NEMATODOS BACTERIÓFAGOS COMO ORGANISMOS ASOCIADOS A LOS PROCESOS DE BIOMONITOREO

Torres Nancy, Otero Ma. del C.
Fac. Ciencias Naturales - Ciunsa.
Universidad Nacional de Salta
Plaza Gloria
Fac. de Ingeniería – INENCO –

RESUMEN

De la gran diversidad de organismos que viven en el suelo, los nematodos bacteriófagos constituyen un sujeto de estudio interesante en la búsqueda de bioindicadores adecuados para reflejar el grado de perturbación del suelo y la marcha de los procesos de recuperación.

El trabajo se desarrolla a escala laboratorio, utilizando suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de la región del noroeste argentino simulando los manejos agrícolas que son sometidos en los biotratamientos en campo

Se evaluó la actividad bacteriana y su relación con los procesos de degradación en suelos alterados por hidrocarburos así como su relación con las poblaciones de nematodos bacteriófagos analizadas en laboratorio. Los resultados obtenidos indican que existe una correlación positiva entre unidades formadoras de colonias (UFC) y porcentaje de remoción (% Re) con r = 0,729 (P=0,0001). Esto muestra que a medida que aumentan las poblaciones de microorganismos, aumenta la remoción del contaminante. Se obtuvo asimismo una correlación positiva entre UFC y poblaciones de nematodos con r = 0.829 (P=0,0001) lo que indica que a medida que aumentan las poblaciones bacterianas, existe un aumento de las poblaciones de nematodos.

Palabras claves: Bioindicadores, nematodos, biorremediación, suelos contaminados.

INTRODUCCIÓN

Los conocimientos sobre el comportamiento del suelo frente a los diferentes contaminantes no han sido completamente estudiados hasta el momento, sobre todo si se tiene en cuenta, que por la actividad del hombre los tipos de contaminantes son muy variados.

Los organismos del suelo no solo son habitantes sino que son parte de los mismos. La biota del suelo provee de un número grande de beneficios en el ecosistema, tienen una influencia importante en las propiedades de los suelos tales como la hidrología, aireación, composición gaseosa, descontaminación y descomposición de residuos orgánicos; desempeñando múltiples funciones de gran importancia tales

como mezcla de material orgánico e inorgánico (bioturbación), diseminación de organismos dentro del suelo, degradación de compuestos orgánicos, síntesis y excreción de productos orgánicos en el suelo, etc..

En el suelo existe una gran diversidad de organismos, entre los cuales se encuentran los pertenecientes a:

- La microflora: bacterias, actinomicetes, hongos etc.
- La microfauna: protozoo, ciliados, nematodos etc., con medidas menores de 200µm de diámetro
- La mesofauna: Colémbolos, termitas, lombrices etc. con medidas de 100 a 2mm de diámetro, entre otros.

Estos organismos interrelacionan entre sí, formando un sistema complejo.

Algunos de ellos pueden actuar como indicadores de calidad de suelo, que pueden tener diferentes grados de sensibilidad a distintos cambios, midiendo el grado de desequilibrio ecológico causado por el contaminante.

Los indicadores biológicos deben reunir algunas características básicas necesarias para su actuación, deben ser comprensibles y fáciles de interpretar, accesibles y sencillos de obtener evitando aquellos cuya interpretación requieran de infinidad de cálculos estadísticos y matemáticos, deben ser significativos y relevantes; representar la realidad de un sistema para poder actuar en consecuencia, deben ser herramientas útiles. Como conjunto deben poder proporcionar una visión rápida de la situación en estudio.

Los bioindicadores son adecuados para evaluar la contaminación orgánica, pudiendo expresar el impacto ecológico causado por esta, además se pueden utilizar como biomonitores tanto de la calidad del suelo, como del avance de un proceso de descontaminación.

La elección de un indicador biológico debe estar orientada según las características del contaminante y las condiciones en que este se encuentre. Debe ser sensible al contaminante para el cual se lo utiliza y a los cambios del mismo, solo así se podrá evaluar de una manera rápida, sencilla y continua el desarrollo del proceso en estudio.

