfodiéster en cada hebra, justamente en secuencias concretas del ADN llamadas sitios de restricción. La cantidad de bandas (patrones) que puedan aparecer entre las especies e incluso dentro de la misma especie podrían indicar la proximidad o lejanía filogenética entre las cepas en estudio (*Cannova, 2007*).

Con un conocimiento previo de la secuencia de la especie que se quiere determinar, se seleccionan las enzimas de restricción adecuadas para que se produzca un patrón de bandas especie-específico que se distinga del

patrón de otras especies. Si existen variaciones de la secuencia debido a cambios puntuales de nucleótidos o bien inserciones, deleciones o traslocaciones, el patrón de corte puede variar y por lo tanto la digestión del ADN con enzimas de restricción da lugar a fragmentos cuyo número o tamaño pueden ser distinto entre individuos, poblaciones, especies u otros niveles taxonómicos (*Sánchez, 2012*).

1.4.7.5 Secuenciación Sanger

La técnica más utilizada para el análisis de secuencias de ADN es la secuenciación de Sanger. En la actualidad puede determinarse la secuencia de cualquier segmento de ADN purificado, tanto si es un fragmento clonado como se si trata de una secuencia diana amplificada por PCR. El método de la secuenciación de Sanger aprovecha ciertos análogos químicos de los cuatro nucleótidos conocidos como dideoxi nucleótidos (ddA, ddC, ddG, ddT) debido a que carecen de un grupo hidroxilo 3' terminal en su desoxirribosa (*Nussbaum, McInnes, & Willard, 2008*).

1.4.8 Alineamiento múltiple de secuencias

Un alineamiento de secuencias en bioinformática es una forma de representar y comparar dos o más secuencias o cadenas de ADN, ARN, o estructuras primarias proteicas para resaltar sus zonas de similitud, que podrían indicar relaciones funcionales o evolutivas entre los genes o proteínas consultadas. Las secuencias alineadas se escriben con las letras (representando aminoácidos o nucleótidos) en filas de una matriz en las que, si es necesario, se insertan espacios para que las zonas con idéntica o similar estructura se alineen (*Brudno, et al., 2003*) (*Schneider & Stephens, 1990*).

El alineamiento múltiple de secuencias es una extensión del alineamiento de pares que incorpora más de dos secuencias al mismo tiempo. Los métodos de alineamiento múltiple intentan alinear todas las secuencias de un conjunto dado. Se usa a menudo en la identificación de

regiones conservadas en un grupo de secuencias que hipotéticamente están relacionadas evolutivamente. Los alineamientos múltiples son también utilizados para ayudar al establecimiento de relaciones evolutivas mediante la construcción de árboles filogenéticos (*Rodríguez, 2010*).

Existen diferentes productos de software en Internet que realizan el alineamiento de secuencias, como el Mega4 (*Tamura, 2007*) y el ClustalW (*Thompson, Higgins, & Gibson, 1994*).

1.4.8.1 Herramienta de búsqueda de alineación local básica (Blast)

La base de datos NCBI realiza análisis de secuencias mediante una herramienta denominada Herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST), que compara la secuencia nucleotídica o aminoacídica de interés con las secuencias de la base de datos. Luego envía las que son más similares, en base a valores de identidad y cobertura. Existen variantes como pBLAST, para el caso de comparación de secuencias de aminoácidos; nBLAST para comparar secuencias de nucleótidos, BlastX que permite ingresar una secuencia de nucleótidos que se traduce en sus seis posibles marcos de lectura y compara estas secuencias traducidas contra la base de datos de proteínas, y tBlastn, que permite comparar una secuencia de aminoácidos con la base de datos de nucleótidos (*Alcalde - Alvites, 2016*).

El algoritmo que utiliza el programa es heurístico, consta de tres etapas: seeding (compilación de una lista de palabras de alta puntuación y búsqueda de hits en la base de datos), extensión (extendido a ambos lados en los hits) y evaluación (cálculo de un parámetro que permite juzgar los resultados obtenidos) (*Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990*).

1.4.8.2 Árboles filogenéticos

Para la reconstrucción filogenética se utilizan los árboles filogenéticos que son diagramas que ilustran el patrón y el tiempo de divergencia en la historia evolutiva de un taxón. Estos árboles están constituidos por nodos que soportan las ramas conectando los individuos de ese taxón. El ancestro

común de todos los nodos es la raíz. Los nodos cuando son capaces de dividir los grupos filogenéticos, se denominan nodos resueltos. Se considera que la longitud de las ramas son proporcionales a la cantidad de divergencia genética entre los taxones (*Allendorf & Luikarf, 2007*).

Por lo general es importante obtener un estimado estadístico de la fiabilidad de algunos grupos. En esencia, la fiabilidad se mide como la probabilidad de que los miembros de un clado dado son siempre los miembros de ese clado. Los filogenetistas usan un método de muestreo llamado “bootstrapping” para estimar la fiabilidad del árbol, el cual seudorepite los datos entre 100 a 1000 veces. Así, se considera altamente confiable un clado con un valor de “bootstrap” mayor igual o mayor a 90%, en cambio un valor de 25% no es del todo confiable (*Hall, 2001*).

1.5 HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

La aplicación de nanopartículas metálicas de hierro elemental en la remoción de los TPHs de suelos contaminados disminuye la población bacteriana heterótrofa y degradadora de dicho suelo.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El proyecto de titulación fue desarrollado por Carolina Liseth Varela Carrión, con la colaboración de Andrés Izquierdo Ph,D. Director del Proyecto, Luis Cumbal Ph,D y Quim. Erika Murgueitio, Asesores Científicos.

2.2 Zona de Estudio

Los estudios se realizaron en campo y laboratorio:

2.2.1 Fase de campo

El trabajo en el campo se llevó a cabo en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas, cantón La Concordia, recinto El Rosario, parroquia Plan Piloto, km. 32 vía Quinindé. Con coordenadas Latitud: 0°04.105'S; Longitud: 079°20.275'O, Altura media: 298 m.s.n.m.

2.2.2 Fase de laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de Microbiología Ambiental, Laboratorio de Medio Ambiente y de Materiales Avanzados del *Centro de Nanociencia y Nanotecnología, Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE*, ubicado en Sangolquí en la Av. El Progreso s/n, parroquia Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha, Ecuador de coordenadas Latitud: 0°18'53.5"S, Longitud: 78°26'36.5"O, Altura Media: 2700 m.s.n.m.

2.3 Periodo de investigación

El proyecto contempló los meses desde octubre del 2016 hasta febrero del 2017, con una duración de cuatro meses.

2.4 Diseño experimental

Para el análisis de crecimiento población bacteriana (cel / g de suelo) y la remoción de fenantreno, se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), se trabajó con 12 tratamientos por triplicado, es decir 36 unidades experimentales. Todos los tratamientos fueron sembrados en medio LB 1/10 y medio mineral + fenantreno, medios de los cuales posteriormente se analizó la cinética poblacional bacteriana y se aisló las bacterias a ser identificadas, la información de los tratamientos se detalla en la tabla 2:

Tabla 2

Diseño Completamente al Azar (DCA), de tratamientos de remoción de TPHs (fenantreno) con la aplicación de nanopartículas de hierro elemental.

Tiempo	Tratamiento	Repeticiones	Descripción
Día cero (0)	T1 – E1	3	Tratamiento control Suelo contaminado con fenantreno
	T2 – E2	3	Tratamiento control Suelo contaminado con fenantreno
	T3 – E1	3	Tratamiento 1.1 Suelo contaminado con fenantreno tratado por 48 horas con nanopartículas de hierro elemental sin filtrar + mortíño
Día dos (2)	T4 – E2	3	Tratamiento 2.1 Suelo contaminado con fenantreno tratado por 48 horas con nanopartículas de hierro elemental filtradas + mortíño
	T5 – E1	3	Tratamiento 1.2 Suelo contaminado con fenantreno tratado por 96 horas con nanopartículas de hierro elemental + mortíño
Día cuatro (4)	T6 – E2	3	Tratamiento 2.2 Suelo contaminado con fenantreno tratado por 96 horas con nanopartículas de hierro elemental + borohidruro de sodio
	T7 – E1	3	Tratamiento 1.3 Suelo contaminado con fenantreno tratado por 144 horas con nanopartículas de hierro elemental + mortíño.

Día seis (6)	T8 –E2	3	Tratamiento 2.3 Suelo contaminado con fenantreno tratado por 144 horas con nanopartículas de hierro elemental + borohidruro de sodio.
--------------	--------	---	--

T (Tratamiento) E (Ensayo)

Diseño Completamente al Azar (DCA), de tratamientos de remoción de TPHs (fenantreno) con la aplicación de nanopartículas de hierro elemental. (Continuación de la Tabla 2)

Tiempo	Tratamiento	Repeticiones	Descripción
		3	Tratamiento 1.4
	T9 –E1		Suelo contaminado con fenantreno tratado por 192 horas con nanopartículas de hierro elemental + mortíño
Día ocho (8)			
	T10 –E2	3	Tratamiento 2.4 Suelo contaminado con fenantreno tratado por 192 horas con nanopartículas de hierro elemental + borohidruro de sodio.
	T11 – E1	3	Tratamiento 1.5 Suelo contaminado con fenantreno tratado por 240 horas con nanopartículas de hierro elemental + mortíño.
Día diez (10)			
	T12 –E2	3	Tratamiento 2.5 Suelo contaminado con fenantreno tratado por 240 horas con nanopartículas de hierro elemental + borohidruro de sodio.

* T (Tratamiento)

* E (Ensayo)

2.5 Procedimientos de aislamiento

2.5.1 Preparación de medios de cultivo

Para la evaluación de la cinética bacteriana y el aislamiento de bacterias heterótrofas y degradadoras se utilizaron dos medios de cultivo: medio Luria Bertani 1/10 (Wang, 1992) y medio mineral (Martínez, Ramírez, & Valle, 1997), el medio mineral fue suplementado con el contaminante fenantreno.

Los componentes de cada medio de cultivo se presentan en el Anexo D.

2.5.2 Toma de muestras

El muestreo se realizó en el recinto El Rosario, km 32 de la vía Quinindé, cantón Concordia, Provincia Santo Domingo de los Tsáchilas, del cual se tomó suelo limpio a una profundidad de 50 cm aproximadamente, en dicho suelo existe un derrame de petróleo a una profundidad de 30 m el cual ha alcanzado hasta el acuífero, la pluma de contaminación es de aproximadamente 4 hectáreas. Se trabajó solamente con el suelo limpio de dicha zona y contaminado artificialmente, ya que en un futuro se pretende aplicar esta tecnología en dicho campo.

La recolección de las muestras de suelo se realizó en costales previamente desinfectado con alcohol para la muestra de suelo limpio.

2.5.3 Procesamiento de la muestra

3.5.3.1 Contaminación del suelo limpio

En el laboratorio se realizó la contaminación del suelo limpio con fenantreno, en una concentración de 2500 ppm, el cual se homogenizó manualmente por una hora posterior se dejó 24 horas en el reactor para tener una concentración uniforme en todo el suelo.

2.5.3.2 Aplicación de nanopartículas de hierro elemental (NPHE) en los suelos contaminados.

La síntesis de nanopartículas se basó en el protocolo estandarizado por Murgueitio (2016) el cual establece preparar una solución de 0,5 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en un matraz de 500 mL. A continuación, el pH del extracto de la fruta se dejó en 9 para *V. floribundum* (mortiño), previamente dichas soluciones fueron pasadas por una línea de nitrógeno por 5 minutos cada una, posteriormente se deja caer gota a gota dicho extracto lentamente manteniendo una relación de 10: 1 (w / v), el contenido se agitó en un agitador orbital a 100 rpm. A continuación se procedió a filtrar la solución de nanopartículas por papel filtro, seguido de papel harman y finalmente por un

filtro de 0,45 μm . La formación de un precipitado negro en el matraz es una indicación del crecimiento de Fe (0) nanopartículas (Figura 6).

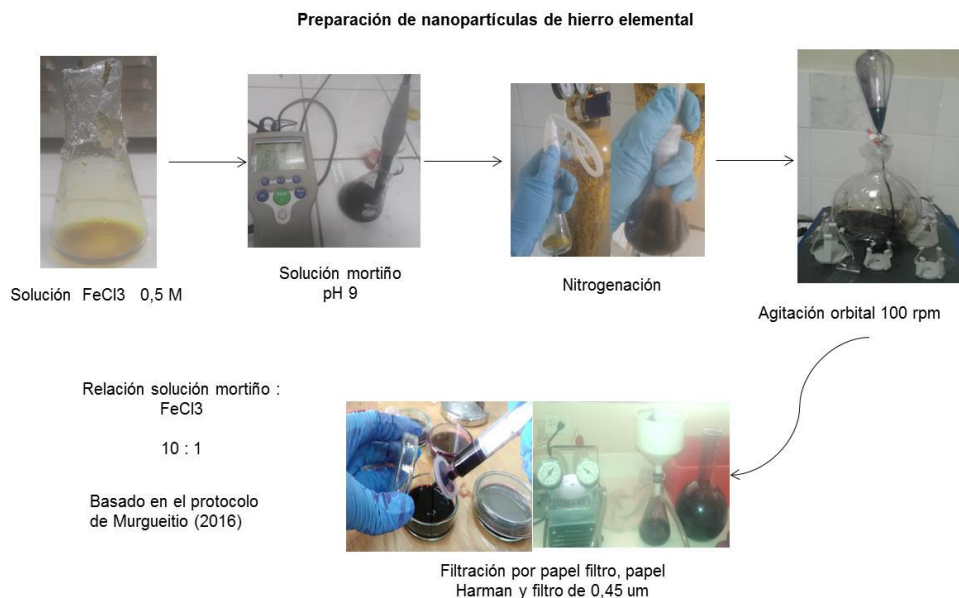


Figura 6 Preparación de las nanopartículas de hierro elemental

Fotografías: Carolina Varela, 2016.

Se aplicó 90 mL de la solución de NPHE a la muestra de 10 g de suelo contaminado, en los dos ensayos: Ensayo N°1 se aplicó las nanopartículas en solución sin filtrar sobre el suelo contaminado con fenantreno y en el Ensayo N°2 se aplicó la solución nanopartículas filtrada sobre el suelo contaminado, ambos ensayos fueron colocados en un reactor tipo batch por 10 días (Figura 7).

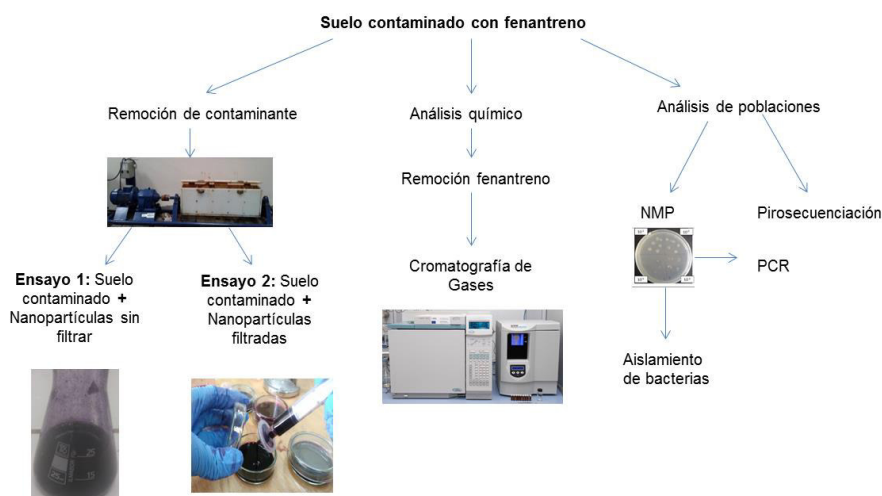


Figura 7 Esquema del protocolo experimental

2.5.4 Cinética de la población bacteriana degradadora y heterótrofa

La cinética de las bacterias heterótrofas se evaluó de acuerdo al protocolo establecido por Fernández (2006), según la técnica del número más probable se colocó 3g de suelo en 27 mL de solución salina (SS) 0,9%, posteriormente se agitó las muestras del suelo en la (SS) por 30 minutos y se dejó decantar por 30 minutos. Se realizaron diluciones en serie, transfiriendo 1mL del sobrenadante a un tubo con 9 mL de SS, desde la dilución 10^{-1} a 10^{-8} y se sembró en medio LB 1/10, para la siembra la caja previamente estuvo dividida en cuatro zonas y rotulada con la respectiva dilución, en cada zona se inocularon 5 μ L de cada dilución en cinco punto del área correspondiente. Ver Figura 8. Las muestras fueron incubadas a 30 °C por 24 horas (Incubadora Memmer modelo INCO 2/108), todos los tratamientos se sembraron por triplicado.

La población degradadora de hidrocarburos se determinó por el método del número más probable (NMP), se sembró en medio mineral basal suplementado con fenantreno (Ver Anexo D), se inoculará 5 μ L de cada dilución, como se describió anteriormente (Fernández L. , 2006). Las muestras fueron incubadas por 7 días a 30 °C, todos los tratamientos se sembraron por triplicado.

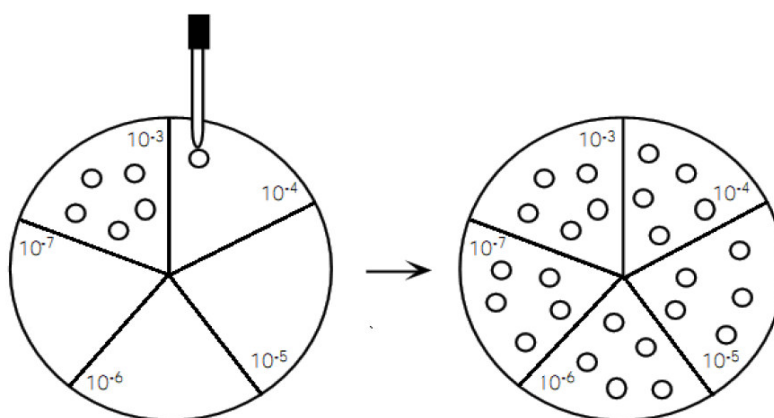


Figura 8 Diluciones y siembra de muestras para conteo de microorganismos

Fuente: Fernández, 2006.

2.5.5 Obtención de cultivos puros

Las cepas fueron aisladas de las placas del número más probable, de estas se procedió a observar características y resembrar una colonia aplicando la técnica de estriado en un nuevo medio estéril respectivo ya sea LB1/10 o medio mineral (fenantreno), se dejó incubar por 24h a 30 °C (Incubadora Memmer modelo INCO 2/108) y se observó el crecimiento.

2.5.6 Determinación de las características macroscópicas del cultivo

Según Bailon *et al* (2003), las características macroscópicas de un cultivo que deben evaluarse son las siguientes:

- Tamaño: diámetro en mm.
- Forma: puntiforme, circular, filamentosa, irregular, rizoide.
- Elevación: plana, sobre elevada, convexa, pulvonada, umbonada, umbilicada.
- Margen (borde): entero, ondulante, lobulado, lacerado, filamentoso, rizado.
- Color: blanco, amarillo, negro, naranja, etc.
- Superficie: brillante, opaca, erizada, rugosa.
- Transmisión de luz: opaca, translúcida, transparente.

- Consistencia: cremosa, seca, mucoide, viscosa, membranosa.

