

**EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN (BACTERIAS NATIVAS  
Y COMERCIALES) EN LA BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS EN SUELOS  
CONTAMINADOS**

**MAURICIO DUEÑAS CACUA  
LAURA ROCÍO SANTOS CASTRO**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2006**

**EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN (BACTERIAS NATIVAS  
Y COMERCIALES) EN LA BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS EN SUELOS  
CONTAMINADOS**

**MAURICIO DUEÑAS CACUA  
LAURA ROCIO SANTOS CASTRO**

**Proyecto de Grado para optar al título de Biólogo**

**Director  
Fabio Augusto Roldán García  
Ph.D. Ingeniería Civil y ambiental**

**Codirectora  
Mariela Carreño de Arango  
MSc. Microbiología Industrial**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2006**

*A Dios por su inspiración  
A la memoria de mi padre Luís, lo llevaré siempre en mi corazón  
A mi madre Rebeca, mi ejemplo a seguir  
A mi hermano Oscar por ayudarme a ser cada día mejor y por confiar en  
mí  
A Sandra, Adriana y Sergio mis entrañables hermanos  
A Mauricio por brindarme su amor*

*Laura Rocío*

*A Dios gracias por todas las bendiciones  
A mis padres Celia y Eduardo por el amor y la dedicación que me han  
entregado cada día de mi vida  
A mi hermana Martha Ligia por su confianza y apoyo incondicional  
A mis hermanos Fernando, Adriana y Olga Lucia con quienes he  
compartido los mejores momentos  
A Laura Rocío por su amor, paciencia y comprensión*

*Mauricio*

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de una tesis es una experiencia vital intensa, en la que se comparten momentos y vivencias con un gran número de personas, que directa o indirectamente participan en el trabajo realizado. Por lo tanto quisiéramos agradecer de una manera general a todas las personas e instituciones que intervinieron:

En primer lugar a las Universidades Industrial de Santander y Pontificia Universidad Javeriana por entregarnos el conocimiento necesario para afrontar los retos de la vida como grandes profesionales.

A Carboquímica S.A por brindarnos su confianza y respaldo económico. Por suministrarnos todos los materiales y equipos necesarios para desarrollar este proyecto y muy especialmente por hacernos parte de esta gran familia que nos ha enriquecido personal y profesionalmente. Gracias.

Especialmente al Vicepresidente de Operaciones Ing. Oscar Mauricio Santos Castro por confiar siempre en nosotros, su paciencia y creer que existen nuevos caminos para la ciencia. Por sus importantes y oportunos aportes y colaboración para realizar este trabajo.

A nuestro director Fabio Roldán por habernos brindado la oportunidad de realizar el proyecto y por contribuir con sus conocimientos en nuestra formación profesional.

A nuestra codirectora Mariela Carreño de Arango por quien descubrimos el gusto por la microbiología quien nos entregó mucho más que conocimientos y sobre todo por creer que podíamos hacer cosas grandes.

A los ingenieros Manuel Vargas y Roberto Saavedra del área ambiental de Carboquímica S.A por sus aportes y colaboración para realizar este trabajo.

A Martha Ligia Barrera por su entrañable amistad e inestimable ayuda, quien estuvo siempre dispuesta a escucharnos y apoyarnos en los momentos más difíciles. Gracias por los buenos momentos.

A Carolina Maldonado por compartir todos sus conocimientos y ser nuestra guía durante el desarrollo experimental y culminación del proyecto. Gracias por su inagotable paciencia y por brindarnos tranquilidad cuando más lo necesitábamos. No olvidaremos su cordial recibimiento el primer día en la USBA.

A las personas del departamento de investigación y desarrollo de Carboquímica S.A especialmente a Don Guillermo, Don Carlitos, Angélica Cortés, Hector Bejarano, Diego Santacruz, Jaime Martínez, Javier León y Alberto Monsalve. Gracias por todo.

Al profesor Julio Mario Hoyos por su valiosa orientación en un momento clave.

Un agradecimiento especial a todas las personas que conforman la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental USBA a quienes tuvimos la suerte de conocer, siempre dispuestas a colaborarnos, gracias por su acogida y hacernos sentir como uno más (Carolina Díaz, Adriana Guevara, Gina López, Claudia Palacios, Paola Bohórquez, Victoria Vallejo, Carolina Rubiano, Mónica Berdugo). A la señora Miriam por consentirnos cada mañana.

A Marcela Chaparro gracias por acogernos, por compartir su espacio y por su paciencia.

A nuestras familias gracias infinitas por su amor, apoyo y comprensión en los momentos difíciles. Los amamos.

Finalmente a nuestros compañeros y amigos de la UIS: Juan Pablo, Ariel, Silvia, Diana, Fabio, Luz Yaneth, Betsy Viviana y la señora Betsy con quienes compartimos momentos inolvidables.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>INTRODUCCION</b> .....	1
<b>1. MARCO TEORICO</b> .....	1
1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs).....	1
1.2 ALQUITRÁN DE HULLA .....	2
1.2.1 Obtención.....	3
1.2.2 Usos.....	4
1.2.3 Riesgos para la salud humana de los productos del alquitrán de hulla.	4
1.3 CREOSOTA DE ALQUITRÁN DE HULLA.....	5
1.3.1 Obtención de la creosota. ....	5
1.3.2 Usos.....	6
1.4 HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPH).....	8
1.5 BIORREMEDIACIÓN.....	9
1.6 TECNOLOGÍAS PARA TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS (HCs).....	10
1.6.1 Tratamientos <i>in situ</i> .....	10
1.6.2 Tratamientos <i>ex situ</i> .....	11
1.7 BIODEGRADACIÓN .....	12
1.7.1 Biodegradación de hidrocarburos alifáticos. ....	13
1.7.2 Biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos.....	14
1.7.3 Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	15
1.8 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA BIODEGRADACIÓN DE HCs	17
1.8.1 Nutrientes.....	17
1.8.2 Disponibilidad de agua.....	20
1.8.3 pH. ....	20
1.8.4 Temperatura. ....	21

1.8.5 Aceptores de electrones. ....	21
1.8.6 Densidad de microorganismos.....	22
1.8.7 Estructura del suelo. ....	22
1.8.8 Estructura de los contaminantes.....	23
1.9 TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN.....	24
1.9.1 Bioaumentación. ....	24
1.9.2 Bioestimulación.....	25
1.9.3 Biolabranza (lanfarming).....	26
<b>2. HIPOTESIS</b> .....	<b>28</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>29</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	29
<b>4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>30</b>
4.1 LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO .....	30
4.2 DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DEL SUELO .....	31
4.3 FASE DE LABORATORIO.....	33
4.3.1 Estandarización de técnicas. ....	34
4.3.1.1 Determinación de nutrientes. ....	34
4.3.1.2 Curva de calibración para nutrientes. ....	35
4.3.1.3 Análisis microbiológicos.....	35
4.3.1.3.1 Recuento de microorganismos heterótrofos. ....	35
4.3.1.3.2 Recuento de microorganismo degradadores de HCs por el número más probable (NMP).....	36
4.3.2 Aislamiento de bacterias nativas degradadoras.....	38
4.3.3 Identificación de bacterias nativas degradadoras. ....	39
4.3.4 Curva de crecimiento. ....	39
4.4 FASE DE CAMPO .....	40
4.4.1 Diseño experimental. ....	40
4.4.2 Elaboración de las unidades experimentales (UE). ....	40
4.4.3 Contaminación y mezcla del suelo.....	41