Los nematodos son organismos que reúnen características necesarias como para emprender su estudio como indicador, son de cuerpo alargado, cilíndrico o fusiforme, miden desde 0,2 mm a varios centímetros (Fraga 1968)

Los nematodos del suelo constituyen una parte importante de la fauna del mismo, siendo más numerosos que cualquier otro animal de tamaño comparable (Jesse 1974), miden de 0,5 a 5 mm de largo y 30 µm de diámetro, presentes en el agua de los poros del suelo, en gran número y diversidad de especies y niveles tróficos, pues los hay bacteriófagos, micófagos, fitófagos, predadores y omnívoros (Brussaard, 1997). La duración del ciclo vital se ve influenciada por varios factores, pero depende fundamentalmente de la especie y de las condiciones climáticas ambientales (Fraga, 1968).

Los nematodos bacteriófagos, son aquellos organismos que consumen bacterias como fuente de alimento, por lo tanto pueden convertirse en una herramienta valiosa para comprobar la existencia, de estos microorganismos. Pueden comportarse como organismos indicadores de situaciones alteradas, debido a algún polucionante en concentraciones determinadas (Otero et.al. 2002). Además cumplen un

rol importante en la descomposición de la materia y en el reciclaje de los nutrientes del suelo (Chaves et. al. 1995)

En condiciones normales los nematodos bacteriófagos del suelo son abundantes y están presentes en una gran diversidad de ambientes. Por otro lado presentan un ciclo relativamente largo, lo que permite su conservación. Su tamaño facilita la cuantificación y estudio en laboratorio. Las técnicas de separación y aislación son prácticas y económicas. Estas características, entre otras, como la posibilidad de criarlos en laboratorio, permiten considerarlos como promisorios bioindicadores (Otero et.al. 2002).

Las bacterias son participantes activas de los procesos de biodegradación, toman la materia orgánica como fuente de carbono, por lo que muchas de ellas, son capaces de degradar no solamente las sustancias presentes en el suelo sino también aquellas que son sustancias problemas producto de contaminantes originados por la actividad del hombre.

La contaminación de suelos por hidrocarburos es un problema importante en la mayor parte de los países productores. En el mundo se han implementado diversos métodos de descontaminación de suelos, siendo el más empleado el que se aplica técnicas fisicoquímicas, con la desventaja de ser muy costoso y que puede emplear mucho tiempo en dar resultado.

Entre los métodos biológicos utilizados se encuentran los procesos de biorremediación los cuales han sido exitosamente aplicados en limpieza de suelos. Implica el uso de microorganismos para degradar contaminantes.

Teniendo en cuenta que el petróleo es un contaminante orgánico, que aporta una fuente de carbono a los microorganismos, constituyéndose en una fuente de alimento, que en condiciones de temperatura y humedad óptimas, donde la disponibilidad de oxigeno, fósforo, nitrógeno y otros nutrientes sean las adecuados, la estimulación de las poblaciones microbiana puede resultar efectiva, degradando al contaminante en formas mas sencillas o menos tóxicas.

La biorremediación es una alternativa biológica eficiente que correctamente aplicadas es aceptables desde el punto de vista ecológico.

El presente trabajo tiene como objetivo, buscar una relación comprobable entre las poblaciones de nematodos bacteriófagos, poblaciones bacterianas y la degradación del contaminante con el fin de vincular a los nematodos bacteriófagos, como organismos partícipes de procesos de biomonitoreo, asociándolos con la evaluación de la eficiencia de la biorremediación.

DESARROLLO

Materiales y Métodos

Ensayo experimental

El trabajo se realizó a escala laboratorio, donde se experimentó una situación de biorremediación en condiciones de temperatura, humedad y oxigenación optimas.

Para estudiar dicho proceso, se utilizó suelo natural y lodo de petróleo provenientes del norte de la provincia de Salta en donde se desarrolla una intensa actividad petrolera.

En la experiencia a escala laboratorio, se realizó una mezcla de lodo con el suelo natural con el fin de obtener un suelo alterado por el contaminante con una concentración del 7% de hidrocarburos totales (HTP).

Se procesaron tres variantes que constituyeron los siguientes ensayos a estudiar:

- Suelo inalterado (SI): Correspondiente al suelo natural y utilizado como testigo.
- Suelo alterado (SA): Correspondiente a la mezcla de suelo natural con lodo de petróleo.
- Suelo alterado con el agregado de nutrientes (SAN): Correspondiente al suelo alterado mas la incorporación de fosfato monoácido de amonio en una proporción C: N:P igual a 100:10:1.

Para estudiar la actividad bacteriana y la evolución de la nematofauna se utilizaron cajas con capacidad de 15 litros, las cuales fueron llenadas con suelo proveniente de cada una de las combinaciones anteriormente mencionadas y llevadas a cámara termostatizada durante 94 días a una temperatura de 29ºC +/-2.