2.5.7 Determinación de las características microscópicas del cultivo

Para reconocer las características microscópicas se realizó una tinción Gram de las colonias puras obtenidas, distinguiendo entre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Las características de color y forma se las observó mediante el aumento de 100 X.

2.6 Extracción de ADN

Se realizó el crecimiento de las cepas en caldo LB 1/10 tanto para bacterias heterótrofas como degradadoras incubadas por 24 horas a 30°C, para obtener la biomasa del cultivo fresco. Se utilizó el protocolo de "CTAB para la extracción de ADN genómico de bacterias". Anexo E (*Moore, Arnscheidt, Kruger, Strompl, & Mau, 2004*).

Como sugiere Fernández *et al.* (2012), el ADN extraído fue cuantificado en el NanoDrop 8000 UV-Vis Spectrophotometer marca Thermo Scientific. La calidad del ADN se determinó a través de la relación de absorbancia 260/280 nm, la cual se utiliza para evaluar la pureza de ADN y ARN. Una proporción de ~ 1,8 es generalmente aceptada como "Puro" para el ADN (*Scientific, 2010*). Se ajustaron las concentraciones de ADN a una concentración final de 40 ng/μL.

2.7 Amplificación de gen 16S rRNA mediante PCR

Se amplificó el gen 16S rRNA de todas las muestras, utilizando cebadores universales como son el 27F y 1492R, Tabla 3 (Galkiewics & Kellogg, 2008; Pedersen, 2008). Las reacciones de PCR se realizaron con el kit GoTaq® Green Master Mix, con un volumen final de 25 μL de cada muestra, Tabla 4. Las condiciones de la PCR en el termociclador fueron las siguientes: 94°C por 5min para la fase de desnaturalización, 94°C por 30s, 55°C por 1min y 72°C por 1min para la fase de hibridación y 72°C por 7 min

para la fase de polimerización, por 35 ciclos. Finalmente se mantiene a 4°C por 10 min.

Tabla 3

Cebadores utilizados para la amplificación de ARNr 16S.

Cebador	Técnica	Secuencia 5'- 3'	Bases	Fuente
27 f	PCR (ARNr 16S)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	20	Galkiewicz y Kellogg 2008; Pedersen 2008
1492 r	PCR (ARNr 16S)	TACGGYTACCTTGTTACGACTT	22	Galkiewicz y Kellogg 2008; Pedersen 2008

Tabla 4

Cantidades de los componentes de la PCR, kit GoTaq® Green Master Mix.

Componente	Volumen (µL)	Concentración Final
GoTaq® Green Master Mix, 2X	12,5	1X
Cebador reverso, 10µM	1,5	0,1-1,0 µM
Cebador directo, 10µM	1,5	0,1-1,0 µM
Muestra de ADN	2,5	<250ng
Agua ultra pura	7	N.A
Volumen final por muestra	25	

2.8 Electroforesis

Los productos de PCR obtenidos tras la amplificación del gen 16S rRNA, fueron visualizados en High Performance UV – transiluminador mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Para la preparación se utilizó 1.0 g de agarosa y 100 mL de tampón TAE 1X. La solución se calentó hasta la ebullición en las planchas de calentamiento. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadió 350 mL de GelStar™ 10X concentrado en DMSO.

Los productos de PCR se corrieron mediante una electroforesis horizontal en solución tampón TAE 1X. El gel se cargó con 5 μ L los productos de PCR, el control negativo y el marcador molecular 1kb AND Ladder (Promega). La electroforesis se programó por un tiempo de 40 minutos.

2.9 Análisis de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Posteriormente a los productos de amplificación del gen 16S rRNA se les realizó un análisis de RFLPs, utilizando la enzima de restricción Msp (BioLabs), la cual corta los enlaces fosfodiéster entre dos citosinas que son seguidas por dos guaninas en ambos sentidos. Al cortar los fragmentos amplificados, se generó un patrón de bandas distinto para cada especie, (Tabla 5) (*Pinoncely, 2010*).

Tabla 5

Componentes del protocolo de análisis con enzimas de restricción para un volumen final de 20 μ L por muestra.

Componente	Volumen (μ L)
10X NE buffer	2
BSA 100X	0,2
MspI	0,25
Agua ultra pura	7,55
Producto de PCR	10
Volumen final	20

Fuente: (*Adley, 2006*).

Las muestras para RFLPs se incubaron a 37 °C, por 2 h. Para la visualización de los cortes de los fragmentos que realizó la enzima MspI, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1%, a 100V por 50 min. Posteriormente los fragmentos de restricción obtenidos fueron agrupados según los patrones observados.

Posteriormente se seleccionaron las muestras de ADN que fueron enviadas a Korea, a la empresa MacroGen en Korea que se encargó del proceso de la purificación del ADN y secuenciación con el método de Sanger.

2.10 Análisis de secuencias

2.10.1 Limpieza y ensamblaje.

Para analizar las secuencias de ADN enviadas por MacroGen Korea se utilizó el programa Geneious R10.0.7 para realizar la limpieza de las secuencias, en el programa se visualizó la calidad de ADN mediante el análisis de electroferogramas de las secuencias forward y reverse. Posteriormente, se realizó el ensamblaje de las secuencias, para la formación de los contigs se usó un límite de probabilidad de error de 0,02 valores que genera una alta sensibilidad. Finalmente se generaron las distintas secuencias consenso.

2.10.2 Análisis de similitud y homología

Se realizó un BLASTN de las secuencias consenso obtenido, con las secuencias de material tipo de la base de datos NCBI. Este proceso permite determinar el nivel máximo de identidad, establecer el grado de similitud y la posibilidad de homología entre secuencias (*Cañizares & Blanca, 2015*). Los parámetros estudiados fueron porcentaje de identidad y porcentaje de cobertura de secuencias.

2.10.3 Análisis filogenético.

En el análisis filogenético se seleccionaron secuencias de bacterias lo más cercana a la secuencia en estudio, dichas secuencias tuvieron un alto porcentaje de identidad y cobertura de especímenes tipo de la base de datos del NCBI.

El árbol filogenético fue construido mediante el software MEGA 7, programa en el cual se realizaron los alineamientos para cada grupo de

secuencias mediante la función MUSCLE. Se hizo uso del sitio online Gblocks para revisar los alineamientos, software que elimina a las regiones ambiguas de las secuencias. El modelo de evolución del árbol filogenético fue dado por el programa MEGA 7, dicho modelo permitió conectar los alineamientos con los métodos de construcción filogenética. El árbol filogenético se construyó utilizando el método probabilístico de máxima verosimilitud.

2.11 Determinación del efecto de inhibición de las nanopartículas de hierro elemental

2.11.1 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La Concentración mínima inhibitoria, está definida como la concentración más baja de un agente que evita el crecimiento visible de microorganismos (Miller, et al., 2005).

Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar la sensibilidad *in vitro* de las bacterias degradadoras previamente identificadas frente a diferentes cantidades de la solución de NPHE (San Martín, 1996).

2.11.1.1 Método de difusión de disco

Se realizó el ensayo de actividad inhibitoria en medio sólido como describe el método de difusión de disco (Bauer, Kirby, Sherris, & Turck, 1996). Se sembró por extensión 100µL de la bacteria crecida en caldo en medio LB 1/10. Posteriormente, se añadió 10µL de la solución de nanopartículas de hierro elemental a los discos de papel, en cada caja se colocó tres discos, un disco blanco como control negativo y dos discos con la solución de NPHE, se realizaron tres replicas por ensayo. Se incubó a 30° C por 24 horas, la inhibición se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición que se forma alrededor.

Otra variante realizada en el ensayo, fue sembrar por extensión 100µL de la bacteria crecida en caldo en medio LB 1/10, previamente en este

medio se realizó cuatro perforaciones en el agar y en cada perforación se inoculó 25, 50, 75 y 100 μL de la solución de NPHE respectivamente, se realizaron tres replicas por ensayo. Se incubó a 30° C por 24 horas, la inhibición se determinó midiendo el diámetro del halo de inhibición que se forma alrededor.

2.11.1.2 Método en caldo

El método de microdilución para la estimación de los valores de CMI fue realizado de acuerdo con los protocolos publicados por otros autores (Martínez, et al., 2010; Wayne, 2003).

Inicialmente se preparó un preinóculo de las bacterias degradadoras aisladas en caldo Luria-Bertani 1/10, durante 24 horas a 30° C. Posteriormente se hizo el seguimiento de la cinética de crecimiento, partiendo del preinóculo crecido se realizó diluciones seriadas hasta 10^{-6} en tubos con solución salina al 0,9%, en cada tubo de las diluciones se agregó 1 mL de la solución de nanopartículas 0,5 M y fueron incubados por 2, 4, 6, 8 y 10 horas. Se sembró por extensión 100 μL de cada dilución en agar LB 1/10 en los respectivos tiempos, se dejó incubar por 24 horas a 30° C y se evaluó las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL). Se realizó por triplicado el ensayo. Para evitar el crecimiento de otras bacterias que se podrían encontrar en las NPHE se realizó un proceso de pasteurización manteniendo a 72 °C por 15 segundos y 10 segundos a 4 °C.

2.12 Preparación del cepario

Una vez identificadas las bacterias heterótrofas y degradadoras se procedió a realizar un cepario por dos métodos: el primero consistió de la siembra de las bacterias en tubos con agar inclinado LB 1/10 y el segundo en glicerol, para este método se hizo crecer a las cepas previamente en agar LB 1/10, posteriormente se las hizo crecer en caldo LB 1/10. Se dejó incubar a 30°C por 48h. En tubos ependorf de 2mL se colocó 800 μL de caldo con la cepa desarrollada y 200 μL de glicerol previamente autoclavado, se dejó a -20 °C por una semana y se las guardó a -80°C, previamente identificadas.

2.13 Remoción de TPHs (fenantreno) por la aplicación de nanopartículas de hierro elemental (NPHE)

Las muestras del suelo tratado con las NPHE fueron sacadas cada 2 días del reactor tipo batch durante los 10 días de tratamiento, se tomó 2g de cada muestra del suelo y se lo mando a analizar en el Laboratorio de Medio Ambiente de la Universidad de las Fuerzas Armadas. En este laboratorio las muestras fueron analizadas por Cromatografía de Gases en el cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 400 mediante el método (EPA 8015C, 2000), como también se encargaron de la extracción de TPHs (fenantreno) mediante el método (EPA 3550B, 1996), proceso en el cual la muestra se mezcla con sulfato sódico anhidro, posteriormente se realizaron extracciones seriadas liquido- liquido en diclorometano.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Cinética de la población bacteriana degradadora y heterótrofa

Los datos de cinética de la población bacteriana degradadora y heterótrofa tanto para el Ensayo N°1 y el Ensayo N°2 fueron calculados de acuerdo a la tabla propuesta por (*Woomer, Martín, & Albercht, 1994*) (Anexo F).

La cinética de la población bacteriana degradadora y heterótrofa del Ensayo N°1, correspondiente a la aplicación de las nanopartículas de hierro elemental (NPHE) sin filtrar, se muestra en la tabla 6. Los valores obtenidos del Número más probable de bacterias varían entre 1×10^8 y $9,20 \times 10^7$ células/ g suelo para bacterias heterótrofas del suelo, en el sobrenadante el número más probable de bacterias heterótrofas se encuentra en promedio de $2,28 \times 10^9$ células/ g de suelo. Mientras que el número más probable de bacterias degradadoras en el suelo varía entre $1,14 \times 10^7$ y $1,43 \times 10^7$ células / g de suelo, en el sobrenadante el número más probable de bacterias degradadoras varía entre $9,20 \times 10^7$ y $1,81 \times 10^8$ células / g de

suelo. La cinética bacteriana evidencia que los días de mayor crecimiento durante el tratamiento se encuentra entre los 2 y 4 días tanto para bacterias degradadoras como heterótrofas, posterior a este tiempo empieza a existir un decrecimiento en la población bacteriana, sin embargo en el día 10 aún existe la presencia de un número significativo de bacterias (Figura 9), que pueden continuar degradando al fenantreno.

Tabla 6

Número más probable de bacterias heterótrofas y degradadoras de fenantreno bajo la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental sin filtrar.

Días	Bacterias heterótrofas		Bacterias degradadoras	
	Suelo	Sobrenadante	Suelo	Sobrenadante
	NMP (células / g de suelo)	NMP (células / g de suelo)	NMP (células / g de suelo)	NMP (células / g de suelo)
0	1,00E+08* ($\pm 0,5$)		1,14E+07 ($\pm 1,8$)	
2	4,90E+08 ($\pm 0,5$)	1,91E+09 ($\pm 1,18$)	5,10E+08 ($\pm 0,5$)	9,20E+07 ($\pm 0,5$)
4	4,28E+09 ($\pm 1,18$)	2,16E+09 ($\pm 1,47$)	3,71E+08 ($\pm 2,75$)	1,13E+08 ($\pm 4,29$)
6	1,69E+08 ($\pm 0,95$)	2,68E+09 ($\pm 4,36$)	1,58E+08 ($\pm 8,23$)	1,65E+08 ($\pm 7,33$)
8	2,54E+08 ($\pm 0,59$)	2,73E+09 ($\pm 3,83$)	5,26E+07 ($\pm 3,94$)	3,19E+08 ($\pm 1,33$)
10	9,20E+07 ($\pm 0,5$)	1,90E+09 ($\pm 1,22$)	4,43E+07 ($\pm 6,53$)	1,81E+08 ($\pm 1,31$)

Se muestran los valores de la media junto con el error estándar de la media.

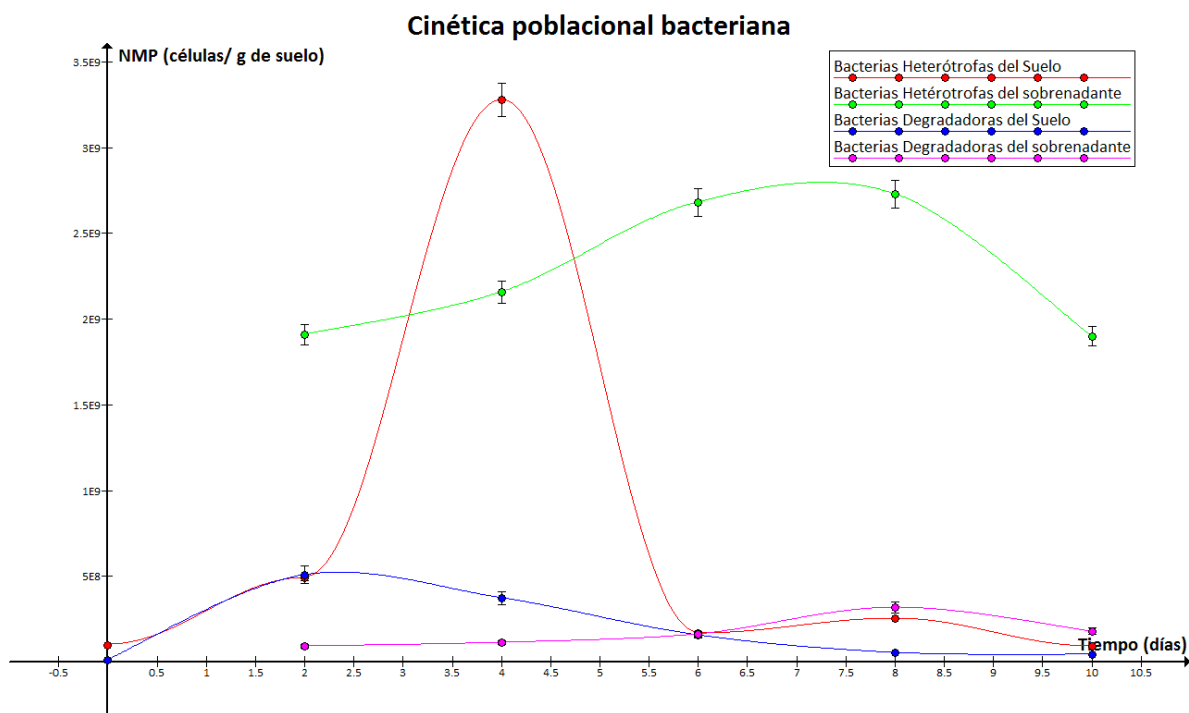


Figura 9 Cinética poblacional bacteriana del Ensayo 1: solución de nanopartículas de hierro elemental sin filtrar aplicado al suelo contaminado con fenantreno.

En el ensayo N°2, en el cual se aplicó la solución de nanopartículas de hierro elemental filtrada sobre el suelo contaminado, la tendencia de la cinética de la población bacteriana degradadora y heterótrofa se muestra en la tabla 7. Los valores obtenidos del Número más probable de bacterias varían entre $2,71 \times 10^7$ y $1,95 \times 10^8$ células/ g suelo para bacterias heterótrofas del suelo, en el sobrenadante el número más probable de bacterias heterótrofas varía entre $2,76 \times 10^{10}$ y $2,22 \times 10^9$ células/ g de suelo. Mientras que el número más probable de bacterias degradadoras en el suelo se encuentran en promedio de $4,91 \times 10^7$ células / g de suelo, en el sobrenadante el número más probable de bacterias degradadoras varía entre $4,11 \times 10^9$ y $8,12 \times 10^8$ células / g de suelo.

La cinética bacteriana evidencia un decrecimiento absoluto en la población bacteriana del sobrenadante tanto para bacterias heterótrofas como degradadoras, las bacterias heterótrofas presentan un mayor crecimiento en el día 4, posterior a este tiempo empieza a existir un

decrecimiento en la población bacteriana, mientras que la población bacteriana degradadora del suelo se mantiene relativamente constante durante todo el ensayo, al término de los diez días aún existe la presencia de un número significativo de bacterias el cual podría ser bioestimulado para que continúe degradando los contaminantes (Figura 10).

Tabla 7

Número más probable de bacterias heterótrofas y degradadoras de fenantreno bajo la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental filtradas.

Días	Bacterias heterótrofas		Bacterias degradadoras	
	Suelo	Sobrenadante	Suelo	Sobrenadante
0	NMP (células / g de suelo)	NMP (células / g de suelo)	NMP (células / g de suelo)	NMP (células / g de suelo)
0	2,71E+07 [*] (±2,97)		3,00E+07 (± 2,08)	
2	4,99E+08 (±2,55)	2,76E+10 (±1,22)	8,40E+07 (±5,76)	4,11E+09 (± 9,92)
4	2,12E+09 (±5,32)	1,97E+09 (± 0,5)	7,83E+07 (±1,37)	1,08E+09 (± 8,86)
6	1,02E+09 (±4,77)	3,18E+09 (± 1,09)	5,80E+07 (±1,79)	3,00E+08 (±1,05)
8	5,93E+08 (± 0,5)	1,75E+09 (± 2,19)	2,22E+07 (± 0,9)	1,52E+08 (± 0,5)
10	1,95E+08 (± 0,5)	2,22E+09 (± 0,9)	2,22E+07(±0,9)	8,12E+08 (± 5,0)

*Se muestran los valores de la media junto con el error estándar de la media.