4.4.4 Descripción de los tratamientos. ....	42
4.4.4.1 Bioestimulación con adición de fertilizante inorgánico compuesto (FIC).....	43
4.4.4.2 Bioaumentación con adición bacterias nativas y FIC (BBN). ....	43
4.4.4.3 Bioaumentación con adición de bacterias comerciales y FIC (BBC). ....	44
4.5 PARAMETROS CONTROLADOS EN LOS TRATAMIENTOS .....	45
4.5.1 Aireación. ....	45
4.5.2 Disponibilidad de agua.....	45
4.6 MONITOREO DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN .....	45
4.6.1 Recolección de muestras.....	45
4.6.2 Análisis microbiológicos.....	46
4.6.3 Análisis fisicoquímicos. ....	46
4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	48
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
5.1 FASE DE LABORATORIO.....	49
5.1.1 Descripción y análisis preliminar del suelo.....	49
5.1.2 Estandarización de técnicas. ....	50
5.1.2.1 Determinación de nutrientes. ....	50
5.1.3 Aislamiento e identificación de bacterias nativas degradadoras. ....	52
5.1.4 Observación macroscópica y microscópica de las bacterias identificadas. ....	56
5.1.5 Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> .....	61
5.2 FASE DE CAMPO .....	63
5.2.1 Análisis de pH. ....	63
5.2.2 Análisis de humedad.....	66
5.2.3 Análisis de temperatura ambiental.....	69
5.2.4 Análisis de nutrientes. ....	71
5.2.4.1 Amonio.....	72
5.2.4.2 Nitrato. ....	74
5.2.4.3 Fósforo.....	76
5.2.5 Análisis microbiológicos .....	78

5.2.5.1 Recuento de microorganismos heterótrofos. ....	79
5.2.5.2 Recuento de microorganismos degradadores de HCs. ....	82
5.2.6 Análisis de TPH. ....	84
5.2.7 Producción de CO <sub>2</sub> . ....	95
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>99</b>
<b>7. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>100</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>101</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>114</b>

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades de los principales PAHs .....	2
Tabla 2. Principales hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) predominantes en la creosota de alquitrán. ....	7
Tabla 3. Principales compuestos fenólicos de la creosota de alquitrán. ....	7
Tabla 4. Ventajas y desventajas de las estrategias de biorremediación. ....	11
Tabla 5. Composición típica de una célula bacteriana .....	18
Tabla 6. Características fisicoquímicas y microbiológicas preliminares del suelo. ....	31
Tabla 7. Estándares utilizados para realizar las curvas de calibración. ....	34
Tabla 8. Controles utilizados en la técnica del NMP .....	37
Tabla 9. Descripción de los tratamientos elaborados .....	42
Tabla 10. Métodos fisicoquímicos realizados durante el estudio .....	47
Tabla 11. Características fisicoquímicas del suelo .....	50
Tabla 12. Valores obtenidos para las curvas de calibración de nutrientes. ..	52
Tabla 13. Especies bacterianas identificadas mediante BBL Crystal ®. ....	53
Tabla 14. Características ambientales de las cepas identificadas .....	53
Tabla 15. Características macroscópicas y microscópicas de los morfotipos de bacterias degradadoras aisladas .....	60
Tabla 16. Valores de pH obtenidos durante el estudio .....	64
Tabla 17. Porcentajes de humedad obtenidos durante el estudio .....	66
Tabla 18. Valores promedio de amonio ( $N-NH_4^+$ ) durante el estudio. ....	72
Tabla 19. Valores promedio de nitrato ( $N-NO_3^-$ ) durante el estudio .....	74
Tabla 20. Valores promedio de fósforo ( $P-PO_4$ ) durante el estudio. ....	77
Tabla 21. Recuento de heterótrofos (UFC/g <sub>ps</sub> ) durante el estudio .....	80
Tabla 22. Recuentos degradadores (NMP/g <sub>ps</sub> ) durante el estudio.....	82
Tabla 23. Concentración de TPH (mg/kg <sub>ps</sub> ) durante el estudio.....	85
Tabla 24. Porcentajes de remoción de TPH durante el estudio.....	85
Tabla 25. Valores promedio de producción de CO <sub>2</sub> durante el estudio.....	96

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Procesos para la obtención de alquitrán de hulla .....	4
Figura 2. Proceso de biodegradación realizado por los microorganismos....	12
Figura 3. Degradación aeróbica de HCs alifáticos .....	14
Figura 4. Principales rutas metabólicas utilizadas por microorganismos .....	17
Figura 5. Sorción del contaminante en las partículas del suelo .....	23
Figura 6. Esquema general del estudio durante la fase de laboratorio .....	32
Figura 7. Esquema general de trabajo para la fase de campo .....	33
Figura 8. Recuento de heterótrofos en agar infusión suelo. ....	36
Figura 9. Técnica de NMP para bacterias degradadoras de HCs.....	37
Figura 10. Aislamiento de bacterias degradadoras de HCs en agar BH.....	38
Figura 11. Prueba de identificación bioquímica BBL Crystal. ....	39
Figura 12. Parcelas utilizadas durante el estudio.....	41
Figura 13. Tamizado y homogenizado manual del suelo a contaminar .....	42
Figura 14. Proceso de contaminación y mezcla del suelo .....	42
Figura 15 y 16. Biorreactores para la bioaumentación del consorcio. Adición del consorcio de bacterias nativas .....	44
Figura 17. Aireación de los tratamientos de forma manual.....	45
Figura 18 y 19. Cuadrícula de muestreo. Recolección de muestras para análisis microbiológicos y fisicoquímicos .....	46
Figura 20 y 21. Montaje para medir la producción de CO <sub>2</sub> en cada parcela. ....	47
Figura 22. Curvas de calibración para nitrato (A), amonio (B), fósforo (C) ...	52
Figura 23. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica (100x) de <i>Pseudomonas putida</i> . ....	57
Figura 24. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica (100x) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	57
Figura 25. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica (100x) de <i>Acinetobacter iwoffii</i> .....	58