Cada uno de los ensayos conservaron, durante el período que duró la experiencia una humedad de entre 12% a 18% y fueron sometidos a aireación, a través de la homogeneización del suelo en forma manual, con frecuencia de dos veces por semana.

Los análisis físicos, químicos y biológicos se realizaron al iniciar, a los 50 y 94 días de la experiencia.

El método seleccionado para la recolección de suelo de cada caja, fue a través de la construcción de una grilla hipotética cuadrada a partir de la cual se extrajeron muestras de forma sistemática del centro de cada cuadrado, las cuales posteriormente fueron homogeneizadas.

Los nematodos se separaron del suelo por el método de la bandeja de Baermann modificada (Fraga, 1968). Esta es una técnica sencilla que consiste en colocar de 50 a 100 g. del material en estudio sobre papel de filtro que se fija a una bandeja con base en red de alambre, la cual a su vez se coloca sobre una caja de petri de vidrio de 15 cm. de diámetro. Se agrega agua por las paredes de la caja hasta que la muestra este totalmente humedecida.

Una vez en contacto la muestra con el agua se debe dejar reposando durante 48 horas sin mover el aparato. Pasado este período se recoge el agua sobre la cual se realiza la cuantificación de los nematodos presentes con material óptico.
La caracterización física-química desarrollada al inicio de la experiencia fue realizada según Standard Methods.

Los heterótrofos aeróbicos totales se determinaron con técnica de Frioni (Frioni, 1999), para evaluar la microflora bacteriana del suelo.

Análisis estadístico:

Se analizaron estadísticamente los datos obtenidos mediante el Análisis de la Varianza (ANOVA) a un criterio de clasificación, según el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$\mathbf{Y_{ij}}$: una observación cualquiera
μ : media verdadera
τ_i : efecto tratamiento
ε_{ij} : error experimental

Para satisfacer los supuestos para el ANOVA los datos fueron transformados a Y' = log. (Y+10).

Las comparaciones entre medias de tratamientos se realizaron mediante la Prueba de Student-Newman-Keuls.

Se realizaron pruebas de correlación entre unidades formadoras de colonia (UFC/g.), Nº de nematodos y porcentaje de remoción del contaminante.

Resultados

Análisis experimental:

De los análisis físico-químico, la textura franco revela un suelo con muy buenas condiciones de drenajes y aireación. La materia orgánica es mayor en las variables SA y SAN por la incorporación del lodo de petróleo. El valor de pH en todos los tratamientos es el adecuado para el desarrollo de los microorganismos. Los valores de nitrógeno y fósforo en todas las variables estudiadas, dentro de una clasificación agronómica, están ubicados en los niveles de muy bueno. (Tabla 1).

Tabla 1: Caracterización física-química del suelo al iniciar la experiencia

	Textura	Sodio (mg/l)	Potasio (mg/l)	Nitrógeno (ppm)	Fósforo (ppm)	Conductividad (mmhos/cm)	pH	Mat. Org.(g%)
SI	Franco	1.8	0.93	2000	161	0.12	7.32	7.1485
SA	Franco	0.7	1.19	2400	53	0.42	7.00	11.4616
SAN	Franco	0.7	1.19	2400	194	0.7	7.00	11.4616

Al incorporar el lodo de petróleo en el suelo con el fin de obtener la variante suelo alterado, se observa una caída abrupta de las poblaciones de bacteriófagos las cuales posteriormente se fueron recuperando a medida que avanza el proceso de degradación del contaminante. (Tabla 2)

Tabla 2: Muestra la situación de la población de bacteriófagos antes y después de la incorporación del lodo de petróleo.

	Nº de Nematodos bacteriófagos (Antes de la incorporación de lodo)	**Nº de Nematodos bacteriófagos** (Después de la incorporación de lodo)
Suelo alterado	1156	134
Suelo alterado con nutrientes	1156	134

En la figura 1, la disminución en la concentración de hidrocarburo (HTP) durante un período de 94 días. En *el suelo alterado más nutrientes*, fue alta durante el primer mes para luego estabilizarse con valores por debajo de 1,5% en los siguientes días. En *suelo alterado* se observa una reducción en la concentración del contaminante más lenta, alcanzando valores cercanos al 2% al final de proceso.