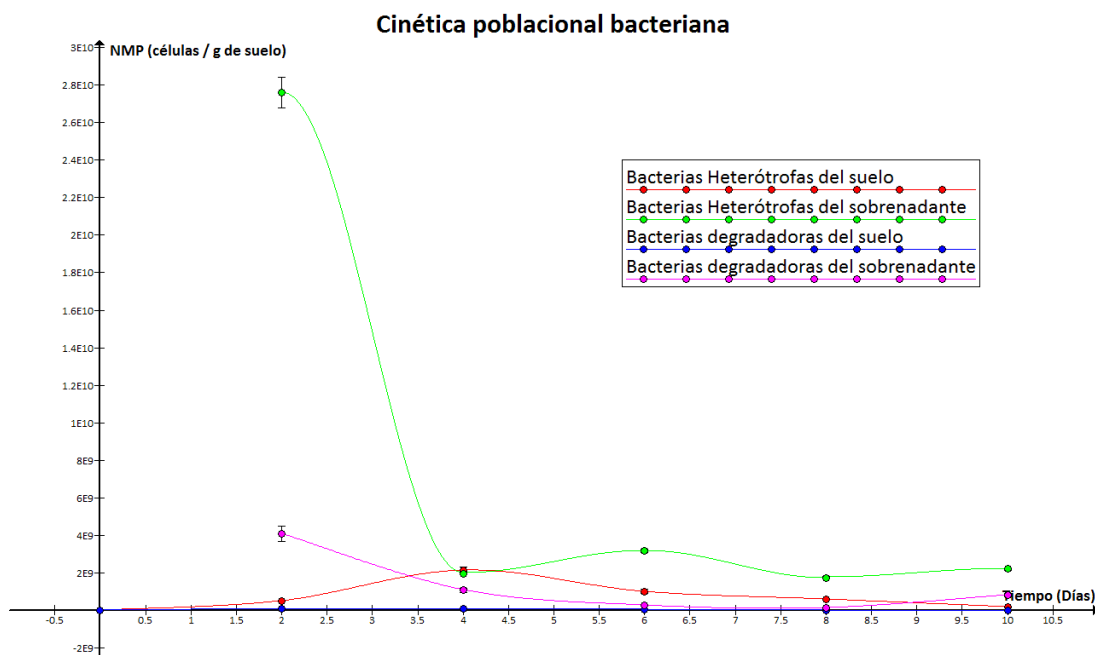


Figura 10 Cinética poblacional bacteriana del Ensayo 2: solución de nanopartículas de hierro elemental filtradas aplicado al suelo contaminado con fenantreno.

3.2 Remoción de fenantreno mediante la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental (NPHE)

Los datos de remoción de fenantreno fueron proporcionados por el laboratorio de Medio Ambiente de la Universidad de las Fuerzas Armadas, se evaluó la remoción del contaminante cada dos días durante los diez días de tratamiento. Para el Ensayo N°1, que corresponde a la aplicación de las nanopartículas de hierro elemental sin filtrar se observó que el mayor porcentaje de remoción del fenantreno fue en el día 2 de tratamiento obteniéndose una concentración de 1549,99 ppm equivalente al 26% de remoción del contaminante los datos se presentan en la Tabla 8. Posterior a este tiempo de dos días se observa que el porcentaje de remoción es muy bajo siendo así que al final del tratamiento en el día 10 se alcanza el 22% de remoción del contaminante equivalente a 1623,26 ppm (Figura 11).

Tabla 8

Remoción de fenantreno del suelo posterior a la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental sin filtrar.

Ensayo 1				
Fenantreno (ppm)				
Día	Suelo	Sobrenadante	Concentración	Porcentaje remoción (%)
0	2094,74* (± 2,29)		2094,74	
2	1307,73 (± 6,60)	242,26 (± 1,26)	1549,99	26,01
4	1532,69 (± 1,57)	347,99 (± 5,55)	1880,68	10,22
6	1300,97 (± 1,86)	266,59 (± 1,56)	1567,57	25,17
8	1358,69 (± 2,03)	271,26 (± 2,70)	1629,95	22,19
10	1372,93 (± 1,51)	250,70 (± 0,18)	1623,63	22,49

*Se muestran los valores de la media junto con el error estándar de la media.

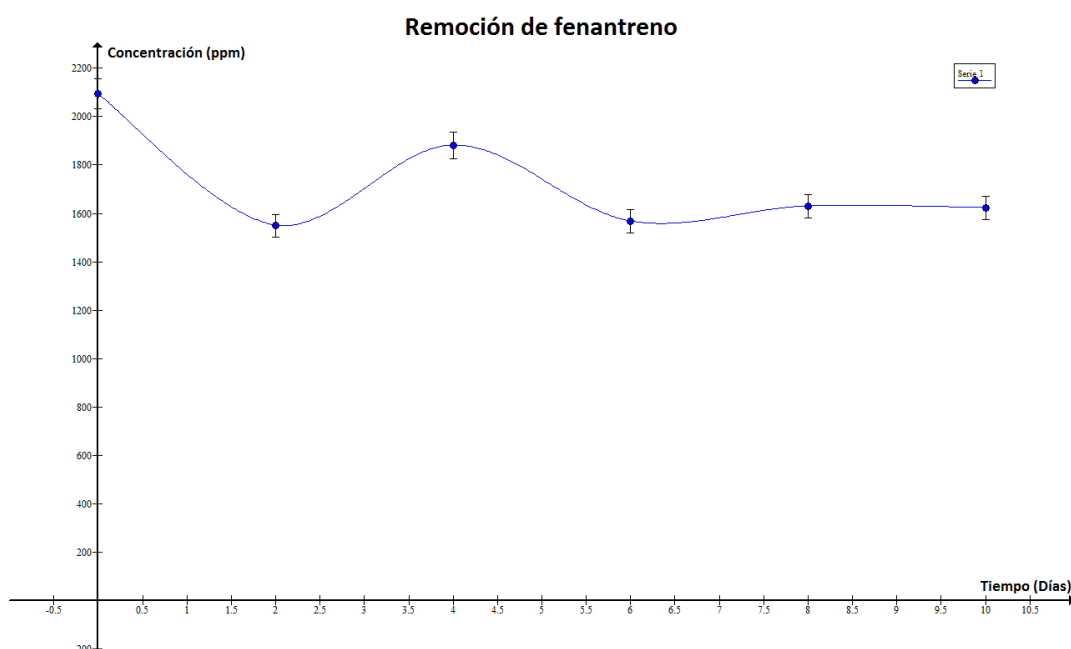


Figura 11 Cinética de remoción del fenantreno Ensayo 1: solución de nanopartículas de hierro elemental sin filtrar aplicado al suelo contaminado con fenantreno.

Para el Ensayo N°2, que corresponde a la aplicación de las nanopartículas de hierro elemental filtradas se observó que durante los diez días de tratamiento existía una disminución considerable del contaminante, los datos se presentan en la Tabla 9. Por lo tanto al final del tratamiento en el día diez se alcanza el 47,87% de remoción del contaminante equivalente a 1040,54 ppm (Figura 12).

Tabla 9

Remoción de fenantreno del suelo posterior a la aplicación de la solución de nanopartículas de hierro elemental filtradas.

Ensayo 2				
Día	Fenantreno (ppm)			Porcentaje remoción (%)
	Suelo	Sobrenadante	Concentración	
0	1996,22* (± 3,37)		1996,22	
2	1165,85 (± 1,26)	615,29 (± 9,20)	1781,14	10,77
4	1449,92 (± 1,64)	304,17 (± 2,20)	1754,09	12,13
6	1079,20 (± 1,88)	376,35 (± 5,98)	1455,55	27,08

8	656,41 ($\pm 2,40$)	313,96 ($\pm 1,20$)	970,36	51,39
10	615,29 ($\pm 1,39$)	425,25 ($\pm 2,40$)	1040,54	47,87

*Se muestran los valores de la media junto con el error estándar de la media.

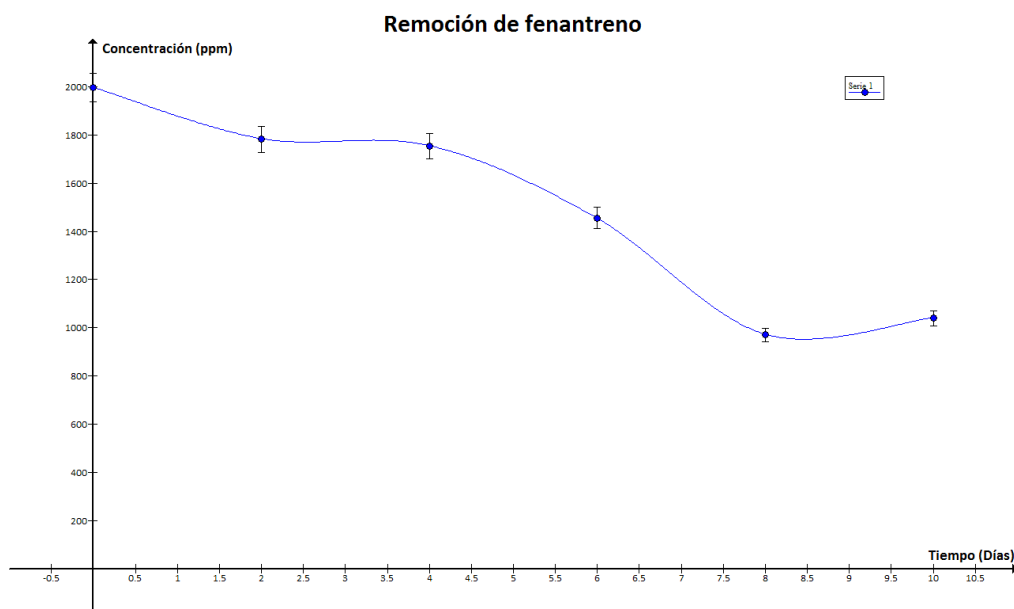


Figura 12 Cinética de remoción del fenantreno Ensayo 2: solución de nanopartículas de hierro elemental filtrada aplicado al suelo contaminado con fenantreno.

3.3 Cultivos puros obtenidos

Se obtuvieron un total de 31 cepas degradadoras y 39 cepas heterótrofas de los dos ensayos, de las cuales 36 provinieron de muestras de suelo y 34 del sobrenadante, en el Anexo A se muestra de dónde provino cada bacteria. El tiempo de incubación fue de 24 h a 30 °C para las cepas de las bacterias heterótrofas y 7 días a 30 °C para las cepas de las bacterias degradadoras, en el momento de la incubación se colocó una caja control negativo para descartar cualquier tipo de contaminación. Las características macroscópicas de las cepas se presentan en el Anexo B. A continuación se muestran ejemplos de los cultivos puros obtenidos (Figura 13).

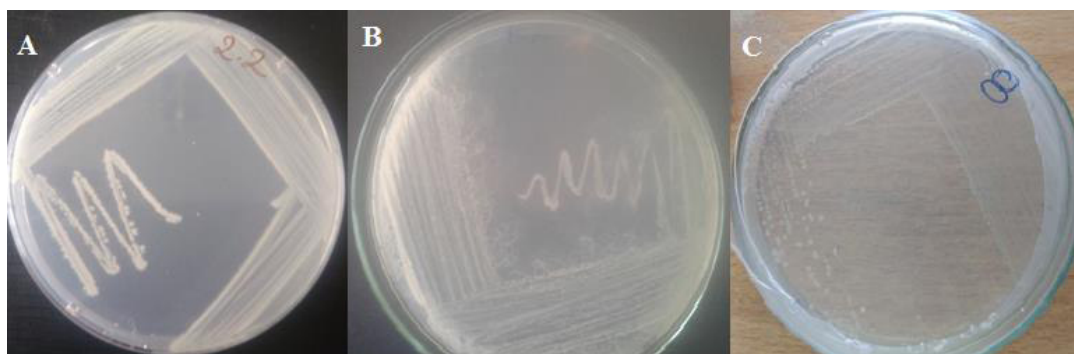


Figura 13 Cepas de cultivos puros.

Nota: A) Cepa D2.2 en medio mineral + fenantreno B) Cepa H.K2 en medio LB 1/10 C) Cepa D8 en medio mineral + fenantreno.

3.4 Características microscópicas de los cultivos

Las características macroscópicas de los cultivos fueron evaluados según los parámetros establecidos por Bailón *et al* (2003), detallados anteriormente en la sección 2.5.6.

A continuación se presentan figuras de la tinción Gram de algunas cepas observadas con el objetivo de 100 X, en el microscopio Olympus CX21 (Figura 14).

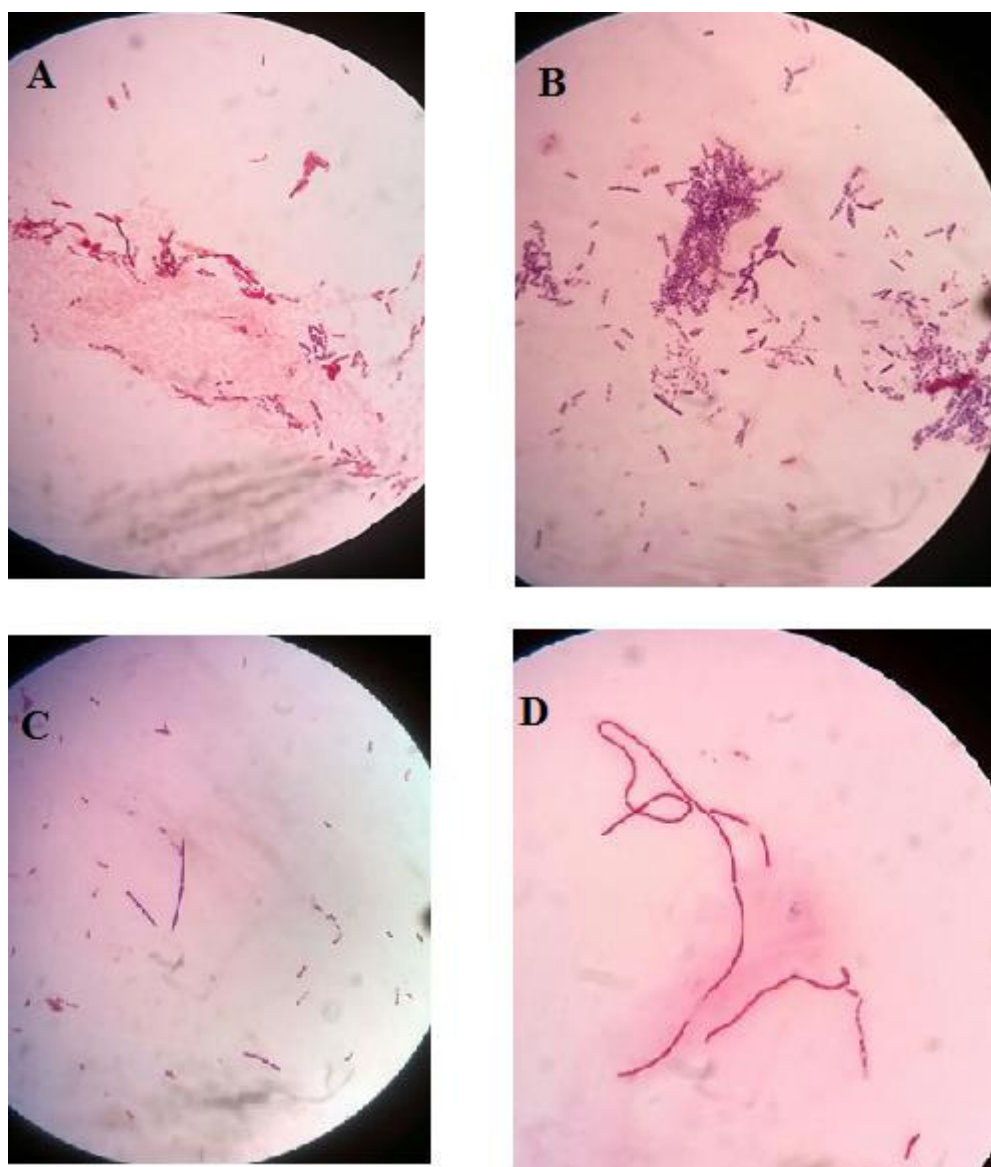
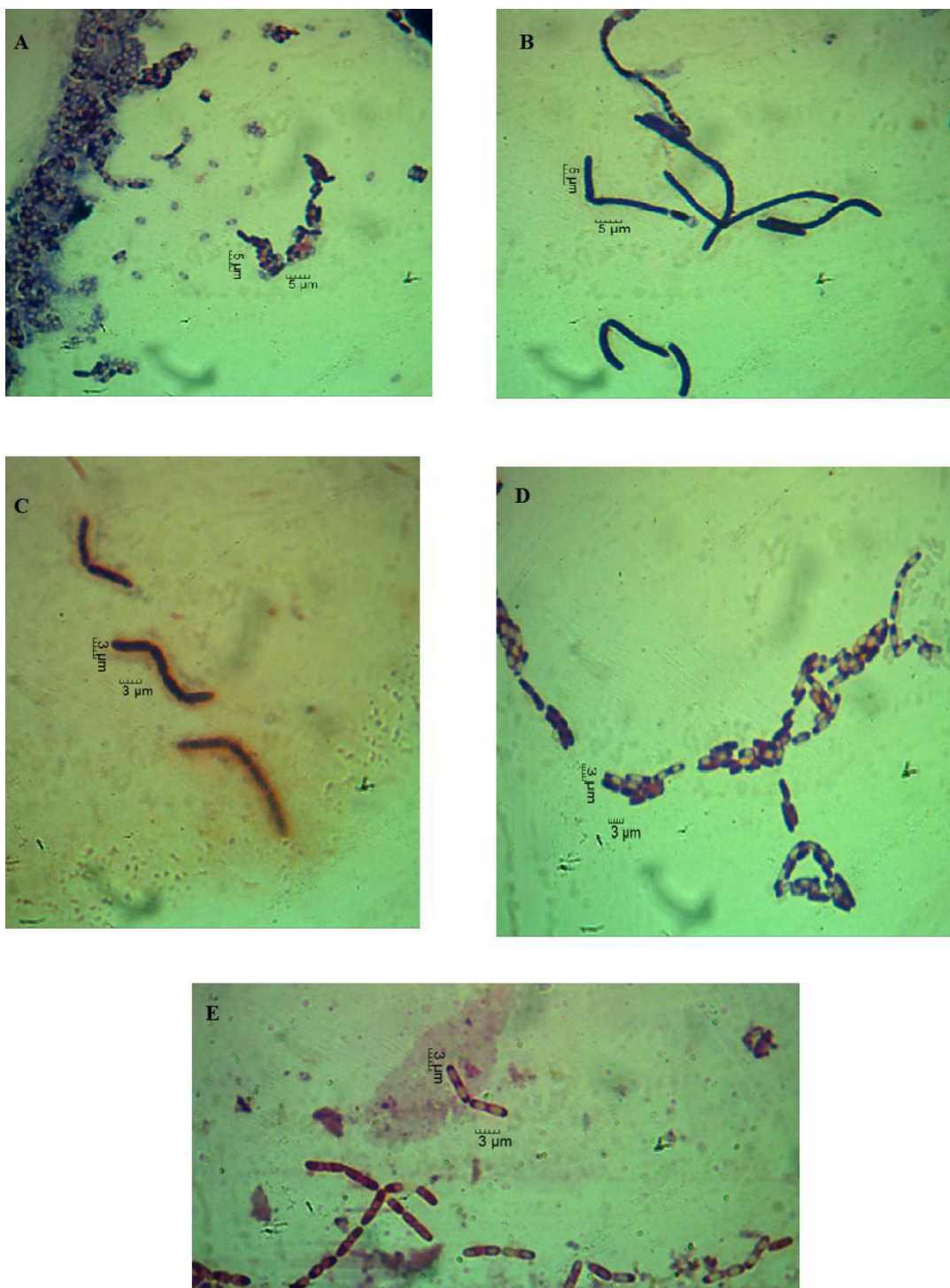


Figura 14 Tinción Gram de cepas bacterianas identificadas observadas con el objetivo de 100X (Olympus CX21)

Nota: A) Cepa D13, bacilos Gram negativos (*Klebsiella oxytoca*), B) Cepa H.K, bacilos Gram positivos (*Lysinibacillus fusiformis*), C) Cepa D.6, bacilos Gram positivos (*Bacillus subtilis*), D) Cepa D2.3, bacilos Gram negativos (*Enterobacter xiangfangensis*).