Figura 26. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica (100x) de <i>Chromobacterium violaceum</i> .....	58
Figura 27. Crecimiento macroscópico y morfología microscópica (100x) de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	59
Figura 28. Curva de crecimiento <i>Pseudomonas putida</i> (absorbancia vs. tiempo x 16h) .....	61
Figura 29. Curva de crecimiento <i>Pseudomonas putida</i> (recuento vs. Tiempo x 16 h).....	62
Figura 30. Fase exponencial de crecimiento para <i>Pseudomonas putida</i> .....	62
Figura 31. Valores de pH durante el estudio.....	64
Figura 32. Porcentajes de humedad durante el estudio.....	69
Figura 33. Valores de temperatura durante el estudio.....	70
Figura 34. Concentración de amonio (mgN-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> /kg <sub>ps</sub> ) durante el estudio ...	73
Figura 35. Concentración de nitrato (mgN-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /kg <sub>ps</sub> ) durante el estudio.....	76
Figura 36. Concentración de fósforo (mgP-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> /kg <sub>ps</sub> ) durante el estudio....	78
Figura 37. Densidad de microorganismos heterótrofos y degradadores.....	79
Figura 38. Recuento de microorganismos heterótrofos (UFC/g <sub>ps</sub> ) .....	81
Figura 39. Recuento de microorganismos degradadores de HCs (NMP/g <sub>ps</sub> )	83
Figura 40. Tasas de degradación de TPH (mgTPH/Kg <sub>ps</sub> /día) .....	91
Figura 41. Concentración de TPH (mgTPH/kg <sub>ps</sub> ).....	93
Figura 42. Producción de CO <sub>2</sub> durante el estudio .....	97

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Preparación de las soluciones estándar de nutrientes .....	115
ANEXO 2. Agua buferada.....	116
ANEXO 3. Agar infusión suelo.....	117
ANEXO 4. Ficha técnica del medio Bushnell-Haas (BH) (Sigma ®) .....	118
ANEXO 5. Preparación de Violeta de iodonitrotetrazolium (INT) (Sigma ®)	119
ANEXO 6. Ficha técnica BD sistema de identificación BBL CRYSTAL® ....	120
ANEXO 7. Cálculos para realizar la contaminación del suelo.....	122
ANEXO 8. Ficha técnica del fertilizante inorgánico compuesto (FIC) triple (Nutrimón®) .....	123
ANEXO 9. Ficha técnica del consorcio de bacterias comerciales RBC 109 (Interbio ®).....	124
ANEXO 10. Balance de masas C:N:P para la adición de FIC .....	125
ANEXO 11. Densidad bacteriana en el suelo después de la aplicación de RBC 109 (Interbio ®) .....	126
ANEXO 12. Determinación de nutrientes.....	127
ANEXO 13. Determinación de pH.....	129
ANEXO 14. Determinación de humedad por peso seco .....	130
ANEXO 15. Determinación de la producción de CO <sub>2</sub> .....	131
ANEXO 16. Perfiles bioquímicos de las especies aisladas según BBL CRYSTAL®.....	132

## RESUMEN

**TITULO: EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN (BACTERIAS NATIVAS Y COMERCIALES) EN LA BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS EN SUELOS CONTAMINADOS\***

**AUTORES: DUEÑAS CACUA, MAURICIO Y SANTOS CASTRO, LAURA ROCIO\*\***

**PALABRAS CLAVES:** biodegradación, biorremediación, bioestimulación, bioaumentación, alquitrán, TPH, creosota.

### **DESCRIPCION:**

La biorremediación se ha constituido en el proceso biológico más importante para el tratamiento de residuos orgánicos contaminantes. El objetivo del proyecto fue evaluar y comparar dos técnicas de biorremediación (Bioestimulación y Bioaumentación) en la degradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) en un suelo contaminado artificialmente con residuos de destilación de alquitrán (creosota).

El proyecto se realizó en dos fases (laboratorio y campo). En la fase de laboratorio se aislaron e identificaron las bacterias degradadoras del suelo y se desarrolló un consorcio de bacterias nativas degradadoras. Posteriormente en la fase de campo se realizó en parcelas como unidades experimentales (UE) durante 120 días. Se evaluaron 3 tratamientos: Bioestimulación adición de nutrientes (FIC), Bioaumentación adición consorcio de bacterias nativas (BBN) y Bioaumentación adición de consorcio de bacterias comerciales (BBC). Los tratamientos tuvieron adición de nutrientes, agua y aireación manual. El seguimiento del proceso de biorremediación se realizó mediante el monitoreo de parámetros fisicoquímicos (pH, humedad, CO<sub>2</sub>, TPH, amonio, nitrato, fósforo y temperatura ambiental) y microbiológicos (densidad de microorganismos heterótrofos y degradadores) durante 5 eventos de muestreo (EM) cada 30 días.

No hubo diferencias significativas de las variables analizadas entre los tratamientos analizados. No se presentaron diferencias significativas en la degradación de TPH entre los tratamientos (ANOVA  $p \leq 0.05$ ). La mayor degradación de TPH al final del estudio se presentó en BBC (48.6%), FIC (46.2%) y BBN (34.0%). No existió diferencia significativa entre bioaumentación y bioestimulación, ni entre los tratamientos de bioaumentación. Sin embargo FIC presentó la mayor tasa de degradación durante el estudio (51.25 mg/kg-d). BBN presentó una alta degradación durante los primeros treinta días (42.1%), mostrando que la bioaumentación con bacterias nativas es muy eficaz a corto plazo. La influencia de los nutrientes fue establecida hacia el final del estudio cuando sus bajos niveles causaron una disminución en la densidad de microorganismos heterótrofos y degradadores.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, UIS, Director: Fabio Roldán Ph.D. PUJ

## ABSTRACT

**TITTLE: BIOESTIMULATION AND BIOAUGMENTATION (NATIVES AND COMMERCIAL BACTERIA) EVALUATION IN THE BIODEGRADATION OF HYDROCARBONS CONTAMINATED SOILS\*.**

**AUTHORS: DUEÑAS CACUA, MAURICIO Y SANTOS CASTRO, LAURA ROCIO\*\***

**KEY WORDS:** biodegradation, bioremediation, biostimulation, bioaugmentation, TPH, coal tar, creosote.

### DESCRIPTION:

The bioremediation has been as the main biological process in the polluted residues treatment. The objective of this project was to evaluate two bioremediation techniques (biostimulation and bioaugmentation) in the degradation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in an artificial contaminated soil with some distillation byproducts of the coal tar (creosote).

This project was conducted in two phases (laboratory and field). In the laboratory phase the isolation, identification and the conformation of the consortia of degraders bacteria from the soil was carry on. In the field phase, a 8 boxes study was developed within 120 days with the evaluation of 3 treatments (biostimulation with addition of nutrients FIC, bioaugmentation addition of native hydrocarbon degrader microorganism consortia BBN and bioaugmentation addition of commercial bacteria consortia BBC). All the treatments had FIC, water, and manual aeration. The monitoring of the bioremediation process was made analyzing parameters physicochemical (pH, humidity, CO<sub>2</sub>, TPH, ammonia, nitrate, and phosphorus concentration) and microbiological (heterotrophs and hydrocarbons degrader counts) conditions. 5 sampling events were conducted (SE) every 30 days.