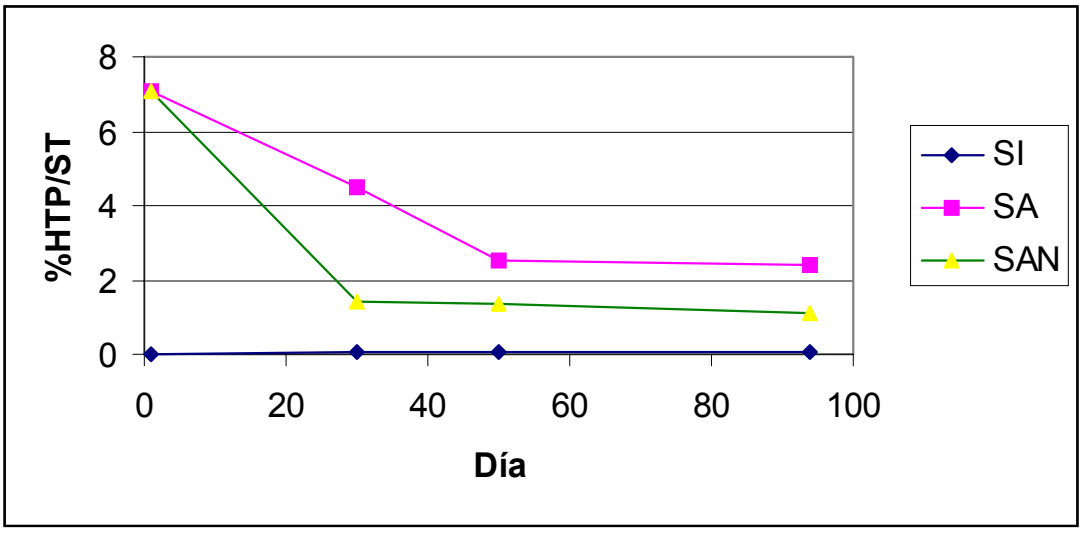

Gráfico1: Comparación de la disminución de la concentración de hidrocarburos en los tres ensayos estudiados.

Con respecto al porcentaje de remoción de hidrocarburo, se observa que en *suelo alterado* la remoción es menor que en *suelo alterado más nutrientes*, este último, alcanzó al primer mes un porcentaje de remoción de 83%. (Tabla 3)

Tabla 3: Porcentaje de remoción de hidrocarburo a lo largo de 94 días

Día	**%Re Suelo alterado**	**%Re Suelo alterado más nutrientes**
30	36	83
50	64	87
94	66	92

Se comparó el comportamiento de los heterótrofos totales (UFC/gr. de suelo) y nematodos bacteriófagos (Nº de nematodos bacteriófagos en 100cc de suelo) con respecto a la concentración de hidrocarburo total (% HTP/ST) donde se observa que en el suelo inalterado las poblaciones no manifiestan grandes variaciones y tienden a mantenerse constantes a lo largo de los 94 días. En los ensayos que contenían el contaminante, al iniciar la experiencia, cuando los niveles del mismo son

altos las poblaciones de nematodos se encuentran deprimidas, a medida que avanza el proceso de degradación de los hidrocarburos, se observa un aumento progresivo de las poblaciones de nematodos bacteriófagos y de microorganismos heterótrofos. (Figura 2,3,4) (las variables heterótrofos totales y nematodos bacteriófagos se encuentran transformadas a logaritmo de Y+10)

Con un 2% de hidrocarburo, en laboratorio se mantienen poblaciones altas de los organismos en estudio, esto probablemente se deba al manejo en condiciones controladas, con el mantenimiento de condiciones óptimas de temperatura, humedad y aireación constantes.