El tamaño promedio de las bacterias aisladas fue de 3 μm aproximadamente, determinado a través de la captura de fotografías con el software Motican, resolución de la cámara 10 MP, observadas mediante el objetivo de 100X del microscopio Olympus CX21 (Figura 15)



**Figura 15 Tamaño de bacterias. Fotografías Cámara Motican, 10 MP.
Vista microscópica a 100X.**

Nota: A) *Bacillus subtilis* B) *Bacillus megaterium* C) *Enterobacter xiangfangensis* D) *Lysinibacillus fusiformis* E) *Klebsiella oxytoca*

En el anexo B, se presentan datos de caracterización microscópica, como también la procedencia de la muestra (suelo o sobrenadante), el día del tratamiento en el cual fue aislada la cepa, ensayo que pertenece y medio de cultivo en el que crecieron las cepas aisladas.

3.5 Extracción de ADN

La calidad del ADN extraído de la mayoría de las cepas aisladas fueron de buena calidad, parámetro comprobado de acuerdo al rango del ratio 260/280 dado por el nanodrop, indicando así que los valores de pureza se encuentran dentro de los valores mencionados previamente. En el Anexo C se presentan los datos de concentración de ADN y del ratio 260/280

3.6 Amplificación del Gen 16S rRNA

Del total de cepas aisladas se amplificó el gen 16S rRNA con los cebadores 27F y 1492R, se corrió una electroforesis en gel de agarosa para la visualización de los productos de PCR, para ello se utilizó el marcador de 3000pb, las bandas que amplificaron el gen 16S rRNA presento un peso aproximado de 1500 pares de bases, como se ve en la figura 16.

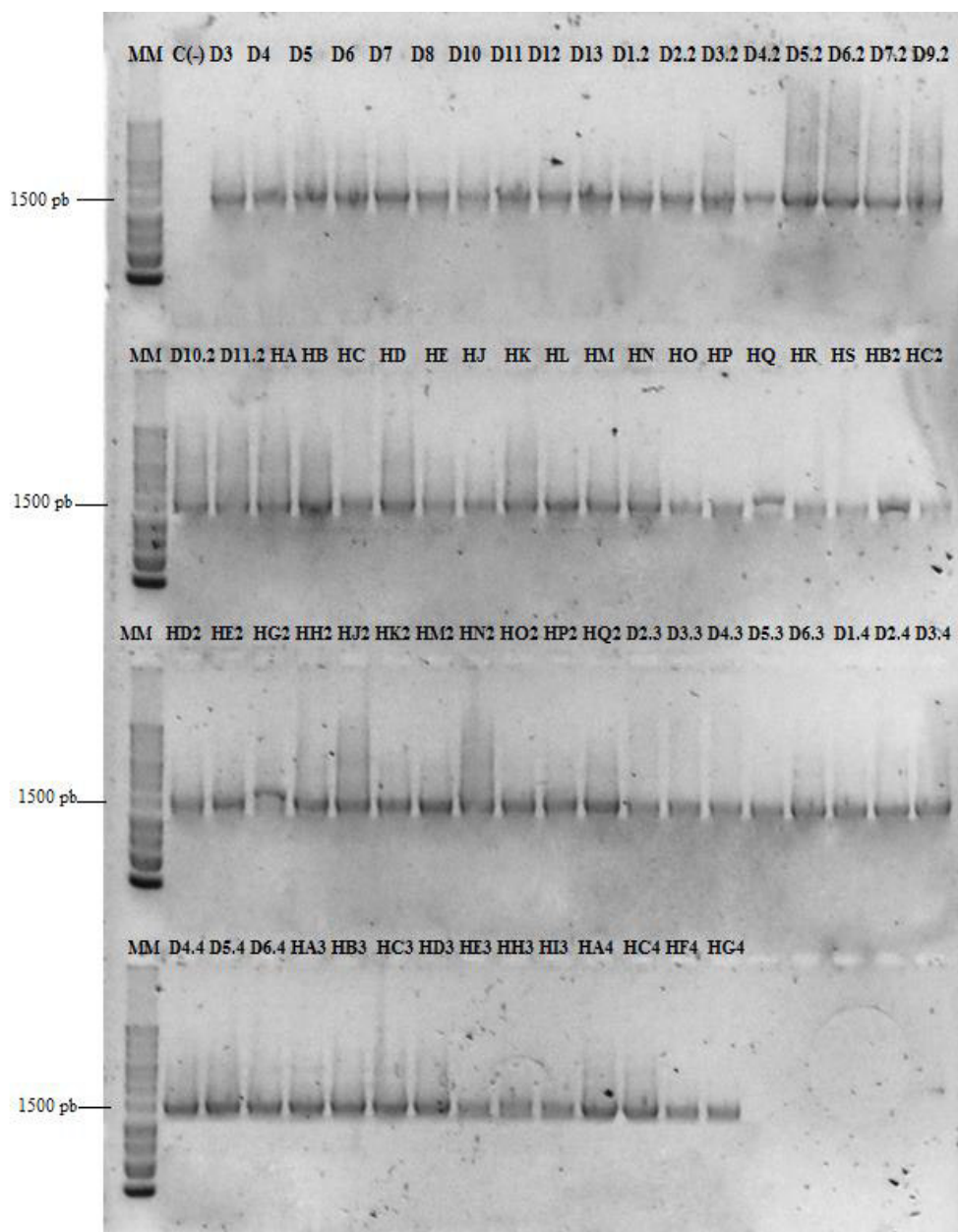


Figura 16 Amplificación del gen 16S rRNA de las muestras de las bacterias degradadoras y heterótrofas.

Nota: Muestras de la D3- D13 (Bacterias degradadoras del suelo Ensayo 1), muestras de la D1.2 – D11.2 (Bacterias degradadoras del sobrenadante Ensayo 1), muestras HA-HS (Bacterias heterótrofas del suelo Ensayo 1), muestras de la HB2 – HQ2 (Bacterias heterótrofas del sobrenadante Ensayo 1), muestras de la D2.3 – D6.3 (Bacterias degradadoras del suelo Ensayo 2), muestras de la D1.4 – D6.4 (Bacterias degradadoras del sobrenadante Ensayo 2), muestras de la HA3-HI3 (Bacterias heterótrofas del suelo Ensayo 2), muestras de la HA4 – HG4 (Bacterias heterótrofas del suelo Ensayo 2).

3.7 RFLPs en gel de agarosa

Los productos de PCR, fueron analizados mediante RFLPs a través de los cortes de fragmentos que realizó la enzima *MspI*, los resultados se visualizaron mediante un gel de agarosa 1%, como se presentan en las figuras 17-22, todos los geles se corrieron con un marcador molecular de 10000 pb.

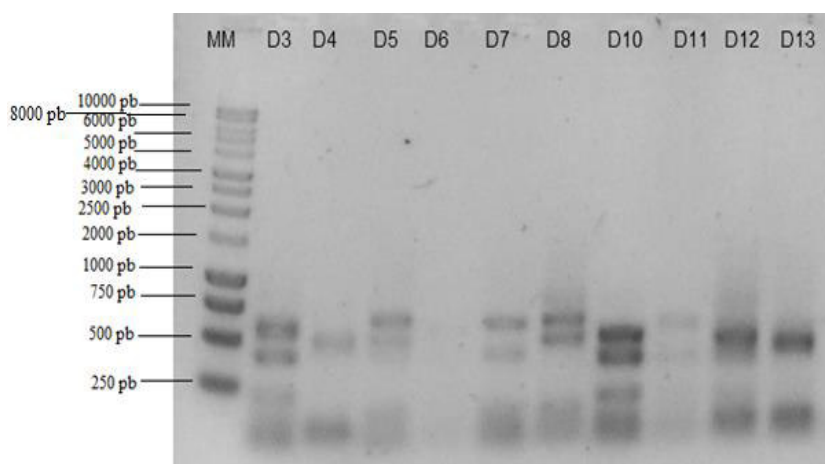


Figura 17 Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima *MspI*, Ensayo N° 1, cepas de bacterias degradadoras del suelo.

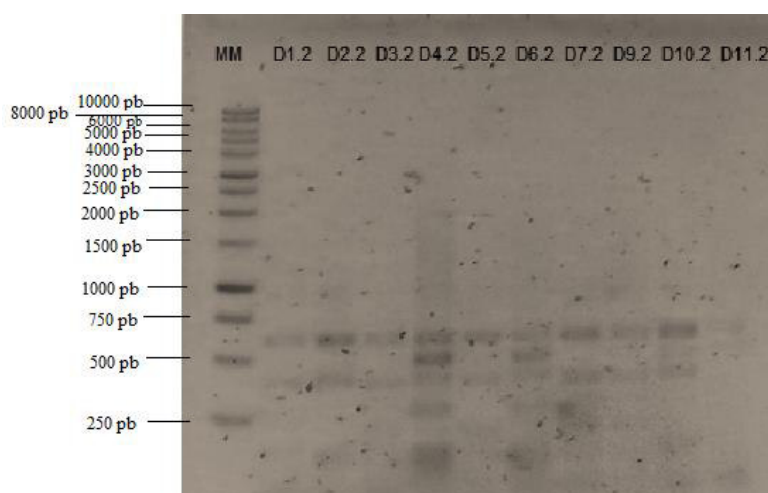


Figura 18 Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima *MspI*, Ensayo N° 1, cepas de bacterias degradadoras del sobrenadante.

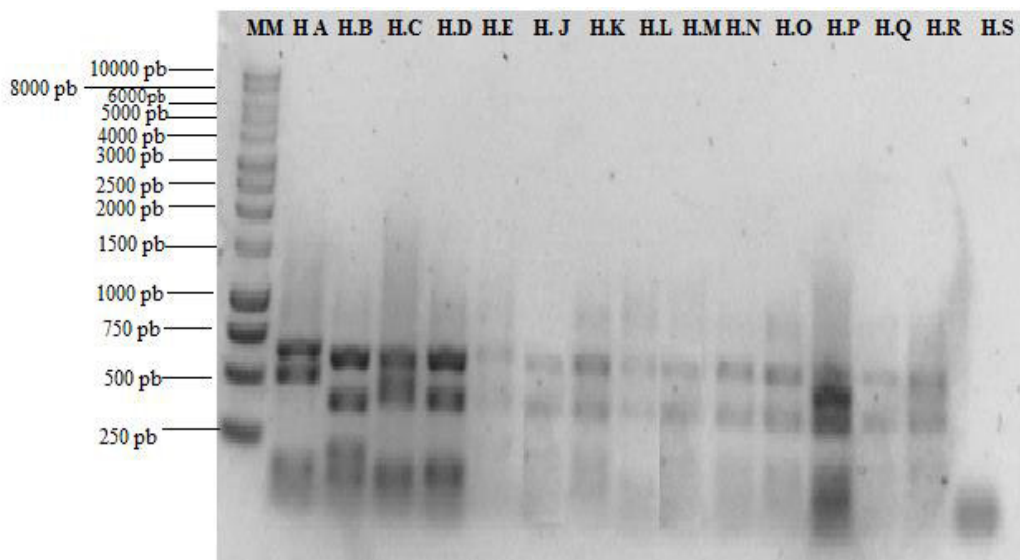


Figura 19 Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, Ensayo N° 1, cepas de bacterias heterótrofas del suelo.

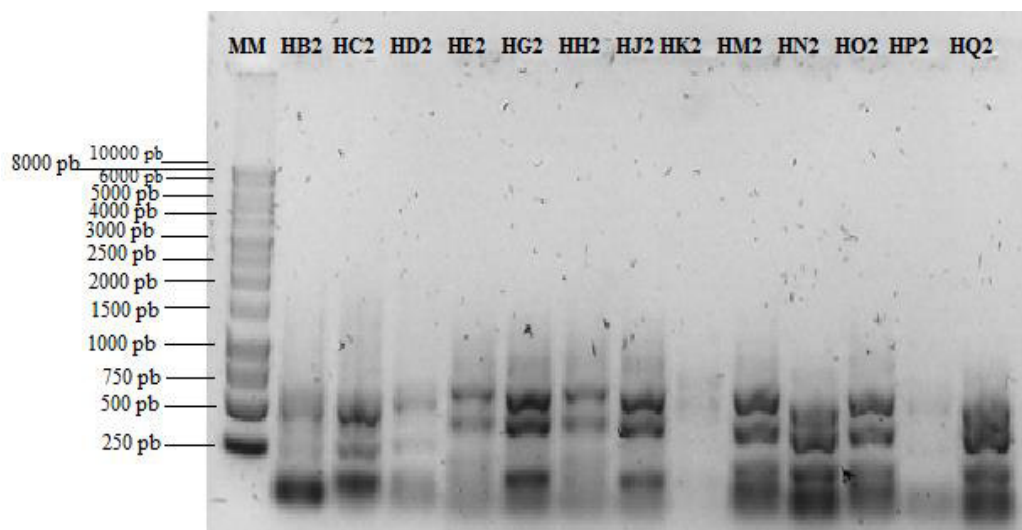


Figura 20 Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima MspI, Ensayo N° 1, cepas de bacterias heterótrofas del sobrenadante.

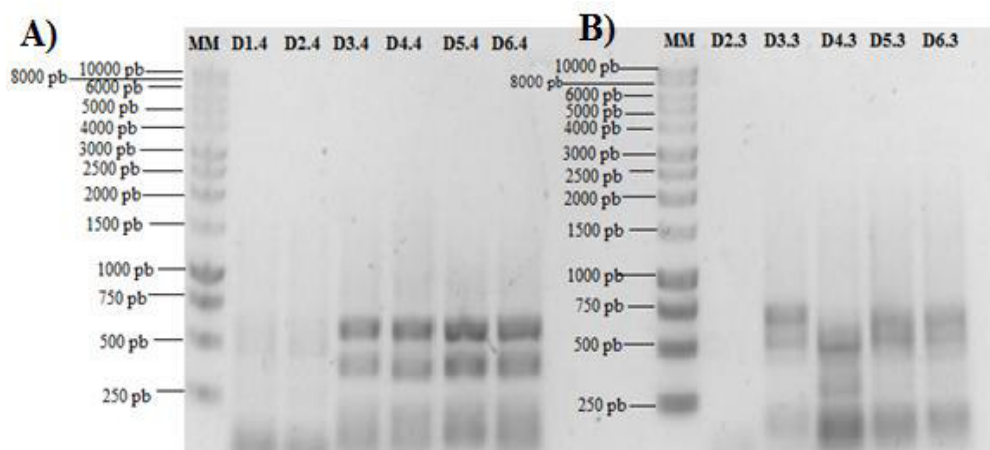


Figura 21 Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima *MspI*, Ensayo N° 2

Nota: A) cepas de bacterias degradadoras del sobrenadante B) cepas de bacterias degradadoras del suelo

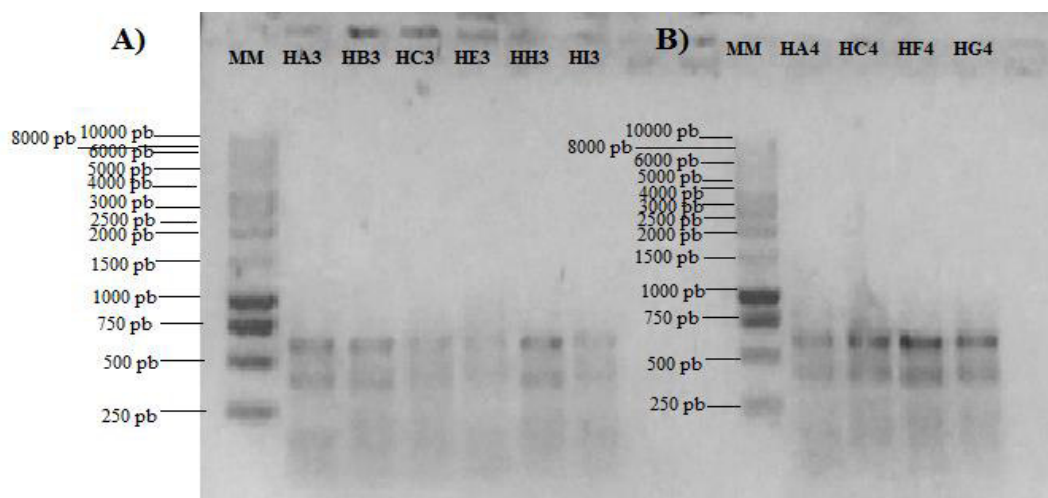


Figura 22 Perfiles de los fragmentos de restricción del gen 16S rRNA cortado con la enzima *MspI*, Ensayo N° 2

Nota: A) cepas de bacterias heterótrofas del suelo B) cepas de bacterias heterótrofas del sobrenadante.

De cada ensayo se procedió a agrupar los productos de PCR de acuerdo al patrón de fragmentos de restricción que eran iguales, los resultados se presentan en la siguiente tabla 10:

Tabla 10

Agrupaciones según el patrón de fragmentos de restricción (RFLPs)

Ensayo	Grupo	Fragmentos de restricción similares
N°1 Bacterias degradadoras del suelo	1	D3
	2	D4=D12=D13
	3	D5=D8
	4	D7
	5	D11
	6	D6
	7	D10
N°1 Bacterias degradadoras del sobrenadante	8	D1.2 = D2.2
	9	D10.2
	10	D3.2
	11	D4.2= D6.2
	12	D7.2=D5.2 =D9.2
	13	D11.2
N°1 Bacterias heterótrofas del suelo	14	HA
	15	HB=HN
	16	HC=HD=HE=HJ=HK=HL=HM=HO=HQ=HR=HS
	17	HP
N°1 Bacterias heterótrofas del sobrenadante	18	HB2
	19	HK2=HO2=HM2
	20	HG2=HJ2
	21	HN2=HQ2
	22	HE2=HH2
	23	HC2=HD2=HP2
N°2 Bacterias degradadoras del suelo	24	D2.3=D4.3
	25	D3.3
	26	D5.3=D6.3
N°2 Bacterias degradadoras del sobrenadante	27	D1.4=D2.4
	28	D3.4=D4.4=D5.4=D6.4
N°2 Bacterias heterótrofas del suelo	29	HC3=HH3=HI3
	30	HA3=HB3
	31	HE3
N°2 Bacterias heterótrofas del sobrenadante	32	HA4=HG4
	33	HC4=HF4

En la tabla 10 se evidencia la clasificación de los grupos según el patrón de fragmentos de restricción semejantes, las agrupaciones se realizaron de acuerdo a cada ensayo y al tipo de bacteria ya sea degradadora o heterótrofa. En el Ensayo N°1, se identificaron 7 grupos de un total de 10 bacterias degradadoras del suelo, 6 grupos de un total de 10

bacterias degradadoras del sobrenadante, 4 grupos de un total de 15 bacterias heterótrofas del suelo y 6 grupos de un total 13 bacterias heterótrofas del sobrenadante. En el Ensayo N°2, se identificaron 3 grupos de un total de 5 bacterias degradadoras del suelo, 2 grupos de un total de 6 bacterias degradadoras del sobrenadante, 3 grupos de un total de 6 bacterias heterótrofas del suelo y 2 grupos de un total 4 bacterias heterótrofas del sobrenadante.