There were no significative differences between the evaluated treatments, but it was with CSC. There were significative differences between the TPH degradation and CSC (ANOVA  $p < 0.05$ ). The main degradation observed in the study was in BBC (48.6%), FIC (46.2%), BBN (34.0%) y CSC (19.48%). There were no significative differences between the treatments bioaugmentation and biostimulation, nor between the treatments of bioaugmentation. However, FIC showed the most important degradation rate during the time of study (51.25 mgTPH/Kg/d). BBN showed a high degradation during the first thirty days (42.1%), and show that the bioaugmentation with native bacteria is better.

---

\* Thesis Project.

\*\* Science Faculty, Biology School, UIS, Fabio Roldán Ph. D. Director. PUJ

## INTRODUCCION

El cierre de plantas de destilación de alquitrán debido a su insostenibilidad ambiental, la implementación de tecnologías más productivas y la creación de productos nuevos más favorables con el medio ambiente obligaron a las industrias químicas a almacenar algunos remanentes de producción en tambores y depósitos generando potenciales fuentes de contaminación.

Los remanentes de producción almacenados pueden contener compuestos orgánicos volátiles (COVs) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los cuales representan un riesgo para la salud y podrían llegar a afectar el estado natural del suelo, el agua o el aire por derrames accidentales o fugas en tanques originadas por la corrosión (Cerniglia, 1992; ATSDR, 2002).

El tratamiento de los residuos industriales puede realizarse a través del proceso de biorremediación, el cual busca optimizar las condiciones necesarias para incrementar la tasa de biodegradación intrínseca de un compuesto, disminuyendo el tiempo necesario para recuperar el área afectada (Alexander, 1999; Sylvia *et al.*, 1999). En la biorremediación es necesario la implementación de técnicas activas como: la biolabranza, el compostaje, las biopilas, los biorreactores, la bioestimulación y/o bioaumentación para optimizar el proceso de biodegradación (Rittman y McCarty, 2001; Vidali, 2001; Vallejo, 2004).

Estos procesos a pesar de haber sido estudiados a nivel mundial (Dibble y Bartha, 1979; Atlas, 1981; Song *et al.*, 1990; Mishra *et al.*, 2001; Atagana, 2004; Hejazi y Husain, 2004; Chaineau *et al.*, 2005; Viñas, 2005) no se conoce plenamente cual de las múltiples variables como pH, humedad, temperatura, aceptores de electrones, nutrientes, densidad de microorganismos, estructura del suelo, clima, tipo y concentración del contaminante y/o biodisponibilidad ejerce la mayor influencia sobre el proceso de degradación (Atlas, 1981).

Por todo lo anterior para la implementación de técnicas de biorremediación a menor escala (bioaumentación o bioestimulación) se requiere de una evaluación previa de dichas variables, las cuales deben ser monitoreadas durante un periodo de tiempo adecuado para lograr una aproximación al

proceso de degradación de hidrocarburos (HCs). Las técnicas de biorremediación que se evaluaron en el presente estudio contribuyeron con la industria química en la solución de la problemática de disposición y tratamiento de residuos contaminantes que pueden llegar a ser degradados por procesos biológicos menos costosos que los procesos químicos y físicos como la incineración. Los datos obtenidos le brindaron a la empresa la posibilidad de estandarizar este procedimiento, reduciendo de manera considerable los gastos operativos de un proyecto a gran escala.

La aplicación de esta tecnología por parte de la industria química es fundamental ya que la ubica como una empresa con buenas prácticas de manejo ambiental, cumpliendo con políticas internacionales de conservación de los recursos naturales. Igualmente es importante para toda la comunidad que habita en su área de influencia, puesto que contribuye al mejoramiento, protección de la salud y calidad de vida.

Por otra parte la información derivada de esta experiencia fue de gran valor para el ámbito investigativo, puesto que se obtuvieron nuevos datos sobre las limitantes (humedad, pH, densidad de microorganismos, concentración de TPH) del proceso de biorremediación. Además el proceso a escala piloto desarrollado puede ser aplicado a gran escala.

## 1. MARCO TEORICO

### 1.1 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (PAHs)

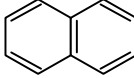
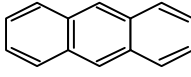
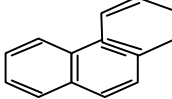
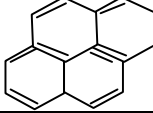
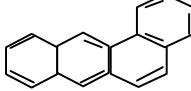
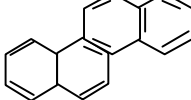
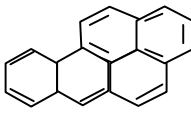
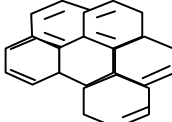
Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son moléculas que contienen tres o más anillos aromáticos de benceno fusionados en diferentes configuraciones estructurales (Lamar *et al.*, 2002). Son sólidos incoloros, blancos o amarillo-verde pálido (Straube *et al.*, 2003).

Los PAHs presentan una baja solubilidad en agua y elevada solubilidad en disolventes orgánicos (Blumer, 1976). Estos hidrocarburos contienen carbono y nitrógeno en su estructura, son compuestos orgánicos no polares, neutrales e hidrofóbicos, pueden ser lineales, angulares o agrupados (Cerniglia, 1992; Straube *et al.*, 2003).

Los PAHs son formados naturalmente durante la combustión incompleta de combustibles fósiles aunque de esta forma se generan en bajas concentraciones (Lamar *et al.*, 2002). Elevadas concentraciones de PAHs entran al ambiente principalmente por actividades antropogénicas en las emisiones de la combustión del carbón, producción de coque, plantas de destilación de alquitrán, creosota, refinamiento y derrames de petróleo, conservación de maderas, exhostos de automóviles, humo del tabaco y en desechos generados por las industrias, aunque unos pocos se usan en medicamentos o para fabricar tinturas y pesticidas (Schneider *et al.*, 2002; Mahadevan *et al.*, 2004).

Según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) existen 16 PAHs prioritarios clasificados como los principales contaminantes del ambiente y siete de ellos representan un riesgo potencial para la salud humana pues son cancerígenos (Amir *et al.*, 2005) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Propiedades de los principales PAHs.

Compuesto	Anillos	Formula y Peso molecular	Estructura	Solubilidad (mg/l a 25°C)
Naftaleno	2	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> (128)		31.7
Antraceno	3	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> (178)		0.045
Fenantreno	3	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> (178)		1.0
Pireno	4	C <sub>16</sub> H <sub>10</sub> (202)		0.132
Benzoantraceno	4	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> (228)		9.4E+03
Criseno	4	C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> (228)		1.8E+03
Benzo(a)pireno	5	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> (252)		1.2E+03
Benzo(g,h,i)perileno	6	C <sub>22</sub> H <sub>14</sub> (276)		0.7E+03

Fuente: Eweis *et al.*, 1999 y Amir *et al.*, 2005.