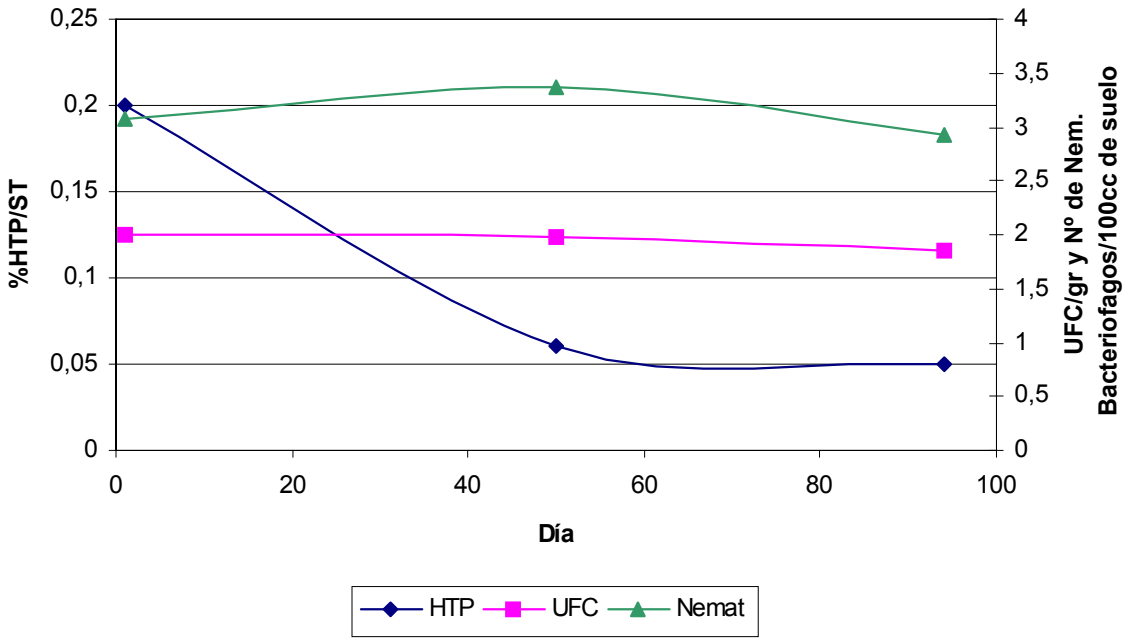

Gráfico 2: Comparación de tres variables (% HTP/ST, UFC/gr. de suelo , Nº de nematodos bacteriófagos/100cc de suelo) en suelo inalterado durante los 94 días que duró la experiencia.

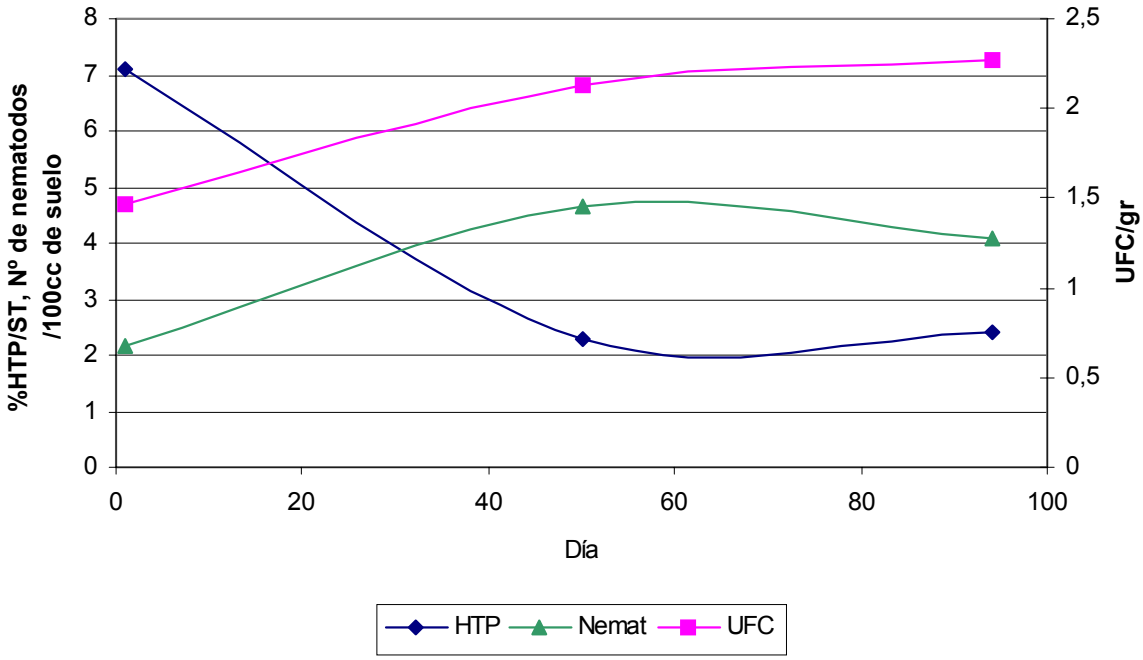

Gráfico3: Comparación de tres variables (% HTP/ST, UFC/gr. de suelo, Nº de nematodos bacteriófagos/100cc de suelo en suelo alterado más nutrientes durante los 94 días que duró la experiencia