En el ensayo N°1 se procedió a enviar todas las muestras de las bacterias degradadoras del suelo y del sobrenadante para la respectiva secuenciación, de las bacterias heterótrofas se escogieron 7 cepas representativas del suelo y del sobrenadante para la secuenciación. En el ensayo N°2 de las bacterias degradadoras se escogieron 2 cepas representativas del suelo y del sobrenadante para la secuenciación mientras que de las bacterias heterótrofas del suelo se seleccionaron 2 cepas y de las bacterias heterótrofas del sobrenadante se seleccionaron 3 cepas las cuales fueron enviadas a ser secuenciadas. .

3.8 Secuencias de las bacterias aisladas

La empresa Macrogen proporcionó los respectivos electroferogramas de las muestras analizadas (Figura 23) y secuencias en formato FASTA, los cuales se procesaron en el programa Geneious R10, de cada cepa bacteriana se procesaron la secuencia reversa y complementaria con la opción “De Novo Aligment” con la finalidad de obtener la secuencia consenso. La secuencia consenso se la exporto en formato FASTA.

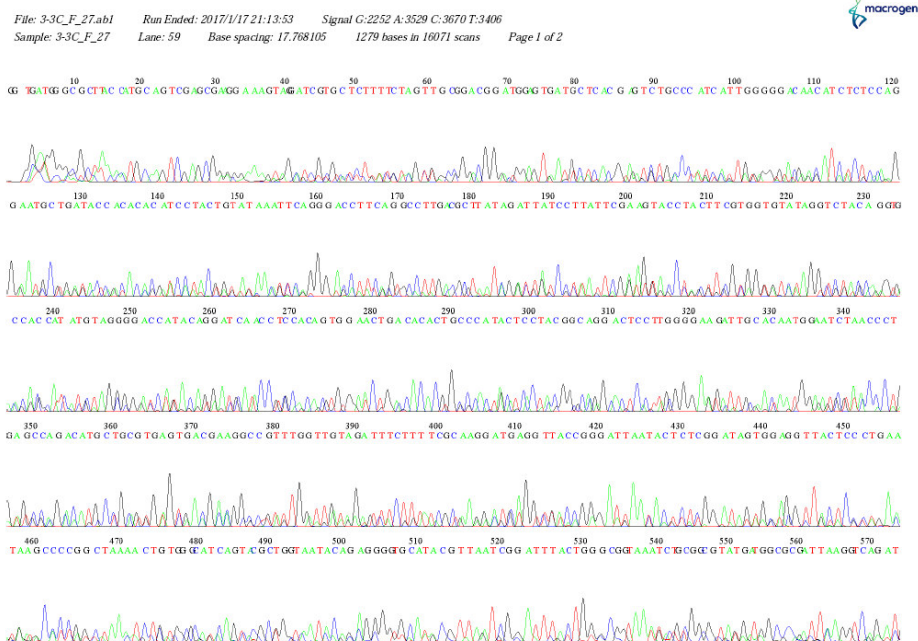


Figura 23 Electroferogramas de la secuencia complementaria de la Ceba D3.3

3.9 BLAST

En el NCBI, con la herramienta Nucleotide BLAST (blastn) se analizó la secuencia consenso en formato FASTA de cada una de las cepas bacterianas, uno de los parámetros que se tomó en cuenta fue que la comparación únicamente se realice con Secuencias Tipo (Sequences from type material). Los resultados de las bacterias obtenidas se presentan en la tabla 11.

Tabla 11

Bacterias degradadoras y heterótrofas identificados en suelos contaminados artificialmente con fenantreno posterior al tratamiento con NPHE.

Cepa	Cepas iguales	Organismo más próximo ^a	Número de acceso (NCBI)	Query Coverage	Max Ident	Filo
Ensayo 1						
D1	3	<i>Bacillus stratosphericus</i>	NR_118441.1	100%	99%	Firmicutes
D2	4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	LC133345.1	100%	100%	Proteobacteria (Y)
	13					
DH4	6	<i>Bacillus subtilis</i>	CP010052.1	100%	99%	Firmicutes
DH6	10	<i>Bacillus aerius</i>	NR_118439.1	100%	100%	Firmicutes
D7	N.2	<i>Bacillus megaterium</i>	CP009920.1	100%	99%	Firmicutes
DWH11	11.2	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	NR_113346.1	100%	99%	Proteobacteria (Y)
A						
Ensayo 2						
D(E)12	2.3	<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	CP017183.1	99%	99%	Proteobacteria (Y)
	4.3					
	C.2					
Ensayo 1 y 2						
D3	5	<i>Acinetobacter genomosp.</i>	KX548338.1	100%	100%	Proteobacteria (Y)
	8					
	3.3					
	10.2					
DH5	7 3.4	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	KY328837.1	100%	99%	Firmicutes
	5.4 1.2					
	2.2 C					
	S E.2					
	C.3 H.3					
	A.4					
DH8	3.2	<i>Bacillus cereus</i>	NR_074540.1	100%	99%	Firmicutes
	B					
	N					
	E.3					
DW9	4.2 6.2	<i>Enterobacter cloacae</i>	CP017186.1	100%	99%	Proteobacteria (Y)
	5.3 1.4					
	2.4					
DHW10	5.2 7.2	<i>Bacillus toyonensis</i>	NR_121761.1	100%	100%	Firmicutes
	9.2 K.2					
	O.2 F.4					
HW13	J.2	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	NR_116698.1	100%	99%	Firmicutes
	A.3					

^a Organismo más próximo según la base de datos GenBank.
 y gammaproteobacteria
 D=Degradadoras H= Heterótrofas W=Sobrenadante

En la tabla 12, se presenta porcentaje de cepas que pertenece a cada bacteria identificada.

Tabla 12

Número de cepas aisladas de cada bacteria degradadora y heterótrofa identificada.

Bacteria	Número de cepas aisladas que se obtuvieron	
<i>Bacillus stratosphericus</i>	1	1%
	3	4%
<i>Klebsiella oxytoca</i>		
<i>Acinetobacter genomosp.</i>	4	6%
	2	3%
<i>Bacillus subtilis</i>		
	26	37%
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>		
	3	4%
<i>Bacillus aerius</i>		
	1	1%
<i>Bacillus megaterium</i>		
	4	6%
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	9%
<i>Bacillus toyonensis</i>	8	11%
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	2	3%
<i>Enterobacter xiangfangensis</i>	6	9%
<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i>	4	6%
Total	70	100%

3.10 Construcción del árbol filogenético

Para la reconstrucción del árbol filogenético se escogió la mejor secuencia consenso de cada bacteria previamente identificada, como también se utilizó secuencias de organismos muy cercanos a los identificados encontradas en el NCBI. El outgroup seleccionado para las bacterias degradadoras fue la secuencia 16S rRNA mitocondrial de *Litopenaeus vannamei* (CK086565.1) y para las bacterias degradadoras-heterótrofas la secuencia del ARN ribosomal 16S de *Penaeus monodon-s* (AW600724.1).

Se realizó un alineamiento con la herramienta MUSCLE en el programa MEGA 7 de las secuencias previamente escogidas, las partes ambiguas de las secuencias fueron eliminadas mediante el programa en línea Gblocks.

Con dichas secuencias se procedió a realizar el análisis filogenético en el programa MEGA 7 empleando el método de máxima verosimilitud Neighbor-Joining con el modelo de evolución Kimura 2. A continuación se presenta el árbol filogenético de las bacterias degradadoras y bacterias degradadoras – heterótrofas del suelo posterior al tratamiento con nanopartículas de hierro elemental (Figura 24) con el cual se ratifica la identificación taxonómica de la mayoría de los aislados.

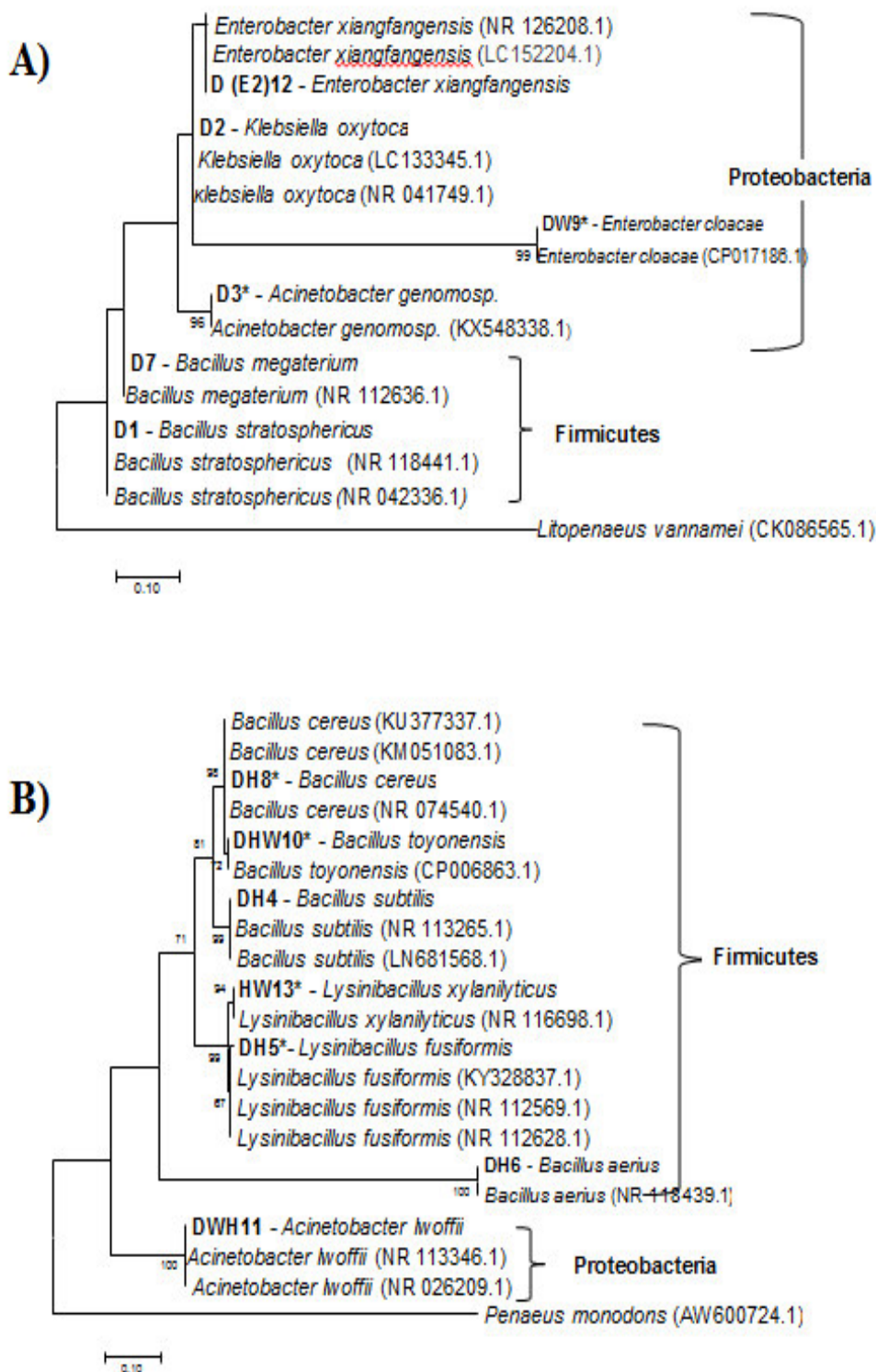


Figura 24 Árbol filogenético basado en las secuencias 16S rRNA

Nota: Elaborado mediante el algoritmo Neighbor – Joining (1000 réplicas de optimización mediante bootstrap). Los valores de probabilidad bootstrap < 50% no se muestran. A) Bacterias degradadoras del suelo y sobrenadante posterior al tratamiento con NPHE B) Bacterias degradadoras - heterótrofas del suelo y sobrenadante posterior al tratamiento con NPHE.

3.11 Efecto de inhibición de las nanopartículas de hierro elemental (NPHE) sobre la población bacteriana

Se realizó la evaluación de la inhibición de las NPHE frente a dos cepas de bacterias degradadoras aisladas del suelo: *Lysinibacillus fusiformis* y *Bacillus megaterium*. El efecto de inhibición se determinó empleando dos métodos: en medio líquido por microdilución (Figura 25) y por difusión de disco (Figura 26). A continuación se muestran los datos obtenidos de inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de NPHE.

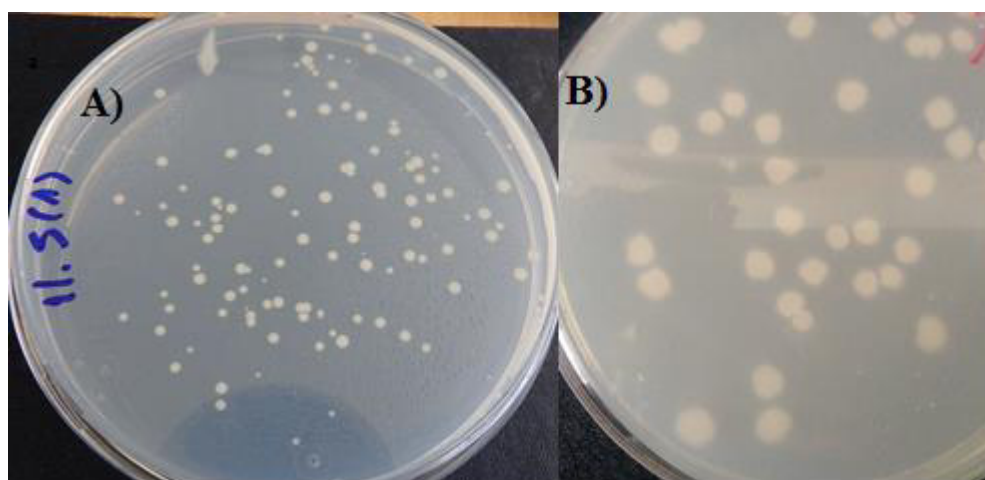


Figura 25 Inhibición de NPHE en el crecimiento bacteriano por método de microdilución

Nota: A) *Bacillus megaterium* Dilución 10^{-5} , tiempo 2h B) *Lysinibacillus fusiformis* Dilución 10^{-3} , tiempo 8h.

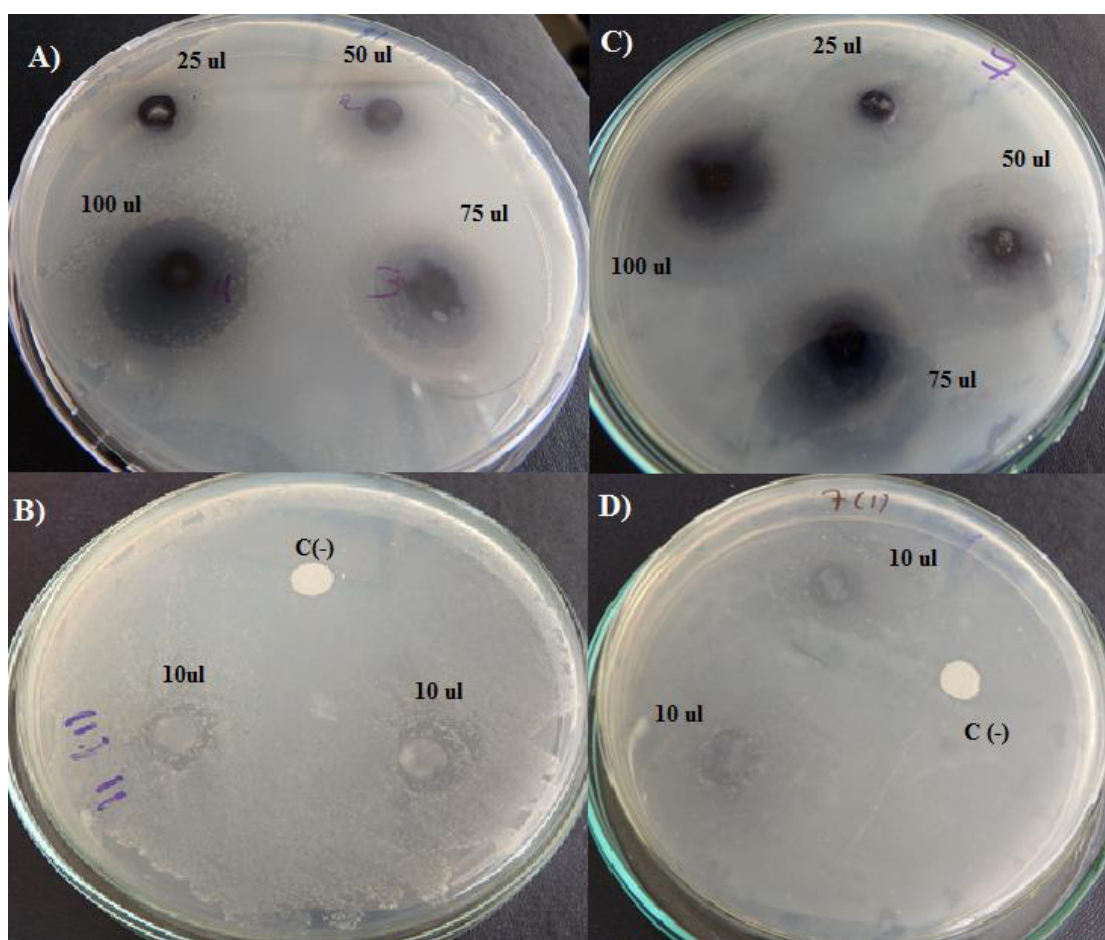


Figura 26 Aparición de zonas inhibitorias en placas de agar a diferentes concentraciones de nanopartículas de hierro elemental.

Nota: A) *Bacillus megaterium* (25, 50, 75 y 100 μ l cantidad de NPHE aplicada) B) *Bacillus megaterium* (10 μ l NPHE impregnada al disco, C (-) control negativo) C) *Lysinibacillus fusiformis* (25, 50, 75 y 100 μ l cantidad de NPHE aplicada) D) *Lysinibacillus fusiformis* (10 μ l NPHE impregnada al disco, C (-) control negativo)

Se evaluó la cinética de crecimiento de las bacterias mencionadas en presencia de NPHE (0,5M) en un intervalo de 10 horas, las siembras por el método de microdilución fueron realizadas cada 2 horas en el transcurso de este tiempo. Los resultados de inhibición del crecimiento de las bacterias *Lysinibacillus fusiformis* y *Bacillus megaterium* en presencia de NPHE, se muestran en la Tabla 13. La concentración inicial de la bacteria *Lysinibacillus fusiformis* al empezar el ensayo fue $3,47 \times 10^5$ UFC/mL, al aplicar 1 mL de la solución de NPHE a las 10 horas de tratamiento se evidencia una disminución del crecimiento bacteriano obteniéndose $8,13 \times 10^4$ UFC/mL, la

bacteria *Bacillus megaterium* presenta un comportamiento similar, su concentración inicial fue de $5,18 \times 10^5$ UFC/mL, al aplicar la solución de NPHE al término de las 10 horas de tratamiento su concentración fue de $5,96 \times 10^4$ UFC/mL (Figura 27).