## 1.2 ALQUITRÁN DE HULLA

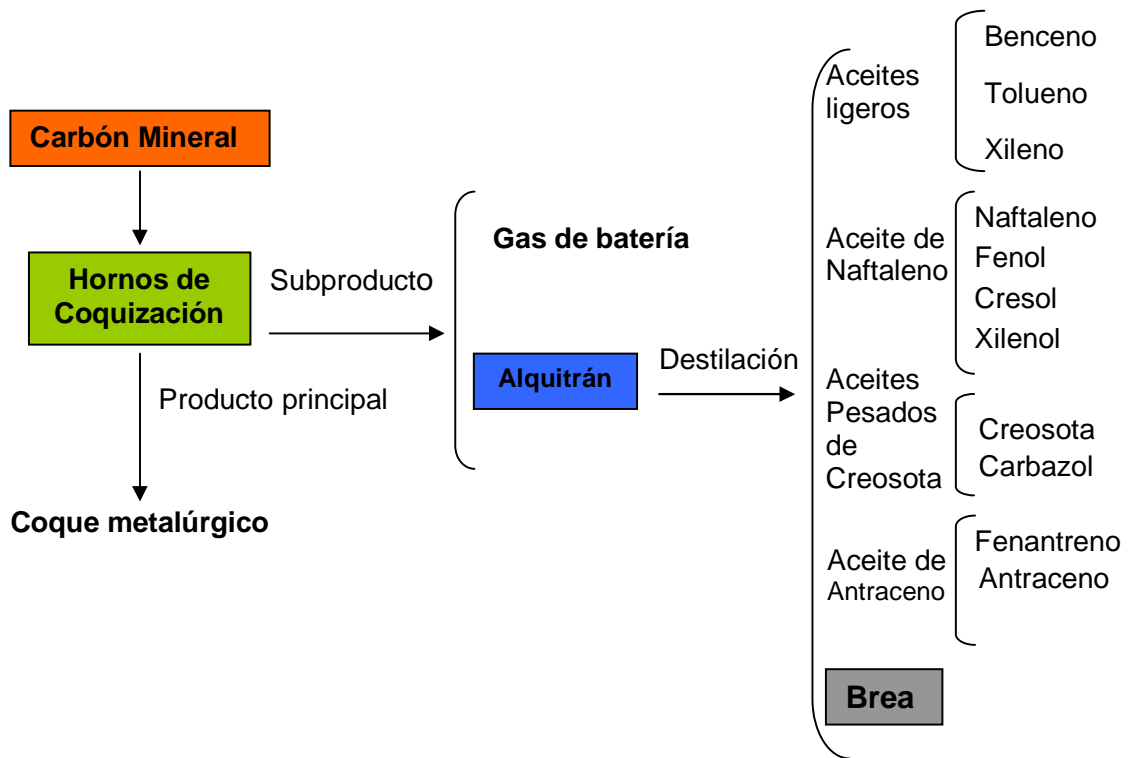
El alquitrán de hulla es un líquido aceitoso espeso de color pardusco o negro intenso, altamente incendiario, insoluble en agua y de olor característico debido a la presencia de hidrocarburos aromáticos (ATSDR, 2002).

### 1.2.1 Obtención.

El alquitrán es un producto secundario que se produce durante la obtención del coque metalúrgico y en la destilación seca del carbón mineral de hulla (Vega, 1986; Vecchioli *et al.*, 1997; Mahadevan *et al.*, 2004) (Figura 1). Las principales clases químicas obtenidas de esta destilación son los hidrocarburos aromáticos polinucleares homocíclicos (85% p/p), poliaromáticos heterocíclicos (3% p/p) y los fenoles (12% p/p) con varios grados de sustitución (Pollard *et al.*, 1994).

El alquitrán se puede obtener mediante la destilación de la hulla a bajas (300-400 °C) y a altas temperaturas (800-1500 °C). Los alquitranes obtenidos a altas temperaturas se generan por destilación destructiva y son los más importantes para la industria química por su carácter aromático (Vega, 1986). Durante este proceso se experimentan temperaturas superiores a 800 °C, generándose 5 fracciones importantes como son los aceites ligeros, aceites de naftaleno, aceites pesados o de creosota, aceites de antraceno y brea (Vega, 1986; Menéndez, 2004). Cada fracción se compone de compuestos diferentes como hidrocarburos aromáticos como benceno, tolueno, xileno (BTX); PAHs como naftaleno, antraceno, fenantreno, pireno, benzoantraceno, criseno y mezclas de varios PAHs como la creosota y el carbazol (Vecchioli *et al.*, 1997; Eweis *et al.*, 1999) (Figura 1).

Por otra lado el alquitrán obtenido a temperaturas relativamente bajas es una mezcla de hidrocarburos y fenoles con cantidades pequeñas de bases pirídicas, el cual contiene de un 30% a 35% p/p de hidrocarburos monoaromáticos, 30% p/p de fenoles, 40 a 50% p/p de hidrocarburos aromáticos y 26 a 30% p/p de brea (Pollard *et al.*, 1994).



**Figura 1.** Procesos para la obtención de alquitrán de hulla. Fuente: Menéndez, 2004.

### 1.2.2 Usos.

El alquitrán de hulla es usado principalmente como preservante para madera y como un plaguicida de uso restringido. Los productos del alquitrán se aplican como ingredientes en medicamentos para tratar enfermedades de la piel, como repelentes de aves y otros animales, insecticidas, soluciones para bañar animales y fungicidas. En la industria se utiliza en pavimentación de caminos, techado, fundición de aluminio, hierro y acero. En la manufactura de llantas se utiliza como materia prima para la elaboración del negro de humo, también es usado como diluyente del combustóleo (Pollard *et al.*, 1994; Eweis *et al.*, 1999).

### 1.2.3 Riesgos para la salud humana de los productos del alquitrán de hulla.

Los trabajadores en las industrias de asfalto, caucho, aluminio, hierro, acero y neumáticos y la gente que trabaja en industrias que producen coque, corren riesgo de exposición al respirar vapores o experimentar contacto directo de la piel con soluciones para preservar madera, con madera recién

tratada, con mezclas de asfalto o con otros productos en la industria de manufactura de coque (ATSDR, 2002).

Los compuestos generados por la destilación del alquitrán de hulla son principalmente PAHs los cuales son potentes carcinogénicos en mamíferos y están implicados en la inducción de tumores cancerosos en humanos (Hughes *et al.*, 1997; Lamar *et al.*, 2002; Mahadevan *et al.*, 2004). Estudios realizados por Culp y colaboradores, 1998 encontraron una alta incidencia en la aparición de tumores tipo sarcomas en pulmones, estomago e intestinos al alimentar ratones con mezclas de alquitrán y Benzo(a)pireno durante dos años.