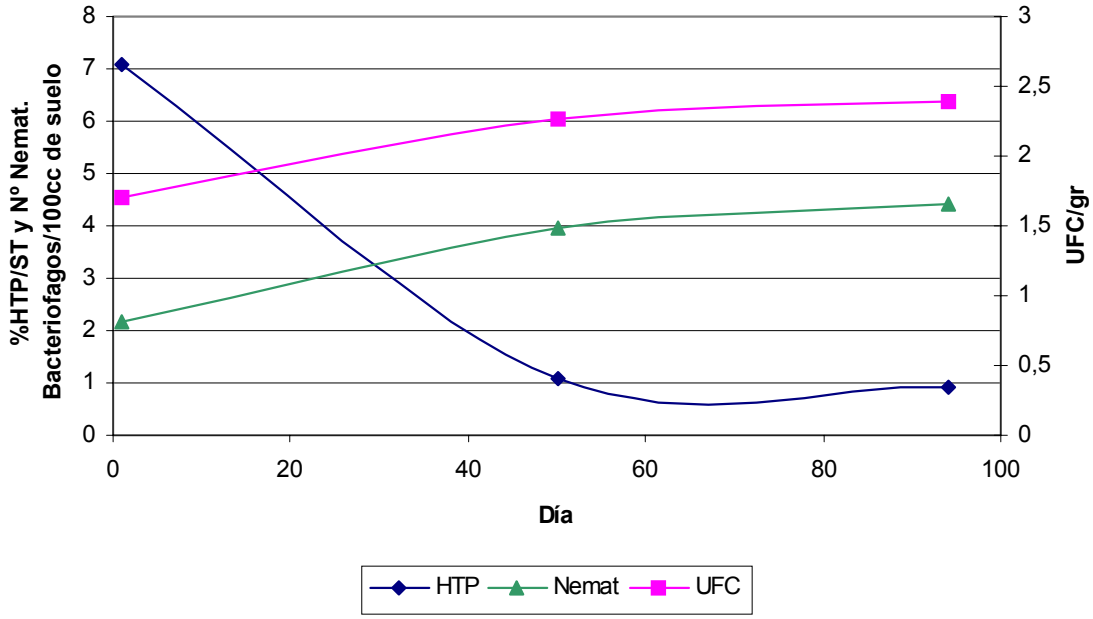

Figura 4: Comparación de tres variables (% HTP/ST, UFC/gr. de suelo , Nº de nematodos bacteriófagos/100cc de suelo en suelo alterado más nutrientes durante los 94 días que duró la experiencia.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico de las variables %HTP/ST, UFC/ g. de suelo y Nº de nematodos bacteriófagos/100cc de suelo, con el fin de conocer si existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los ensayos. (Tabla 4,5,6)

Según la prueba de Student – Neuman – Keuls de comparación de media se puede observar que a los 30, 50 y 94 días de iniciada la experiencia existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos según la variable estudiada HTP/ST. (Tabla 4)

Tabla 4: Comparación de medias de la variable HTP/ST según prueba de Student – Neuman – Keuls.

Variable	HTP/ST (a los 30 días)		HTP/ST (a los 50 días)		HTP/ST (a los 94 días)	
Tratamiento	Y'	Y	Y'	Y	Y'	Y
1 (SI)	1.004c	0.096	1.002 c	0.052	1.002d	0.049
2 (SA)	1.143a	3.916	1.091a	2.336	1.093a	2.381
3 (SAN)	1.050b	1.229	1.047 b	1.138	1.038c	0.928
CV%	1.335		1.24		0.83	
F	57.73		37.284		57.75	
P	<0.0001		<0.0001		<0.0001	
Medias que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativa al α= 0,05 Y= media de los tratamientos. Y'= media de los tratamientos transformada						

Según la prueba de Student – Neuman – Keuls de comparación de medias, en la variable analizada UFC/g. de suelo, podemos observar que a los 50 días de iniciada la experiencia existe diferencias estadísticamente significativas entre *suelo inalterado, suelo alterado y suelo alterado mas nutrientes*.

A los 94 días, *suelos alterado y suelo alterado más nutrientes*, no muestran diferencias significativas entre sí; se observa diferencia significativa de *suelo inalterado* con respecto *a suelo alterado y suelo alterado mas nutrientes*. (Tabla5)

Tabla 5: Comparación de medias de la variable UFC/g. según prueba de Student – Neuman – Keuls.