Tabla 13

Resumen de los resultados de inhibición del crecimiento bacteriano con la aplicación de NPHE por el método de microdilución

	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
Tiempo (h)	UFC/ml	UFC/ml
0	$3,47E+05^*$ ($\pm 2,6$)	$5,18E+05$ ($\pm 1,54$)
2	$1,90E+05$ ($\pm 2,6$)	$2,48E+05$ ($\pm 2,15$)
4	$1,78E+05$ ($\pm 10,39$)	$2,07E+05$ ($\pm 8,56$)
6	$2,35E+05$ ($\pm 8,66$)	$1,95E+05$ ($\pm 3,15$)
8	$1,23E+05$ (± 6)	$8,10E+04$ ($\pm 4,56$)
10	$8,13E+04$ ($\pm 5,54$)	$5,96E+04$ ($\pm 2,15$)

* Se muestran los valores de la media junto con el error estándar de la media.

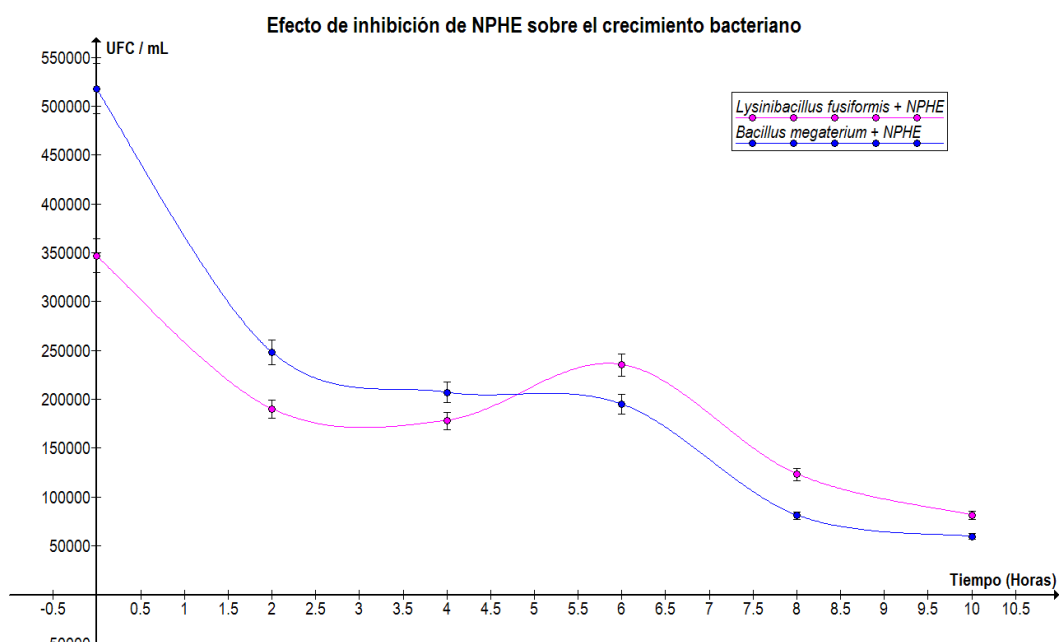


Figura 27 Cinética de crecimiento *Lysinibacillus fusiformis* y *Bacillus megaterium* en presencia de NPHE

Los resultados de actividad inhibitoria de las NPHE sobre las bacterias *Lysinibacillus fusiformis* y *Bacillus megaterium* con el método de difusión del

disco se muestran en la tabla 14. Se evidenció que a mayor cantidad de aplicación de NPHE sobre la bacteria la zona de inhibición es mayor, obteniéndose así que al colocar 100 μ l de la NPHE para la bacteria *Lysinibacillus fusiformis* genero un halo de inhibición de 17,33 (\pm 0,33) mm y para la bacteria *Bacillus megaterium* 18 (\pm 0,1) mm. El error relativo con respecto a la media fue de aproximadamente \pm 1,00 mm.

Tabla 14

Actividad inhibitoria de las NPHE sobre las bacterias.

Bacteria	Zona de inhibición (mm) a diferentes concentraciones (μ l)				
	10 μ l	25 μ l	50 μ l	75 μ l	100 μ l
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	10 [*] (\pm 0,1)	10,33 (\pm 0,33)	12 (\pm 1,00)	14 (\pm 1,00)	17,33 (\pm 0,33)
<i>Bacillus megaterium</i>	10 (\pm 0,1)	10 (\pm 0,1)	12,33 (\pm 0,66)	16,33 (\pm 0,33)	18 (\pm 0,1)

* Se muestran los valores de la media junto con el error estándar de la media.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Nanopartículas de hierro elemental en la remoción de TPHs (fenantreno) y su incidencia sobre la población bacteriana

La ingeniería de nanomateriales actualmente ha encontrado diversas aplicaciones en lo que respecta a la remediación ambiental, incluyendo el tratamiento de agua y aguas residuales, la remediación de aire, agua y suelo, como también el tratamiento de residuos peligrosos, debido a su elevada reactividad frente a contaminantes recalcitrantes y su capacidad mejorada para la reducción de contaminantes (Li, *et al.*, 2006; Tratnyek & Johnson, 2006; Karn, *et al.*, 2009).

Hidrocarburos Aromáticos policíclicos se pueden extraer de suelos contaminados con tensioactivos no iónicos (Chang, Huang, & Shu, 2000), sin embargo la combinación de la aplicación de surfactante con métodos electroquímicos es más eficaz (Alcantara, Gomez, Pazos, & Sanroman, 2008) aunque dichos métodos siguen siendo relativamente costosos. Actualmente las tecnologías de recuperación que incorporan la nanotecnología han surgido como opción prometedora y rentable. Las nanopartículas tienen un volumen de superficie que promueven la interacción, adsorción y la reacción de las nanopartículas con otros átomos o moléculas. (Zhang W. , 2003; Masciangioli & Zhang, 2003; Li, Elliott, & Zhang, 2006). Razón por la cual uso de nanopartículas de hierro elemental cumple con la funcionalidad de remover los contaminantes como en este caso el fenantreno.

Para la síntesis de nanopartículas, el método más utilizado es el químico debido a su potencial para controlar adecuadamente el tamaño, la distribución de tamaño y la forma de las nanopartículas. Los métodos químicos tradicionales utilizan agentes reductores y estabilizadores durante la síntesis que en alguna medida son tóxicos y contaminantes. La tendencia desde hace años se ha focalizado en desarrollar métodos de síntesis bajo el concepto de “Química Verde”, que es aquella que utiliza químicos no tóxicos y amigables con el medio ambiente (Usman, Ibrahim, Shameli, Zainuddin, &

Wan-Yunus, 2012). El agente reductor utilizado en este estudio para la formación de las NPHE fueron los polifenoles obtenidos del mortiño, según Murgueitio y otros (2016) el extracto de mortiño tienen una concentración de polifenoles de 2167 ± 835 mg/ 100 g de muestra, siendo este un buen agente para la reducción del Fe^{3+} .

En un estudio realizado por Chang & Kang (2009), en botellas con 10 g de suelo contaminado con pireno y 0,1 g de NPHE sintetizadas en nanoescala o NPHE comerciales en microescala, se produjo una eliminación significativa de pireno con las partículas de NPHE sintetizadas y NPHE comerciales durante los primeros 30 min de incubación, aunque la reacción procedió más rápido y en mayor medida con partículas de NPHE sintetizadas. Después de 30 min de incubación, sin embargo, las concentraciones de pireno no disminuyeron significativamente, resultando en aproximadamente el 25% y 35% de eliminación del pireno inicial con NPHE comerciales y NPHE sintetizadas, respectivamente. Resultados similares se obtuvieron en tanto la remoción de fenantreno (Tabla 8 y 9) con la aplicación de NPHE obteniendo así un porcentaje de remoción del 22% cuando las NPHE son aplicadas en solución sin filtrar y el 50% de remoción cuando se aplicó la solución de NPHE filtradas existe una mayor eficiencia de remoción de contaminantes al filtrarlas, ya que con este proceso se asegura tener propiamente moléculas a nivel nano, mientras que al no filtrar esta solución existe un conjunto de macro, micro y nanopartículas. La transición de micropartículas a nanopartículas involucra un incremento en la relación área de contacto/volumen (razón de aspecto), en donde el área de contacto aumenta dramáticamente permitiendo un mayor número de interacciones con moléculas orgánicas, inorgánicas y bacterias (*Zhang, et al., 2010*). Con lo que se corroboró que al filtrar la solución de NPHE existió un mayor porcentaje de remoción.

La cinética de la población bacteriana se ve afectada con la aplicación de NPHE, como se evidencia en tabla 6 y 7 demostrando que existe una disminución de la población bacteriana del inicio del tratamiento al término

del mismo. Aunque existen inmensas potencialidades de la nanotecnología, la citotoxicidad de las nanopartículas sigue siendo una preocupación importante. Las diferentes clases de bacterias presentan diferentes susceptibilidades a las nanopartículas (Fu, Vary, & Lin, 2005), pero el mecanismo de control de la toxicidad todavía no se entiende. Aunque se sabe que algunas nanopartículas pueden afectar a sistemas biológicos a nivel celular, subcelular y de proteínas (Farre, *et al.*, 2009; Klaine, *et al.*, 2008), el mecanismo de toxicidad de las NPHE hacia las bacterias sigue siendo poco clara. Las causas de la toxicidad propuestos por (Nel, *et al.*, 2009), son la disrupción de la integridad de la membrana celular (Fang, Lyon, Wiesner, Dong, & Alvarez, 2007), interferencia con la respiración (Lyon, Brunet, Hinkall, Wiesner, & Alvarez, 2008), y el daño del ADN o proteínas enzimáticas causadas por iones metálicos liberados. Sin embargo al término del tratamiento de NPHE para remover el fenantreno aún queda un número significativo de bacterias el cual podría ser bioestimulado para continuar en proceso de degradación de los residuos de los contaminantes.

4.2 Identificación morfológica y molecular de las bacterias degradadoras y heterótrofas.

Se aisló un total de 70 bacterias entre degradadoras y heterótrofas, en medio mineral suplementado con fenantreno y medio LB 1/10, respectivamente. Como lo indica Abu-Elgheit & Yusef (1981) para determinar la capacidad de las cepas bacterianas seleccionadas que degraden algunos constituyentes de petróleo crudo, las cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas en forma individual en un medio mineral salino adicionado con petróleo crudo. En esta investigación dichas cepas seleccionados fueron sembradas en el medio mineral suplementado con fenantreno para identificar las cepas bacterianas que puedan degradar dicho contaminante. El medio Luria Bertani (LB) es un subtipo de agar nutritivo, este es un medio general para estudios de microbiología y puede ser utilizado para el cultivo de microorganismos de rutina no muy exigente. (Manual, 2008), razón por la que en el estudio se usó dicho medio para la identificación de bacterias heterótrofas, sin embargo como no es un medio selectivo pueden crecer de

igual forma las bacterias degradadoras ya que contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de las mismas.

La morfología correspondiente de los aislados en general indica que las colonias presentan una pigmentación blanquecina y cremosa, según su forma la mayoría son rizoides y puntiformes. De acuerdo a la tinción Gram se evidenció que 50 cepas bacterianas son Gram positivas y 20 cepas bacterianas son Gram negativas.

Para identificar las bacterias es necesario aplicar técnicas moleculares, por lo tanto se procedió a amplificar el gen 16S rRNA. La amplificación se realizó por medio de cebadores universales ya que generalmente son elegidos como complemento de las regiones conservadas en el comienzo del gen, y ya sea en la región de las 540 pb o al final de la secuencia completa (sobre la región de 1500 pb), la secuencia de la región variable de en medio es usada para la taxonomía comparativa (*Chen, Neimark, Rumore, & Steiman, 1989*). La comparación de las secuencias del gen ARNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre los organismos, ya que contienen varias regiones altamente conservadas que resultan útiles para obtener alineamientos de secuencia y al mismo tiempo una variabilidad suficiente en otras regiones de la molécula para servir como cronometro evolutivos (*Woese, 1987*).

Con los datos obtenidos de la secuenciación, se procede al análisis mediante la herramienta Blastn, siendo este el método más sencillo que se basa en búsqueda por homología contra una base de datos (*York & Rosen, 2011*). Sin embargo existieron electroferogramas que presentaban ambigüedades o no eran de buena calidad, por tanto el análisis se realizó de acuerdo a lo mencionado por Bosshard y otros (2003) quien afirma que si una de las secuencias de ADN obtenidas, presentan regiones donde se superponen diferentes lecturas y no presenta alguna región clara; el análisis de la identificación bacteriana puede realizarse con una sola secuencia ya sea la secuencia reversa o complementaria. Dichas ambigüedades de las secuencias pueden tener su origen en problemas técnicos, tales como: que

la muestra analizada no sea un cultivo puro o una falla en la reacción de secuenciación (Clarridge, 2004), sin embargo se trabajó con las mejores secuencias consenso para obtener los resultados (Tabla 11).

Algunos de los géneros de microorganismos que se han logrado identificar con la capacidad de degradar hidrocarburos son: *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Vibrio*, *Candida*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Acetivobacter*, *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Mycobacterium* y *Bacillus* (Ollivier & Magot, 2005), en el presente estudio se determinó que los géneros bacterianos que se encuentran en el suelo contaminado con fenantreno posterior al tratamiento con NPHE son: *Bacillus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Lysinibacillus* y *Enterobacter*, sin embargo los géneros bacterianos predominantes son *Bacillus* y *Lysinibacillus*.

Una herramienta útil para corroborar los resultados obtenidos de la identificación molecular es la construcción árboles filogenéticos que permiten obtener una mayor certeza en los resultados de identificación (Abecia, et al., 2005).

Para la construcción de árboles filogenéticos Neighbor-joining es el método más utilizado frecuentemente debido a su velocidad y precisión. Todos los métodos para la construcción de árboles filogenéticos tienen un mismo punto de origen el alineamiento múltiple. Cuando un alineamiento múltiple es creado una hipótesis evolutiva es generada automáticamente (Yuan, Yang, Wang, & al, 2003), la construcción de los arboles filogenéticos fueron realizados en el programa MEGA 7 con el método de Neighbor-joining de máxima verosimilitud, bootstraps de 1000 y modelo evolutivo basado en los parámetros de Kimura 2. Para la construcción de los arboles filogenéticos las bacterias identificadas fueron clasificadas en dos grupos como bacterias degradadoras (Figura 24, A) y bacterias degradadoras – heterótrofas (Figura 24, B), ya que estas últimas crecieron tanto en el medio LB 1/10 como en el medio mineral suplementado con fenantreno, con las secuencias de las

cepas bacterianas pertenecientes a cada grupo se realizó los árboles filogénicos con las características anteriormente mencionadas.

Las especies de bacterias degradadoras identificadas, que crecieron solamente en el medio mineral suplementado con fenantreno fueron: *Enterobacter xiangfangensis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter genomosp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus stratosphericus* (Figura 24, A).

En un estudio realizado por De Bellis, *et al.*, (2015) se aislaron cepas bacterianas de suelos los cuales podían degradar micotixinas producidas por hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* como la Ocratoxina A, se identificaron las especies *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter xiangfangensis*, la estructura de la Ocratoxina A presenta anillos benzoicos similares a la estructura del fenantreno por lo tanto se puede considerar que la especie *Enterobacter xiangfangensis* identificada en este estudio puede participar en procesos de degradación del contaminante. *Enterobacter xiangfangensis* es una bacteria Gram-negativa, móvil, no formadoras de esporas, que por lo general se presentan aisladas del suelo, las colonias sobre agar nutriente son circulares, liso, convexo, blanco y aproximadamente de 1 a 1,5 mm de diámetro después de 24 h de incubación a 30°C (Gu, Li, Yang, & Huo, 2014).

En el estudio realizado por Saadoun (2002) se identificaron cinco cepas bacterianas recuperadas de diferentes suelos de lugares contaminados con derrames de combustible, dichas bacterias tienen la capacidad de degradar el combustible “diésel”. La identificación fenotípica de las colonias bacterianas mostró que las cepas pertenecían principalmente a miembros del género *Pseudomonas* y estaba representado por las siguientes especies: *P. maltophilia*, *P. putida* y *P. mallei*. Otros géneros bacterianos también fueron identificados: *Enterobacter cloacae* y *Acinetobacter lowffi*. En el artículo de Binks *et al.*, (1996) se describe el aislamiento cepa de *Enterobacter cloacae* PB2 de suelos contaminados con materiales explosivos, dicha cepa es capaz de crecer aeróbicamente con Tetranitrato

de pentaeritritol (PETN) como fuente de nitrógeno. En tanto se puede corroborar que la especie *Enterobacter cloacae* fue aislada del suelo y puede participar en proceso de degradación de contaminantes.

Otras especies degradadoras de hidrocarburos incluyen a *Bacillus subtilis* (DM-04), *Pseudomonas aeruginosa* (Kishore & Ashis, 2007), *Enterobacter sakazakii*, *Bacillus mycoides*, *Klebsiella Oxytaca*, *Acinetobacter genomosp*, (Pokethitiyook, Sungpetch, Upathame, & Kruatrachue, 2002), *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas diminuta*, *Gluconobacter cerenius*, *Pasteurella caballi*, *Sphingomonas Paucimobilis* y *Sphingobacterium multivoru* (Jurgensen, Puustinen, & Suortti, 2000).

En el estudio se identificó a *Klebsiella oxytoca*, especie que degrada HAPs, tanto en forma individual como en consorcio, dicha especie degrada fenantreno en un medio mineral enriquecido en una forma más eficiente cuando se encuentra en consorcio (Kim, Ahn, Woo, Jung, & Park, 2009). Mohamed *et al* (2012), estudiaron la degradación de los siguientes contaminantes: benceno, fenantreno, fluoranteno y pireno en microcosmos mediante la aplicación de *Klebsiella oxytoca*, en concentraciones de 70 mg/l, como resultado se determinó que los porcentajes de degradación de estos compuestos fueron del 87%, 71.4%, 70% y 58.6% respectivamente, en un tiempo de 2 días. Estos resultados demuestran que *Klebsiella oxytoca* es una especie que degrada el fenantreno.

El género bacteriano *Bacillus* se encuentra involucrado frecuentemente en procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelos (Doddamani & Ninnekar, 2000; Stapleton, Bright, & Sayler, 2000) encontrándose en diferentes estudios que degrada hidrocarburos alifáticos, aromáticos como benceno, tolueno y xileno (Ghazali, Rahman, Salleh, & Basri, 2004), cepas de *B. cereus* y *B. megaterium* son capaces de biodegradar pireno (Lin & Cai, 2008), como así también, cepas de *B. pumilus* utilizan como fuente de carbono el naftaleno, pireno y fenantreno (Brill, 1980) y pueden soportar altas concentraciones de petróleo en el medio de crecimiento. Ghazali *et al* (2004) encontraron que el género *Bacillus* posee una gran importancia en los

procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelo, estando esto relacionado con la capacidad del género de formar esporas y resistir en situaciones extremas (*Annweiler, et al., 2000*). En la tabla 12 se detalla que uno de los géneros más predominantes en el suelo después de la aplicación de nanopartículas son *Bacillus* en 26% y *Lysinibacillus* en 43%, conociéndose que las bacterias del género *Bacillus* participan ampliamente en procesos de degradación de hidrocarburos aromáticos y alifáticos.