Los compuestos del alquitrán de hulla pueden penetrar al cuerpo a través de la absorción en los pulmones, el estómago, los intestinos y la piel. La cantidad que ingresa al cuerpo depende de la manera en que se pone en contacto con estas sustancias (a través del aire, los alimentos, el agua y la piel), de la concentración a la que se está expuesto y de la duración de la exposición (ATSDR, 2002). Generalmente, los componentes individuales del alquitrán pueden bioacumularse en la grasa corporal, y en el cuerpo estos componentes pueden ser metabolizados. Por ejemplo, el pireno puede ser metabolizado a 1-hidroxipireno y abandonar el cuerpo principalmente en las heces y en menor cantidad por la orina (ATSDR, 2002; Schneider *et al.*, 2002).

### **1.3 CREOSOTA DE ALQUITRÁN DE HULLA**

La creosota es un producto líquido viscoso de textura aceitosa de color negro o pardo oscuro con olor a humo y con solubilidad muy escasa en agua. Compuesto por una mezcla compleja de 300 a 10.000 sustancias químicas principalmente hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) del tipo benzo(a)pireno considerado como cancerígeno (Tabla 1) (Vega, 1986).

#### **1.3.1 Obtención de la creosota.**

La creosota se produce al calentar el carbón a altas temperaturas (Figura 1) por procesos de destilación entre 200 y 400°C de alquitranes procedentes de la combustión (900 - 1200°C) de carbones grasos (hulla). Su composición química es compleja y esta formada por 300 a 10.000 componentes químicos diferentes, de los cuales un 85% son hidrocarburos aromáticos policíclicos de origen pirolítico de 2 hasta 5 anillos aromáticos (Tabla 2); un 10% son

compuestos fenólicos (Tabla 3) y un 5% son compuestos heterocíclicos (N-, S-, y O-) (Mueller *et al.*, 1989).

Es importante resaltar que gracias a que la creosota esta representada en su mayoría por PAHs de dos y tres anillos su biodegradación es facilitada y que además, los PAHs, al ser mayoritariamente de origen pirolítico, están mayormente representados por PAHs no metilados (Blumer, 1976; Mueller *et al.*, 1989).

Los compuestos fenólicos y algunos hidrocarburos heterocíclicos de la creosota presentan elevadas solubilidades (3 a 4 órdenes de magnitud superiores a los PAHs de 3 o más anillos) y por lo tanto pueden ser movilizados en las fases acuosas del suelo y, en consecuencia, pueden afectar sistemas acuosos colindantes a los suelos contaminantes (superficiales o subterráneos). De la misma forma los componentes más volátiles (PAHs de 2 anillos, compuestos fenólicos y heterocíclicos de bajo peso molecular) pueden disminuir paulatinamente del suelo pasando a la atmósfera (Viñas, 2005).

En consecuencia, los compuestos presentes en suelos contaminados con creosota pueden ser diferentes en función del tiempo transcurrido desde el episodio de contaminación. Así, un suelo con contaminación reciente de creosota se caracteriza por presentar compuestos contaminantes de 2 a 3 anillos aromáticos, mientras que en un suelo con contaminación de meses o años, puede presentar una proporción aún mayor en PAHs pesados (de tres o más anillos) y una menor proporción de compuestos fenólicos e hidrocarburos heterocíclicos (Tablas 2 y 3) (Mueller *et al.*, 1989; Viñas *et al.*, 2005).

### **1.3.2 Usos.**

La creosota se ha usado principalmente como preservativo de madera, en medicamentos, pesticidas, fungicidas, plaguicidas de uso restringido y como ingrediente para tratar enfermedades de la piel como la soriasis. Casi toda la creosota que se utiliza hoy en día es para conservar la madera que habitualmente se usa en traviesas de ferrocarril, puentes, postes de cercas, postes telefónicos y eléctricos. La creosota aumenta la durabilidad de la madera al impermeabilizarla y controlar los insectos, hongos y bacterias (Huston *et al.*, 2002).

**Tabla 2.** Principales hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) predominantes en la creosota de alquitrán.

Compuesto	Numero de anillos	Peso Molecular	Solubilidad (mg/L, 25 °C)
Naftaleno	2	128.2	31.7
2-metilnaftaleno	2	142.2	25.4
Fenantreno	3	178.2	1.3
Antraceno	3	178.2	0.07
Fluoreno	3	166.2	2.0
2,3 Dimetilnaftaleno	3	156.2	3.0
Acenafteno	3	154.2	3.9
Fluoranteno	4	202.3	0.26
Criseno	4	228.2	0.002
Pireno	6	202.3	0.14
Antraquinona	3	208.2	-
2-Metilantraceno	3	192.3	0.04
2,3-Benzo(b)fluoreno	4	216.3	0.002
Benzo(a)pireno	5	252.3	0.003

Fuente: Mueller *et al.*, 1989.

**Tabla 3.** Principales compuestos fenólicos de la creosota de alquitrán.

Compuesto	Peso molecular	Solubilidad (mg/L)
Fenol	94.1	82.000 (15 °C)
o-Cresol	108.1	25.920 (25 °C)
m-Cresol	108.1	23.500 (20 °C)
p-Cresol	108.1	24.000 (40 °C)
Pentaclorofenol	266.4	14 (20 °C)
2,5 Xilenol	122.2	3.544 (25 °C)

Fuente: Mueller *et al.*, 1989.

## 1.4 HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (TPH)

Los hidrocarburos totales de petróleo (TPH) son una mezcla de todos los hidrocarburos (HCs) presentes en el suelo y su medida puede ser usada para valorar el grado de contaminación y monitorear el proceso de biorremediación de gasolina, aceites, lubricantes, diesel, disolventes y demás contaminantes del ambiente (Khaitan *et al.*, 2001).

El análisis de TPH por si solo no identifica los compuestos o el riesgo asociado con los contaminantes, incluyendo su toxicidad, movilidad, contacto con el hombre y medio ambiente, ya que una concentración de TPH puede contener diferentes compuestos y por lo tanto constituir diferentes riesgos (Roberts, 2000). Por lo tanto la medición de TPH solo indica la variación en el tiempo de los hidrocarburos de petróleo en un área durante el proceso de biorremediación (EPA, 2000).

El análisis de TPH se puede realizar por medio de extracción por sonicación, desorción térmica, o por solventes orgánicos de diferentes polaridades dependiendo del grupo de contaminantes a analizar. La detección se hace por espectroscopia infrarrojo, cromatografía de gases (GC) con detector de llama ionizable (FID), detector fotoionizador (PID) o por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para medir la concentración de hidrocarburos totales en una muestra (MAPFRE, 1994).