Variable	UFC (a los 50 días)		UFC (a los 94 días)	
Tratamiento	Y'	Y	Y'	Y
1 (Suelo inalterado)	1.970c	$83x10^{11}$	1.855b	$66X10^{11}$
2 (Suelo alterado)	2.134b	$127x10^{11}$	2.271a	$219X10^{11}$
3 (Suelo alterado más nutrientes)	2.264a	$174x10^{11}$	2.383a	$232X10^{11}$
CV%	1.335		6.098	
F	57.73		9.536	
P	<0.0001		0.0051	
Medias que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativa al α= 0,05 Y= media de los ensayos. Y'= media de los ensayos transformada				

Según la prueba de Student – Neuman – Keuls de comparación de medias entre ensayos, en la variable estudiada Nº de nematodos / 100cc de suelo, podemos observar que a los 50 días de iniciada la experiencia *suelo inalterado*, *suelo alterado y suelo alterado más nutrientes*, presentan diferencias estadísticamente significativas.

A los 94 días, *suelo alterado* y *suelo alterado más nutrientes* no muestran diferencias significativas entre sí, se observa diferencia significativa de *suelo inalterado* con respecto a *suelo alterado y suelo alterado más nutrientes*. (Tabla 6)

Tabla 6: Comparación de medias de la variable Nematodos/100cc de suelo según prueba de Student – Neuman – Keuls.

Variable	Nematodos / 100cc de suelo (A los 50 días)		Nematodos / 100cc de suelo (A los 94días)	
Tratamiento	Y'	Y	Y'	Y
1 (SI)	3.369c	2 464	2.935b	1077
2 (SA)	4.652a	52392	4.069a	51246
3 (SAN)	3.957b	9706	4.422a	28263
CV%	6.698		7.04	
F	14.648		25.718	
P	<0.0013		0.0002	
Medias que comparten la misma letra no presentan diferencias estadísticamente significativa al α= 0,05 Y= media de los tratamientos. Y'= media de los tratamientos transformada				

Se estudio el grado de asociación entre unidades formadoras de colonias (UFC/g.) y porcentaje de remoción (%Re) y número de nematodos, del cual se obtuvo correlación positiva entre unidades formadoras de colonias y porcentaje de remoción de hidrocarburo, lo que indica que a medida que aumenta las poblaciones bacterianas, la remoción de hidrocarburo también aumenta.

Del análisis de correlación entre nematodos bacteriófagos y unidades formadoras de colonias, se obtuvo como resultado que existe correlación positiva, lo que indica que a medida que aumentan las poblaciones bacterianas, las poblaciones de nematodos bacteriófagos crecen conjuntamente. (Tabla 7)

Este dato es muy importante de considerar puesto que son los microorganismos bacterianos los encargados de consumir el contaminante, al aumentar la fuente de carbono, aumenta el tamaño de las poblaciones de microorganismos, a su vez los nematodos al ser bacteriófagos, consumen tales organismos y el tamaño de su población también aumentará al tener fuente de alimento disponible.

Tabla 7: Correlación entre unidades formadoras de colonias (UFC) y porcentaje de remoción (%Re) y número de nematodos.

Correlaciones	UFC/g.
%Re (Porcentaje de remoción)	r = 0.729 p = 0,0001
Nº nematodos/100cc de suelo	r = 0.871 p = 0,0001

Caracterización morfológica de nematodos

Los nematodos del suelo (Figura 1) son organismos cilíndricos de pequeña talla, entre 0,5 a 5 mm de longitud aproximadamente.

El cuerpo esta revestido por una cutícula de naturaleza proteica que hace a las veces de esqueleto externo, pero que es flexible y permite los movimientos del animal. Esta cutícula reviste los orificios de la boca, recto, ano, fasmidios, anfidios, vagina y poro escretor.

El extremo anterior, donde se encuentra la boca, es una región redondeada o truncada (Figura 2); la parte posterior es agusada, se encuentra en ella el ano y un par de órganos sensoriales laterales, los fasmidos. Fig. 1

CONCLUSIÓN

En condiciones normales los nematodos bacteriófagos del suelo son abundantes y están presentes en diferentes ambientes pero al alterar el estado normal del suelo con la incorporación del contaminante en concentraciones de 7% las poblaciones se deprimen.

A medida que disminuye la concentración de hidrocarburo en los procesos de biorremediación, existe un crecimiento de colonias bacterianas, y también aumenta las poblaciones de nematodos bacteriófagos, comprobándose correlación entre estas variables.

Los nematodos bacteriófagos de acuerdo a los resultados obtenidos en laboratorio, son organismos que pueden asociarse a procesos de biomonitoreo y puede resultar de gran utilidad en evaluaciones de suelos contaminados dadas sus características de ensayos rápidos, simples y de bajo costo.