Otros estudios se han centrado en la capacidad de un consorcio bacteriano formado por *Stenotrophomonas bacidaminiphila*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cibi*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas aeruginosa* para biodegradar hidrocarburos aromáticos y alifáticos generados por la industria petroquímica, este consorcio bacteriano demostró una excelente capacidad de degradación durante 40 días, lo que reduce en 90,7% y 51,8% las fracciones de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, respectivamente (*Cerqueira, et al., 2011*).

La cepa *Bacillus stratosphericus* FLU5 fue aislada después del enriquecimiento en fluoranteno, un hidrocarburo policíclico aromático persistente y tóxico (HAP). Los análisis de GC-MS mostró que la cepa FLU5 era capaz de degradar aproximadamente el 45% de fluoranteno (100 mg l⁻¹). Además, el aislado FLU5 mostró una notable capacidad de crecer en una amplia gama de hidrocarburos alifáticos y aromáticos. Las habilidades de biodegradación de los HAP son prometedoras y se pueden utilizar para llevar a cabo las estrategias de biorremediación de aguas marinas y los sedimentos marinos contaminados por hidrocarburos (*Hentati, et al., 2016*). Por tanto las especies *Bacillus megaterium* y *Bacillus stratosphericus* participan en la degradación del fenantreno como también de otros hidrocarburos aromáticos ya antes mencionados, favoreciendo así a los procesos de biorremediación de suelos contaminados.

Las especies de bacterias degradadoras – heterótrofas identificadas, que crecieron tanto en el medio mineral suplementado con fenantreno y en el medio LB 1/10 fueron: *Bacillus subtilis*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*,

Bacillus toyonensis, *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus xylanilyticus* y *Acinetobacter lwoffii*. (Figura 24, B)

Como se mencionó anteriormente el género *Bacillus* es muy prevalente en la participación de degradación de contaminantes de hidrocarburos de petróleo como los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Nwaogu *et al* (2008), en su estudio utilizan *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Trichoderma harzanium* y *Trichothercium roseum*, los cuales son organismos degradadores de hidrocarburos. En las pruebas adicionales, se encontró que *B. subtilis* poseía mayor potencial para utilizar diésel como fuente de carbono. Las muestras de suelo se contaminaron con gasóleo a una tasa de carga del 5% (v/p) (aceite / suelo). Estas muestras de suelo, junto con las muestras testigo no contaminadas, se sembraron con *B. subtilis*. La degradación del diésel se controló durante un período de 27 días, utilizando el método gravimétrico. Las tasas de degradación del gasóleo al final del día 1, día 12 y día 27 fueron $5,8 \times 10^{-4}$, $1,83 \times 10^{-3}$ y $1,05 \times 10^{-3}$ g / h, respectivamente.

En la remediación *in situ* se han identificado consorcios bacterianos degradadores de hidrocarburos conformados por *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonassp* poseen la habilidad para utilizar diversos substratos, incluyendo los derivados del petróleo; estas son bacterias productoras de biosurfactantes extracelulares que solubilizan y facilitan la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular hidrofílica; contienen además enzimas degradadoras de hidrocarburos en la membrana citoplasmática (Pérez-Vargas, Viguera-Carmona, Gómez-Guzmán, & Calva-Calva, 2015).

Akinbankole *et al* (2015), en su estudio para aislar bacterias degradadoras de HAPs, se tomaron muestras de suelos y aguas contaminadas con aceite de motor del estrecho de Mallaca, se sembraron en medio mineral suplementado con pireno y antraceno, del cual se aislaron 13 especies, entre las especies conocidas como degradadoras de HAPs se

encontraron *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus megaterium*, bacterias sin asociación previa con la degradación de los HAP como *Salmonella entérica* y *Bacillus toyonensis*. El análisis mostró que todos los aislados que degradaban HAP lograron un 99% de degradación dentro de los siete días. Mientras que las dos cepas que no tenían asociación previa a la degradación de HAP alcanzaron 95% de uso de HAP dentro de dos días y también mostraron un mayor aumento en el crecimiento. Con lo que se corrobora que *Bacillus toyonensis* no es una cepa especializada en degradación de HAP, sin embargo participa en el proceso de degradación de los contaminantes.

A pesar de una gran cantidad de estudios existentes sobre la degradación de hidrocarburos de petróleo por *Bacillus*, todavía hay poca información sobre la degradación de hidrocarburos de petróleo por la bacteria *Bacillus fusiformis* (O de otro modo llamado *Lysinibacillus fusiformis* sp.), que es un microorganismo extremo que puede existir en un alta temperatura y ambiente muy árido (Grishchenkov, Townsend, McDonald, & al., 2000) (Shuchi, Renu, & Vikas, 2006) (Sun, Wei, & Zhao, 2009). *Lysinibacillus fusiformis* fue identificado por primera vez por (Ahmed, Yokota, Yamazoe, & Fujiwara, 2007), sus características son cepas formadoras de esporas, gram positivas, móviles, en forma de varilla y bacterias tolerantes al boro del suelo. Las cepas podrían tolerar el 5% (p / V) de NaCl y hasta 150 mM de boro. Se encontró un crecimiento óptimo en agar Luria-Bertani, que es un medio sin NaCl o boro a una temperatura de 37°C.

En el estudio realizado por (Gallego, Loredó, Llamas, Vázquez, & Sánchez, 2001) *Acinetobacter lwoffii* fue encontrada como bacteria dominante en el estudio para degradar el diésel en un birreactor logrando una remoción del 90% después de 45 días del tratamiento. En el mismo estudio que *A. lwoffii* degrada rápidamente crudo y diésel gracias a la producción de biosurfactantes y además puede competir eficientemente con otros degradadores de hidrocarburos como *Pseudomonas* sp. En este estudio se logró identificar a la bacteria *Acinetobacter lwoffii*, especie que se

considera que tiene un gran potencial en la degradación de contaminantes de hidrocarburos y HAPs.

En el presente estudio se identificaron 13 especies tales como: *Enterobacter xiangfangensis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter genomosp*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus aerius*, *Bacillus cereus*, *Bacillus toyonensis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus xylanilyticus* y *Acinetobacter lwoffii*, las cuales se presume que son resistentes a las NPHE y pueden contribuir al proceso de degradación del fenantreno, las NPHE en conjunto con las bacterias identificadas logran una buena remoción del contaminante, obteniendo así en el Ensayo 1 un 22% y en el Ensayo 2 un 50% de remoción del fenantreno, el género *Bacillus* es conocido por su gran desempeño en la degradación de hidrocarburos mientras que las bacterias *Lysinibacillus fusiformis* y *Lysinibacillus xylanilyticus*, se presume participan en procesos de degradación de contaminantes sin embargo la información sobre las mismas es escasa, no existen estudios sobre las rutas de degradación que utilizan dichas bacterias (*Grishchenkov, Townsend, McDonald, & al., 2000*) (*Shuchi, Renu, & Vikas, 2006*) (*Yuan, Yang, Wang, & al, 2003*) (*Sun, Wei, & Zhao, 2009*)

Al final del tratamiento se considera que aún existe un número de bacterias significativas que podrían continuar en el proceso de degradación de dicho contaminante a través de técnicas de bioestimulación de la población bacteriana nativa. La bioestimulación combinada con la bioaumentación es una estrategia para acelerar el proceso de biorremediación. La aplicación de microorganismos nativos o exógenos pueden beneficiarse de la bioestimulación por la adición de fuentes de energía y/o aceptores de electrones (*Fantroussi & Agathos, 2005*).

4.3 Efecto de inhibición de las nanopartículas de hierro elemental (NPHE) sobre la población bacteriana

Se realizó la evaluación de la inhibición de las nanopartículas de hierro elemental frente a dos cepas: *Lysinibacillus fusiformis* y *Bacillus megaterium*,

la evaluación mediante el método de microdilución (Figura 27) indica que mientras más tiempo de contacto se encuentra la bacteria con las NPHE existe una disminución de la población bacteriana. Panaceck *et al.*, (2006) afirma que este efecto es producto del tamaño de las nanopartículas, ya que las nanopartículas de tamaños más pequeños tienen mayor superficie disponible para la interacción con la superficie de la membrana, lo que podría generar una alteración de algunas funciones primarias como la permeabilidad y la respiración.

Otros estudios evidencian que la unión de las nanopartículas de plata (AgNPs) a la membrana exterior causa acumulación de precursores de proteínas lo que da lugar a la disipación de la fuerza motriz de los protones de intercambio presentes en la membrana celular. No obstante aún existe controversia si al romper la membrana, las AgNPs pueden ingresar al citoplasma bacteriano e interactuar con el ADN citoplasmático directamente evitando así su replicación (*Sondi & Salopek-Sondi, 2004*) (*Kumar, et al., 2004*) (*Cho, Park, Osaka, & Park, 2005*) (*Lok, et al., 2006*) (*Ruparelia, Chatterjee, Duttagupta, & Mukherji, 2008*). Por tal razón, al encontrarse las NPHE con la bacteria en mayor tiempo de contacto, la replicación de la bacteria se ve afectada presenciándose así una disminución de la población bacteriana inicial.

Para determinar el efecto de la actividad inhibitoria en placas de agar por el método Kirby-Bauer, se observaron los halos de inhibición en un rango de valores de 10 – 18 mm de acuerdo a la cantidad de nanopartícula aplicada (Tabla 14). Se conoce que la concentración específica de metales son tóxicas para microorganismos que reaccionan con proteínas (*Lee, Yeo, & Jeong, 2003*) después de la penetración en la bacteria causa la desnaturalización de la proteína resultado la inhibición del metabolismo celular y también la capacidad de inactivación de enzimas bacterianas, y a su vez liberar peróxido de hidrógeno conduciendo a la muerte celular bacteriana (*Kokkoris, et al., 2002*).

Otros estudios indican que la acción inhibitoria de los iones de plata sobre los microorganismos, se debe a que el ADN pierde su capacidad de replicarse (*Allaker, 2010*). Se ha demostrado que las nanopartículas de plata causan la inactivación de bacterias y evitan la replicación bacteriana in-vitro (*Liao, Zhu, Mo, & Zhang, 2010*). No existen muchos estudios del mecanismo de inhibición de las NPHE sobre las bacterias, sin embargo se conoce que los mecanismos que afectan a las bacterias son similares a las de las AgNPs, conociéndose así que los principales mecanismos que causan la muerte celular son los daños y alteraciones a nivel de ADN y respiración celular.

Existen varios estudios de la inhibición de las nanopartículas de plata sobre la población bacteriana, sin embargo la información sobre las nanopartículas de hierro elemental (NPHE) y su potencial inhibitorio sobre la población bacteriana nativa del suelo es muy escaso. Por lo tanto se considera que este es el primer estudio que se encarga de evaluar del efecto de las NPHE en la población bacteriana de suelos contaminados, considerando en esto la evaluación de la cinética bacteriana y la inhibición de bacterias nativas del suelo al aplicar las NPHE.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- El efecto de las nanopartículas de hierro elemental en el suelo es remover los contaminantes del mismo, sin embargo estas también causan un efecto sobre la población bacteriana y microorganismos nativos del suelo disminuyendo dicha población.
- Las nanopartículas filtradas alcanzan a remover el fenantreno aproximadamente en un 50% a los 10 días, mientras que las nanopartículas sin filtrar remueven un 22%, por tanto al no filtrar las nanopartículas estos aglomerados de macro y micro moléculas pueden inhibir la acción propia de las nanopartículas.
- En el ensayo N° 2, la cinética poblacional bacteriana tanto para bacterias heterótrofas como degradadoras existe una reducción significativa al final de los 10 días, esto se debe a que al filtrar las nanopartículas solo seleccionamos moléculas nano es decir se obtiene propiamente “nanopartículas” y estas pueden afectar a los procesos metabólicos de las bacterias.
- En los dos primeros días se evidencia una mayor cinética poblacional bacteriana tanto para bacterias heterótrofas como degradadoras, posterior a este tiempo existe un decrecimiento de la población bacteriana.
- Los géneros bacterianos que persisten durante el tratamiento con nanopartículas fueron *Bacillus*, *Acinobacter*, *Enterobacter* y *Klebsiella*, géneros que actúan en la degradación de contaminantes como es el caso del fenantreno.
- Se identificaron 13 especies de bacterias que persisten durante el tratamiento con NPHE para remover el fenantreno del suelo mediante análisis bioinformático en base a la amplificación del gen 16S rRNA ,las cuales son *Enterobacter xiangfangensis*, *Enterobacter cloacae*, *Acinetobacter genomosp*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus aerius*, *Bacillus*

cereus, *Bacillus toyonensis*, *Lysinibacillus fusiformis*, *Lysinibacillus xylanilyticus* y *Acinetobacter lwoffii*.

- La aplicación de la solución de NPHE en mayor cantidad provocan mayor halo de inhibición en las bacterias aisladas del suelo, por lo tanto al aplicar 100 μ L de la solución de las NPHE a la bacteria *Lysinibacillus fusiformis* generó un halo de inhibición de 17,33 (\pm 0,33) mm y para la bacteria *Bacillus megaterium* 18 (\pm 0,1) mm.
- La prueba de inhibición de las NPHE por el método de microdilución muestra una disminución de las unidades formadoras de colonias al existir mayor tiempo de contacto entre la bacteria y la solución de NPHE.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos de cinética de crecimiento bacteriano con diferentes concentraciones de NPHE.
- Optimizar la formulación de NPHE consiguiendo así reducir el nivel de toxicidad para las células de la población bacteriana.
- Realizar ensayos de remoción de diferentes contaminantes (HAPs y TPHs) e identificar especies bacterianas que ayuden a la degradación de dichos contaminantes posterior a la aplicación de NPHE.
- Bioestimular a las especies identificadas por medio de la adición de nutrientes, aceptores de electrones y otros agentes que ayudan a la biodegradación como biosurfactantes, con la finalidad de que dichas especies continúen degradando los restos de contaminantes.
- Aplicar en conjunto técnicas de bioestimulación, bioaugmentación y NPHE para remover y degradar contaminantes de una manera más rápida y eficiente.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

3550B, E. (1996). Ultrasonic extraction.

8015C, E. (2000). Nonhalogenated organics using GC/FID.

Abecia, L., Fondevila, M., Balcells, J., Edwards, J., Newbold, J., & McEwan, N. (2005). *Molecular profiling of bacterial species in the rabbit caecum*. FEMS Microbiology(244), 111 - 115.

Abu-Elgheit, M., & Yusef, H. (1981). *Isolation of hydrocarbon degrading microorganisms on mediterranean waters*. Environment international, 4, 417 - 420.

Adley, C. (2006). *Food-Borne Pathogens: Methods and Protocols*. New Jersey. EEUU.: Humana Press.

Ahmed, I., Yokota, A., Yamazoe, A., & Fujiwara, T. (2007). *Proposal of Lysinibacillus boronitolerans gen. nov. sp. nov., and transfer of Bacillus fusiformis to Lysinibacillus fusiformis comb. nov. and Bacillus sphaericus to Lysinibacillus sphaericus comb. no*. Sys Ev Microbiol, 1117-1125.

Akinbankole, A., Tunung, R., & Tennant, A. (2015). *Biochemical and Molecular Characterization of Pyrene and Anthracene Metabolizing Bacteria Isolated from Oil Contaminated Water and Soil in Malaysia*. Journal of Applied y Environmental Microbiology, 1 (3), 25-30.

Alcalde - Alvites, M. (2016). *Software libre enfocados en diversos campos de las ciencias biológicas*. HAMUTAY, 1(3), 59 - 70.

Alcantara, M., Gomez, J., Pazos, M., & Sanroman, M. (2008). *Combined treatment pf PAHs contaminated soils using the sequence extraction with surfactant - electrochemical degradation*. Chemosphere(70), 1438 -1444.

- Alexander, M. (1999). *Biodegradation and remediation*. London: Academic Press.
- Allaker, R. (2010). *The use of nanoparticles to control oral biofilm formation*. J Dent Res, 1175-1186.
- Allendorf, F., & Luikarf, G. (2007). *Conservation and the genetics of populations*. Oxford UK: Black well.
- Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990). *Basic Local Alignment Search Tool*. Journal of Molecular biology.
- Annweiler, E., Richnow, H., Antranikian, G., Hebenbrock, S., Garms, C., Franke, S., . . . Michaelis, W. (2000). *Naphthalene degradation and incorporation of naphthalene- derived carbon into biomass by the thermophile Bacillus thermoleovorans*. Applied and Environmental Microbiology(66), 518-523.
- Atlas, R., & Phillips, J. (2005). *Bioremediation Applied Microbial Solution for Real - Word Enviromental Cleanup*. ASM Press.
- Bailon, L., Gonzales, R., & Cervantes, A. (2003). *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias*. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., & Turck, M. (1996). *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method*. Am J Clin Pathol, 4(45), 493 - 496.
- Bhupathiraju, V., Hernandez, M., Landfear, D., & Alvarez, L. (1999). *Application of tetrazolium dye as an indicator of viability in anaerobic bacteria*. J Microbiol Meth(37), 231 - 243.
- Binks, P., French, C., Nicklin, S., & Bruce, N. (1996). *Degradation of pentaerythritol tetranitrate by Enterobacter cloacae PB2*. Applied and Environmental Microbiology, 4(62), 1214 - 1219.

- Bosshard, P., Abels, S., Zbinden, R., E, B., & Altwegg, M. (2003). *Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation)*. Clin Microbiol(41), 4134 - 4140.
- Bovill, R., Shallcross, J., & Mackey, B. (1994). *Comparasion of the fluorescent redox dye 5-cyano-2,3-ditolyltetrazolium choride with p-iodonitrotetrazolium violet to detect metabolic activity in heart - stressed Listeria monocytogenes cells*. App Bacteriol(77), 353 - 358.
- Brill, W. (1980). *Biochemical genetics of nitrogen fixation*. Microbiological Reviewa(44), 449 - 467.
- Brudno, M., Malde, S., Poliakov, A., Do, C., Couronne, O., Dubchak, I., & Batzoglou, S. (2003). *Glocal alignment: finding rearrangements during alignment*. Bioinformatics, 1 (19), 54 - 62.
- Bruno, M., Kaiser, A., & Montville, T. (1992). *Depletion of proton motive force by nisin in Listeria monocytogenes cells*. Appl Environ Microbiol(58), Departamento de química, física e ingeniería química.
- Cannova, D. (2007). *Técnicas de caracterización de Leishmania spp y su aporte a la leishmaniasis*. Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, 11(98), 67-72.
- Cañizares, J., & Blanca, J. (2015). *Alineamiento de secuencias*. Valencia: Bioinformática-UPV.
- Casal, P. (2015). *Síntesis de nanopartículas con propiedades adsorbentes mediante métodos de química sostenible*. Universidade da Coruña - Facultad de ciencias., Departamento de química, física e ingeniería química.
- Casellas, M. F. (1995). *Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona . España: Chemosphere*.