El método gravimétrico 9071 (EPA, 1994) es un método simple, rápido y económico con el cual se cuantifica las concentraciones de TPH por medio de extracción por Soxhlet empleando solventes como hexano, diclorometano o acetona y luego se realiza el análisis gravimétrico para determinar la concentración de TPH ( $\text{mgTPH}/\text{kg}_{\text{ps}}$ ) presente en una muestra.

La espectrofotometría y las técnicas gravimétricas son las más económicas, rápidas y simples, y esta ultima es la más frecuentemente utilizada para el análisis de TPH en lodos aceitosos. Los resultados son reportados simplemente como concentración de TPH de la sustancia presente (ASTM, 1996; Rittman y McCarty, 2001).

## 1.5 BIORREMEDIACIÓN

En diferentes lugares contaminados con residuos químicos se ha demostrado que la naturaleza puede mitigar los daños ambientales empleando para ello su capacidad de recuperación si tiene las condiciones ambientales adecuadas para transformarlos (EPA, 1999). Sin embargo, se ha comprobado que se pueden lograr importantes reducciones de estos compuestos en el ambiente mejorando las condiciones naturales para favorecer la actividad de los microorganismos nativos por medio de la biorremediación (Atlas, 1981; Margesin y Schinner, 2001; Margesin *et al.*, 2003; Juhasz *et al.*, 2005a).

La biorremediación se define como un proceso natural, a lo largo del cual distintos microorganismos (bacterias y hongos) o plantas son capaces de metabolizar diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos de un determinado medio (Ordoñez, 1995; Margesin y Schinner, 2001).

Para aumentar las tasas de biorremediación de un contaminante se deben tener en cuenta varios factores medio ambientales así como las interacciones que entre ellos se dan. Estos son el número y tipo de microorganismos degradadores presentes capaces de metabolizar un compuesto particular (Eweis *et al.*, 1999; Margesin y Schinner, 2001), concentración de nutrientes (nitrógeno y fósforo), aceptores de electrones (oxígeno y nitrato), pH entre 6 y 8, porcentaje de humedad (50-75% de la capacidad de campo), temperatura y las características físicas y químicas de los hidrocarburos a biodegradar (Atlas, 1988; Eweis *et al.*, 1999; Roberts, 2000).

La biorremediación completa es un proceso ventajoso porque los residuos generados por el tratamiento son inocuos (agua, biomasa celular, CO<sub>2</sub> o CH<sub>4</sub>), no se genera transferencia de contaminantes de un sitio a otro, se puede llevar a cabo *in situ* o *ex situ* y esta técnica es la menos costosa dentro de las demás tecnologías para la limpieza de desechos peligrosos (Mishra *et al.*, 2001; Vidali, 2001).

Por otra parte la biorremediación es desventajosa porque algunas veces se da un cambio en la estructura molecular del contaminante y da lugar a diferentes compuestos que pueden ser más tóxicos y peligrosos por estar más oxidados y ser menos volátiles que el compuesto inicial (Roberts, 2000). Además es un proceso lento que puede tomar varios meses para llegar a la mineralización del contaminante, sin embargo si se suministran las

condiciones necesarias para aumentar la actividad bacteriana el proceso puede desarrollarse rápidamente (Levin y Gealt, 1997; Rittman y McCarty, 2001).

## **1.6 TECNOLOGÍAS PARA TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS (HCs)**

Actualmente existen varias tecnologías disponibles para tratar suelos contaminados con HCs. Se destacan los tratamientos físicos, químicos y biológicos los cuales pueden ser *in situ* o *ex situ* (Tabla 4) (Blackburn y Hafker, 1993; Roberts, 2000; Rittman y McCarty, 2001; Vidali, 200; Marin *et al.*, 2005).

Para el diseño correcto de un sistema de tratamiento hay que conocer las características del suelo como su hidrogeología, la capacidad de intercambio de cationes, composición aniónica y catiónica, composición de nutrientes, naturaleza del contaminante, así como su persistencia y potencial para expandirse en el medio ambiente, los microorganismos nativos de la zona, costos y el tiempo disponible para llevar a cabo la biorremediación (Caplan, 1993; Levin y Gealt, 1997; Roberts, 2000).

### **1.6.1 Tratamientos *in situ*.**

Los tratamientos *in situ* se realizan en el mismo sitio donde se presenta el impacto (MAPFRE, 1994; Roberts, 2000), con el fin de evitar movilizar los contaminantes, cuando las áreas afectadas son de difícil acceso y los compuestos que se encuentran en zonas muy profundas (Levin y Gealt, 1997).

Este tipo de tratamiento presenta varias ventajas tales como bajo impacto ambiental y costos relativamente bajos, aunque es limitado por la profundidad de suelo que puede ser efectivamente tratado (Eweis *et al.*, 1999; Vidali, 2001). Estos tratamientos usan métodos biológicos, químicos y físicos para degradar, extraer o inmovilizar los contaminantes. Incluyen el bioventeo, bioestimulación, bioaumentación, inyección de aire, bioasperción, neutralización, solidificación/estabilización y oxidación los cuales pueden ser usados de manera combinada (Tabla 4) (MAPFRE, 1994; Pollard *et al.*, 1994; Roberts, 2000; Vidali, 2001).

### 1.6.2 Tratamientos *ex situ*.

Los tratamientos *ex situ* involucran la excavación o remoción del suelo contaminado hacia otros sitios donde se llevará a cabo el tratamiento (Rittman y McCarty, 2001). Son más efectivos ya que no dependen de factores externos como la hidrología o la temperatura, su inconveniente es que pueden generar (VOCs), limitaciones de biodisponibilidad, altos costos de operación y limitaciones de espacio para tratar grandes volúmenes de suelo (Blackburn y Hafker, 1993; MAPFRE, 1994; Marin *et al.*, 2005).

El tratamiento consiste en excavar el suelo y disponerlo en lechos de tratamiento y una vez procesado puede ser retornado al sitio de excavación (Eweis *et al.*, 1999). Los tratamientos *ex situ* incluyen métodos físicos (tratamiento térmico, incineración, volatilización, lavado del suelo entre otros), químicos (encapsulamiento, oxidación fotoquímica, extracción con solventes, absorción con carbón etc.) y biológicos (*landfarming* (biolabranza), biorreactores, compostaje, biopilas etc.) (Eweis *et al.*, 1999; Pollard *et al.*, 1994; MAPFRE, 1994; Roberts, 2000; Vidali, 2001) (Tabla 4).