BIBLIOGRAFÍA

- Brussaard, L. et al. 1997. Biodiversity and Ecosystem Functioning in Soil. Ambio Vol. 26 Nº8. Suecia.
- Ercoli, et al. 2000. Biorremediación de suelos por técnica de acumulación aireada. 4º Jornadas de Preservación de agua, aire y suelo en la industria de petróleo y de gas, 3-6 Oct. Tomo II.
- Fraga Cesar P. 1968. Introducción a la Nematología Agrícola, Ed. Hemisferio Sur, Bs.As..
- Frioni, L. 1999. Procesos microbianos. Tomos I y II. Colecc. Manuales. Ed. De la Fundac. Universidad Nac. de Río Cuarto, Córdoba.
- Otero M, Torres N, Plaza G, Pérez Brandán C.. "Nematodos bacteriófagos como bioindicadores y como organismos asociados a los procesos de biorremediación". Averma, Vol. 6, ISSN 0329-5184. Año 2002.
- Plaza, G. et al. 2001. Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos. ASADES. Vol. 5.
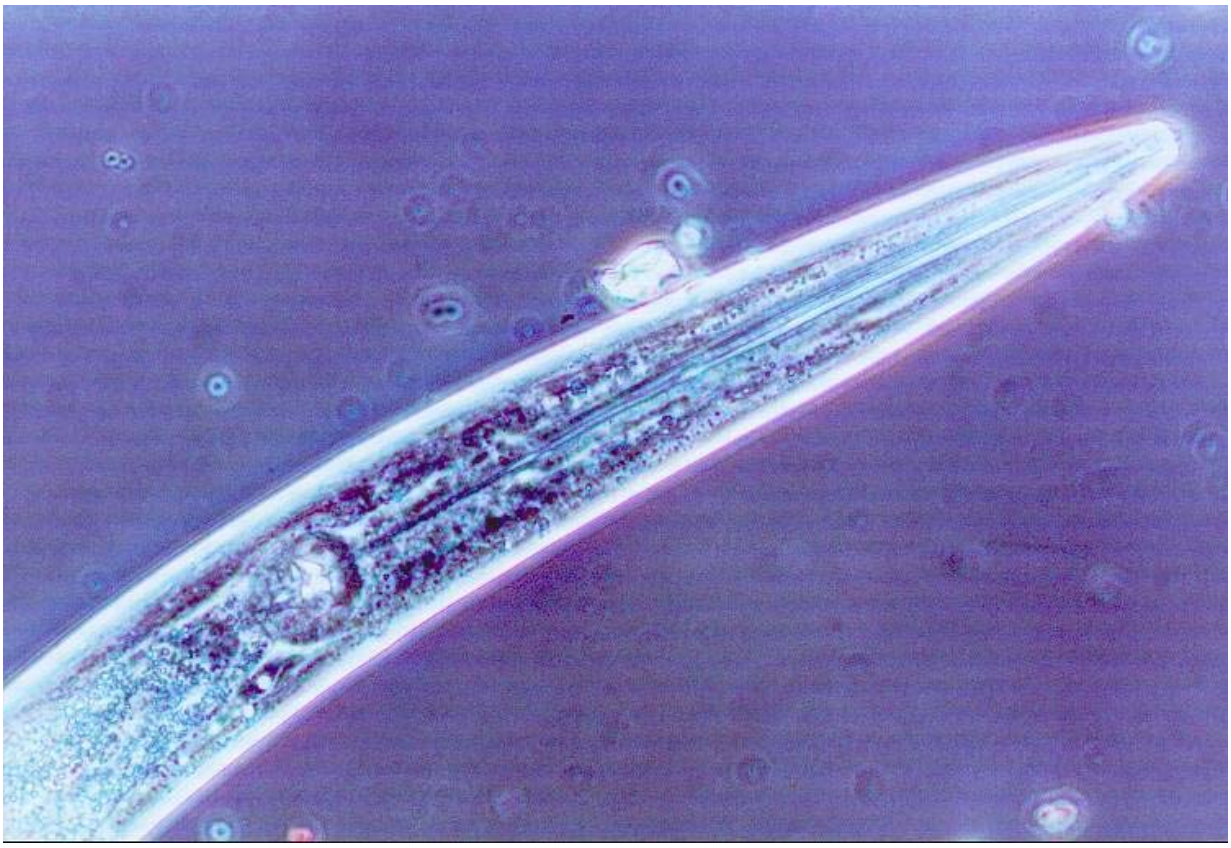
Figura 1: Parte anterior de nematodo bacteriófago del suelo.