- Cepeda, J. (1991). Química de suelos. Trillas.*
- Cerqueira, V., Hollenbach, E., Maboni, F., Vanstein, M., Camargo, F., & Peralba, M. (2011). Biodegradation potential of oily sludge by pure and mixed bacterial. Bioresour Technol(102), 1003 - 1010.*
- Chang, M., & Kang, H. (2009). Remediation of pyrene - contaminated soil by synthesized nanoscale zero-valent iron particles. Journal of Environmental Science and Health, 576 - 582.*
- Chang, M., Huang, C., & Shu, H. (2000). Effects of surfactants on extraction of phenanthrene in spiked sand. Chemosphere(41), 1295 - 1300.*
- Chang, M., Shu, H., Hsieh, W., & Wang, M. (2005). Using nanoscale zero-valent iron for remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Journal of the Air y Waste Management Association, 1200 - 1207.*
- Chang, M., Shu, H., Hsieh, W., & Wang, M. (2007). Using nanoscale zero-valent iron for the remediation of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. Journal of the Air y Waste Management Association , 221 - 227.*
- Chen, K., Neimark, H., Rumore, P., & Steiman, C. (1989). Broad - range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleid acids. FEMS Microbiol Lett(57), 19 -24.*
- Cho, K., Park, J., Osaka, T., & Park, S. (2005). The study antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochim Acta, 956-960.*
- Clarridge, J. (2004). Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev(17), 840 - 862.*
- Dale, J., & Von, S. M. (2002). From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology. Alemania: John Wiley y Sons, Ltd. .*

- De Bellis, P., Tristezza, M., Haidukowski, M., Fanelli, F., Sisto, A., Mulé, G., & Grieco, F. (2015). *Biodegradation of ochratoxin A by bacterial strains isolated from vineyard soils*. *Toxins*, 7(12), 5079 - 5093.
- Doddamani, H., & Ninnekar, H. (2000). *Biodegradation of phenanthrene by a Bacillus species*. *Current Microbiology*(44), 11 - 14.
- Ecuador., M. d. (2013). *Ministerio de Ambiente del Ecuador*. .
- Elliott, D., & Zhang, W. (2001). *Field assessment of nanoscale bimetallic particles for groundwater treatment*. *Environ Sci.* , 4922 -4926.
- EPA. (1994). Chapter IV. Biopiles.
- Exner, J. (1994). *Bioremediation: Field Experience*. Lewis publishers, FL.
- Fang, J., Lyon, D., Wiesner, M., Dong, J., & Alvarez, P. (2007). *Effect of a fullerene water suspension on bacterial phospholipids and membrane phase behavior*. *Environmental Science and Technology*(41), 2646 - 2642.
- Fang, J., Shan, X., Wen, B., Lin, J., & Owens, G. (2009). *Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns*. *Environmental Pollution*(157), 1101 - 1109.
- Fantroussi, S., & Agathos, S. (2005). *Is bioaugmentation a Feasible Strategy for Pollutant Removal and Site Remediation?*. . *Current Opinion in Microbiology*, 268-275.
- Farre, M., Gaida-Schranz, K., Kantiani, L., & Barcelo, D. (2009). *Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(393), 81 - 95.
- Fernández, L. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remoción de sitios contaminados con hidrocarburos*. México.

- Fernández, M., Da-Silva, A., & Martínez, C. (2012). *Análisis de transgénesis mediante PCR de 20 harinas de maíz que se encuentran a la venta en el mercado Uruguayo*. . Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 92 - 104.
- Fu, M., Vary, P., & Lin, C. (2005). *Nanocompuestos anatasa de TiO₂ para recubrimientos antimicrobianos*. Phys Chem B.
- Galkiewics, J., & Kellogg, C. (2008). *Cross - kingdom amplification using bacteria - specific primers: complications for studies of coral microbial ecology*. Applied and environmental microbiology, 74(24), 7828 - 7831.
- Gallego, J., Loredó, J., Llamas, J., Vázquez, F., & Sánchez, J. (2001). *Bioremediation of Diesel Contaminated Soils: Evaluation of Potencial in situ Techniques by Study Bacterial Degradation*. . Biodegradation., 325-335.
- Ghazali, F., Rahman, R., Salleh, A., & Basri, M. (2004). *Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium*. International Biodeterioration and Biodegradation(54), 61-67.
- Gil, I. (2013). *Por qué hay un derrame petrolero por semana en Ecuador?* BBC Mundo.
- Grishchenkov, V., Townsend, R., McDonald, T., & al., e. (2000). *Degradation of petroleum hydrocarbons by facultative anaerobic bacteria under aerobic and anaerobic conditions*. Process Biochemistry, 9(35), 889-896.
- Gu, C., Li, C., Yang, L., & Huo, G. (2014). *Enterobacter xiangfangensis sp. nov., isolated from Chinese traditional sourdough, and reclassification of Enterobacter sacchari Zhe et al., 2013 as Kosakonia sacchari comb. nov.* International journal of systematic and evolutionary microbiology, 8(64), 2650 - 2656.

- Gutarowska, B., Skora, J., Zduniak, K., & Rembisz, D. (2012). Analysis of the sensitivity of microorganisms contaminating museums and archives to silver nanoparticles. *Int Biodeterior Biodegrad*(68), 7 - 17.
- Hall, B. (2001). *Phylogenetic Trees made easy* . Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc Sunderland.
- Harris, E. (1998). *A low-cost approach to PCR*. New York: Oxford U, Press.
- Hentati, D., Chebbi, A., Loukil, S., Kchaou, S., Godon, J., Sayadi, S., & Chamkha, M. (2016). Biodegradation of fluoranthrene by a newly isolated strain of *Bacillus stratosphericus* . *Environmental Science and Pollution Research*, 15088 - 15100.
- Hodson, M. (2010). *The need for sustainable soil remediation*. *Elements*, 363 - 368.
- Hurting, A. S. (2004).
- Irwin, R., Mouwerik, M., Stevens, L., Seese, M., & Basham, W. (1997). "Environmental Contaminants Encyclopedia Entry".En:"National Park Service,Water Resources Division, Fort Collins, Colorado.Distributed within the Federal Government as anElectronic Document.
- Jurgensen, K., Puustinen, J., & Suortti, M. (2000). *Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles*. *Environ. Pollunt*, 15(23), 245-254.
- Karn, B., Kuiken, T., & Otto, M. (2009). *Nanotechnology and in situ remediation: A review of the benefits and potential risks* . *Environmental Health Perspectives*, 1823 - 1831.
- Kharissova, O., Rasika, H., Kharisov, B., Olvera, B., & Jiménez, J. (2013). *The greener synthesis of nanoparticles* . *Trends Biotechnol*, 240 - 248.
- Kim, Y., Ahn, C., Woo, S., Jung, G., & Park, J. (2009). *Synergic degradation of phenanthrene by consrtia of newly isolated bacterial strains*. *Journal of Biotechnology*, 1(144), 293- 298.

- Kishore, D., & Ashis, M. (2007). *Crude petroleum - oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresour Technol(98), 1339 - 1345.*
- Klaine, S., Alvarez, P., Batley, G., Fernandes, T., Handy, R., Lyon, D., . . . Lead, J. (2008). *Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. Environmental Toxicology and Chemistry(27), 1825 - 1851.*
- Kokkoris, M., Trapalis, C., Kossionides, S., Vlastou, R., Nsouli, B., Grotzschel, R., . . . Paradellis, T. (2002). *RBS and HIRBS studies of nanostructured AgSiO₂ sol gel thin coatings. . Nucl.Instrum.Meth. B. .*
- Kumar, S., Nagaraja, B., Shashikala, V., Padmasri, A., Madhavendra, S., Raju, B., & Rao, K. (2004). *Highly efficient Ag/C catalyst prepared by electro-chemical deposition method in controlling microorganisms in water. . J Mol Catal A Chem, 313-319.*
- Lee, H., Yeo, S., & Jeong, S. (2003). *Antibacterial effect of nanosized silver colloidal solution on textile fabrics . J. Mater. Sci., 2199.*
- Li, H., Zhou, Q., Wu, Y., Fu, J., Wang, T., & Jiang, G. (2009). *Effects of waterborne nanoiron on medaka (Oryzias latipes): Antioxidant enzymatic activity, lipid peroxidation and histopathology. Ecotoxicology and Environmental Safety(72), 684 - 692.*
- Li, L., Fan, M., Brown, R., & Van - Leeuwen, J. (2006). *Synthesis, properties and environmental applications of nanoscale iron - based materials: review. Critical reviews in Environmental Science and Technology(36), 405 - 431.*
- Li, X., Elliott, D., & Zhang, W. (2006). *Zero - valent iron nanoparticles for abatement of environmental pollutants: Materials and engineering aspects. Cri Rev. Sol. State Mater Sci, 4(31), 111 - 122.*

- Liao, J., Zhu, Z., Mo, A. L., & Zhang, J. (2010). Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect . *Int J Nanomedicine*, 261–267.
- Lin, Y., & Cai, L. (2008). PHA - degrading microbial consortium and its pyrene-degrading plasmids from mangrove sediment samples in Huian, China. *Marine Pollution Bulletin*(57), 703 - 706.
- Lok, C., Ho, C., Chen, R., He, Q., Yu, W., Sun, H., . . . Che, C. (2006). Proteomic Analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. . *J Proteome Res.*, 916-924.
- Lyon, D., Brunet, L., Hinkall, G., Wiesner, M., & Alvarez, P. (2008). Antibacterial activity of fullerene water suspensions water research is not due to ROS-mediated damage. *Nano Letters*(8), 1539 - 1543.
- Machado, S., Pinto, S. L., Grosso, J. P., Nouws, H. P., Albergaria, J. T., & DelerueMatos, C. (2013). Green production of zero-valent iron nanoparticles using tree leaf extracts. . *Sci. Total Environ.*, 445-446.
- Madigan, M., Martinko, J., & Parker, J. (2004). *Biología de los microorganismos*. Illinois: Pearson.
- Makarov, V., Makarova, S., & Love, A. (2014). Biosynthesis of Stable Iron Oxide Nanoparticles in Aqueous Extracts of *Hordeum vulgare* and *Rumex acetosa* Plants . *Langmuir*.
- Manual, D. y. (2008). Agars.
- Maposita, M., Calle, W., Fiallos, C., & Burgos, F. (2011). Caracterización microbiológica en suelos contaminados por hidrocarburos de tipo Pseudomonas en el sector Río Bonanza, Provincia de Paltaza. *Escuela Politécnica del Litoral , Centro de Investigación científica y Tecnológica*.

- Martínez, A., Ramírez, O., & Valle, F. (1997). Improvement of culture conditions to overproduce B-galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*. *Appl Microbiol Biotechnol*(47), 40 - 45.
- Martínez, F., Olive, P., Banuelos, A., Orrantia, E., Niño, N., Morales, E., . . . Av-Gay, Y. (2010). Synthesis, characterization and evaluation of microbial and cytotoxic effect of silver and titanium nanoparticles. *Nanomedicine: NBM*, 5(6), 681 - 688.
- Masciangioli, T., & Zhang, W. (2003). Environmental technologies at the nanoscale. *Environ Sci. Total Environ*, 5(37), 102A - 108A.
- Miller, R., Walker, R., Carson, J., Coles, M., Coyne, R., Dalsgaard, I., . . . R, R. (2005). Standardization of a broth microdilution susceptibility testing method determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. *Dis Aquat Org*(64), 211 - 222.
- Mohamed, A., Yousef, N., & Farag, G. (2012). Isolation and molecular identification of polyaromatic hydrocarbons-utilizing bacteria from crude petroleum oil samples. *African Journal of Microbiology Research*, 6(49), 7479 - 7484.
- Moore, E., Arnscheidt, A., Kruger, A., Strompl, C., & Mau, M. (2004). Section 1 update: simplified protocols for preparation of genomic DNA from bacterial cultures. En E. Moore, A. Arnscheidt, A. Kruger, C. Strompl, & M. Mau, In *Molecular microbial ecology manual (Segunda edición ed., págs. 3 - 18)*. Kluwer Academic Publishers.
- Mueller, E., & Nowack, B. (2010). Nanoparticles for remediation: Solving big problems with little particles. *Elements*, 395 - 400.
- Murgueitio, E., Debut, A., Landivar, J., & Cumbal, L. (2016). Synthesis of Iron Nanoparticles through Extracts of Native Fruits of Ecuador, as Capulí (*Prunis serotina*) and Mortiño (*Vaccinum floribundum*). *Biology and Medicine*, 8(3), 1.

- Nel, A., Madler, L., D, V., Xia, T., Hoek, E., Somasundaran, P., . . . Thompson, M. (2009). *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface*. *Nature Materials*(8), 543 - 557.
- Nowack, B., & Bucheli, T. (2007). *Occurrence behavior and effects of nanoparticles in the environment*. *Environmental Pollution*(150), 5 -22.
- Nowacs, B. (2009). *The behavior and effects of nanoparticles in the environmental*. *Environmental pollution*, 1063 - 1064.
- Nussbaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2008). *Génética en medicina (Séptima edición ed.)*. España: ELSERVIER.
- Nwaogu, L., Onyeze, G., & Nwabueze, R. (2008). *Degradation of diesel oil in a polluted soil using Bacillus subtilis*. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1939.
- Ollivier, B., & Magot, M. (2005). *Petroleum microbiology*. USA: ASM Press.
- Palencia, S., Combatt, E., & Palencia, M. (2013). *Toxicidad de nanopartículas inorgánicas sobre los microorganismos del suelo con importancia agrícola*. *Revista Temas Agrarios* , 106-122.
- Pardo, F., Rosas, J., Santos, A., & Romero, A. (2015). *Remediation of a biodiesel blend - contaminated soil with activated persulfate by different source of iron*. Springer, 17.
- Pedersen, R. (2008). *Screening for Ulkebugt bacteria capable of inhibiting bacterial pathogens*.
- PEPDA. (2002). *Derrames de hidrocarburos en el Ecuador*. .
- Pérez, R., Camacho, M., Gómez, J., Ábalos, A., & Viñas, M. C. (2008). *Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelo contaminado de petróleo*. *CENIC - Ciencias Biológicas*(39).

- Pérez-Vargas, J., Viguera-Carmona, S., Gómez-Guzmán, O., & Calva-Calva, G. (2015). *Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en Biopilas/Microbial degradation with bfna of aromatic hydrocarbon by bioaugmentation in biopiles.*
- Pinoncely, N. (2010). Prevalencia de la resistencia de antifungicos y de mutaciones en genes asociados en especies de Candida aisladas de pacientes ginecológicas. *Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, México.*
- Pokethitiyook, P., Sungpetch, A., Upathame, S., & Kruatrachue, M. (2002). *Enhancement of Acinetobacter Calcoaceticus in biodegradation of Tapis crude oil.* Symposium No: 42. *Thailand: WCSS.*
- Ramírez, N., Méndez, A., Cocotle, B., & Arenas, J. (2003). *Reacción en Cadena de polimerasa.* Med. Univ. Veracruzana.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. (Vol. 2).
- Rodríguez, L. (2010). Detección de conglomerados en la solución de problemas bioinformáticas y biomédicas. *Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas, Facultad de matemática, física y computación , Santa Clara.*
- Ruparelia, J., Chatterjee, A., Duttagupta, S., & Mukherji, S. (2008). *Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. . Acta Biomater., 707-716.*
- Saadoun, I. (2002). *Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel.* Journal of Basic microbiology, 6(42), 420 - 428.

- San Martín, N. (1996). Revista de Extensión TecnoVet. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.*
- Sánchez, A. (2012). Identificación y cuantificación de especies del género Merluccius mediante la utilización de PCR a tiempo real. Universidad de Vigo, Departamento de Bioquímica, genética e inmunología, Vigo.*
- Scaliter, J. (2016). Desarrollan nueva técnica para descontaminar terrenos contaminados.*
- Schneider, T., & Stephens, R. (1990). Sequence logos: a new way to display consensus sequences. Nucleic Acids Res(18), 6097 - 6100.*
- Schorr, J. (2007). Promise of nanomaterials for Water Cleanup. Water Conditioning y purification.*
- Scientific, T. (2010). NanoDrop 8000 Spectrophotometer V2.2 User Manual.*
- Shah, V., & Belozeroval, I. (2009). Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. Water and air pollution(197), 143 - 148.*
- Shuchi, V., Renu, B., & Vikas, P. (2006). Oily sludge degradation by bacteria from Ankleshwar, India [J]. International Biodeterioration y Biodegradation, 4(57), 207-213.*
- Somasundaran, P., Fang, X., Ponnurangam, S., & Li, B. (2010). Nanoparticles: Characteristics, mechanisms and modulation of biotoxicity. KONA powder and particle journal(28), 38 - 49.*
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram negative bacteria. J Colloid Interface Sc(275), 177-182.*
- Stapleton, R., Bright, N., & Sayler, G. (2000). Catabolic and genetic diversity of degradative bacteria from fuel hydrocarbon contaminated aquifers. FEMS Microbiology Ecology(39), 211-221.*

- Sun, Y., Wei, W., & Zhao, M. (2009). *Technology for biological remediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil*[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 10(37), 63-65.
- Tamura, D. (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0". *Mol Biol Evol*(24), 1596 - 1599.
- Thompson, J., Higgins, D., & Gibson, T. (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position - specific gap penalties and weight matrix". *Nucleic Acids Res*(22), 4673 - 4680.
- Tratnyek, P., & Johnson, R. (2006). *Nanotechnologies for environmental cleanup*. *Nano Today*, 44 - 48.
- Ulrici, W. (2000). *Contaminated soil areas, different countries and contaminants, monitoring of contaminants. in: Environmental processes II. En W. Ulrici, Soil Decontamination Biotechnology (págs. 5-42). Weinheim: Reed.*
- Usman, M., Ibrahim, N., Shameli, K., Zainuddin, N., & Wan-Yunus, W. (2012). *Cooper "Nanoparticles Mediated by Chitosan: Synthesis and Characterization via Chemical Methods"*. *Molecules*(17), 4928 - 14936.
- Vasco, C., Ruales, J., & Karnal-Eldin, A. (2008). *Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador*. *Food Chemistry*, 111, 816 - 823.
- Volke, S., & Velasco, T. (2003). *Biodegradación de suelos contaminados con petróleo mediante composteo. Centro nacional de investigación y capacitación ambiental.*
- Wang, L. (1992). *Appendix 2: Standard Bacillus Media. En Biology og Bacilli Applications to Industry Doi (pág. 351). USA: McGloughlin.*
- Wayne. (2003). *Susceptibility testing of mycobacteria nocardia and other aerobic actinomycetes. Clinical and Laboratory Standards Institute.*

- Woese, C. (1987). *Bacterial evolution*. Microbiol Rev, 2(51), 221 - 271.
- Woomer, L., Martín, A., & Albercht, D. (1994). *The importance and management of soil organic matter in tropics*. En L. Woomer, A. Martín, & D. Albercht, *The Biological Management of Topical Soil Fertility*. US: Chichester.
- York, N., & Rosen, G. (2011). *Combining gene prediction methods to improve metagenomic gene annotation*. BMC Bioinformatics, 20.
- Yuan, H., Yang, J., Wang, Z., & al, e. (2003). *Screening of microbial strains for degrading petroleum oils and their degradation characteristics*. Environmental Science, 2(23), 157 - 161.
- Zhang, L., Jiang, Y., Ding, Y., Daskalakis, N., Jeuken, L., Povey, M., . . . York, D. (2010). *Mechanistic investigation onto antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli*. Nanopart Res(12), 1625 - 1636.
- Zhang, W. (2003). *Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview*. . Journal of Nanoparticle Research, 323 - 332.
- Zhang, X., Niu, H., Yan, J., & Cai, Y. (2011). *Immobilizing silver nanoparticles onto the surface of magnetic silica composite to prepare magnetic disinfectant with enhanced stability and antibacterial activity*. Colloids and Surface(375), 186 - 192.