**Tabla 4.** Ventajas y desventajas de las estrategias de biorremediación.

	Ejemplos	Ventajas	Desventajas	Factores a considerar
<i>In situ</i>	-Bioestimulación -Bioasperción -Bioventeo -Bioaumentación	-Bajo costo, aunque algunas como el bioventeo son de mayor costo -No invasiva -Relativamente pasiva -Procesos de atenuación natural	-Limitaciones ambientales -Largo tiempo de tratamiento	-Biodegradación realizada por bacterias nativas -Parámetros ambientales -Factores geológicos -Distribución de contaminantes
<i>Ex situ</i>	-Biolabranza -Compostaje -Biopilas	-No depende de factores climáticos. -Las variables que controlan el proceso pueden controlarse con más precisión.	-Requerimientos de espacio -Largo tiempo de tratamiento -Necesidad de controles abióticos -Limitaciones de biodisponibilidad	Ver arriba

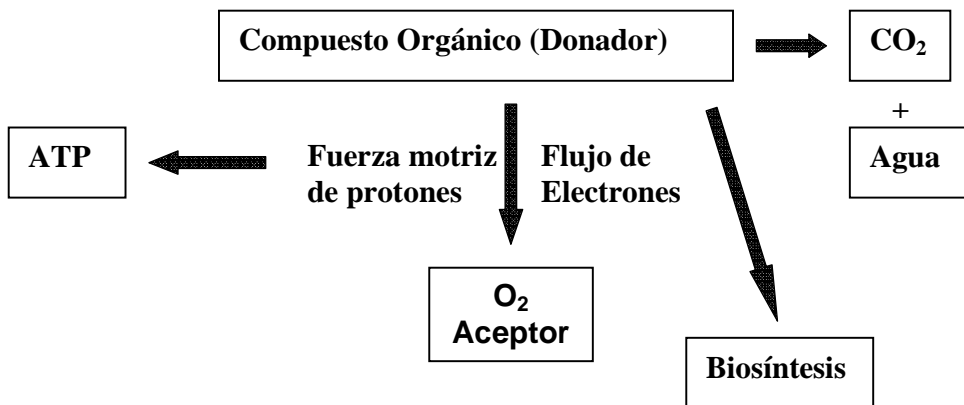
Fuente: Vidali, 2001.

## 1.7 BIODEGRADACIÓN

La biodegradación es un proceso en el cual los microorganismos transforman compuestos orgánicos (Hidrocarburos) e inorgánicos al utilizarlos como fuente de carbono, energía y como aceptores o donadores de electrones generando biomasa, agua, CO<sub>2</sub> o CH<sub>4</sub> (Dibble y Bartha, 1979; Margesin y Schinner, 1999b; Margesin *et al.*, 2003).

Los microorganismos logran metabolizar diferentes compuestos llevando a cabo reacciones de oxidación-reducción, procesos de absorción e intercambio de iones y formación de complejos que dan lugar a fijación de metales (Madigan *et al.*, 1998; Eweis *et al.*, 1999; Rittman y McCarty, 2001).

En la biodegradación se generan una serie de reacciones de transformación en las cuales se separan los electrones del compuesto y se oxida la estructura del carbono, la energía que se genera en forma de ATP es utilizada por las bacterias para la producción de biomasa, transporte de compuestos al interior de la célula y movimiento. Al final se produce CO<sub>2</sub> y agua proceso denominado mineralización (MAPFRE, 1994; Eweis *et al.*, 1999) (Figura 2).



**Figura 2.** Proceso de biodegradación realizado por los microorganismos.  
Fuente: Modificado de Madigan *et al.*, 1998.

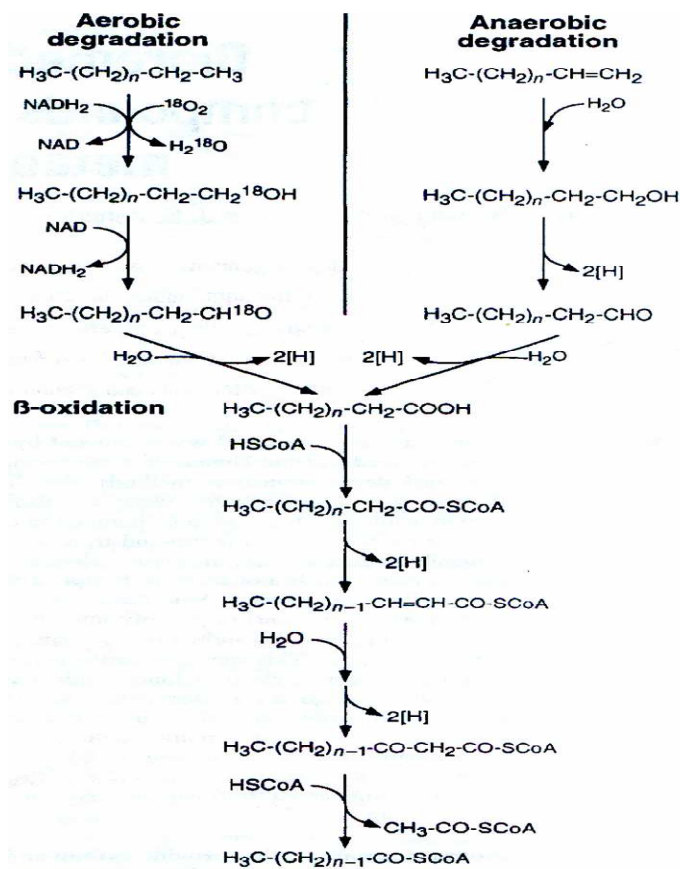
En la biodegradación no siempre el resultado es la mineralización, cuando sucede esto se da un cambio en la estructura molecular del contaminante y da lugar a diferentes compuestos que pueden ser más tóxicos y peligrosos por estar más oxidados que el compuesto inicial (Jimenez y Bartha, 1996; Roberts, 2000).

La tasa de biodegradación aeróbica depende de: a) la complejidad del contaminante por ejemplo hidrocarburos grandes y muy ramificados o que contienen muchos anillos aromáticos son difíciles de degradar, b) la biodisponibilidad, la diversidad de microorganismos, la estructura del suelo y disponibilidad de nutrientes (Heitzer y Saylor, 1993). La mayoría de los hidrocarburos son degradados fácilmente cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones mediante las enzimas oxigenasas, los microorganismos que utilizan esta vía metabólica son más eficientes para eliminar los compuestos del ambiente (Madigan *et al.*, 1998; Roberts, 2000; Rittman y McCarty, 2001).

#### **1.7.1 Biodegradación de hidrocarburos alifáticos.**

Los HCs alifáticos poseen diferentes configuraciones y se dividen en alcanos, alquenos y cicloalcanos, tienen enlaces sencillos carbono-carbono y no contienen enlaces covalentes múltiples (Eweis *et al.*, 1999). Los alcanos son degradados por la conversión de su cadena hasta ácido graso. En presencia de oxígeno el alcano es atacado por una monooxigenasa, introduciendo un átomo de oxígeno molecular en su estructura formando un alcohol graso, este alcohol es oxidado a aldehído y finalmente a ácido graso, el cual es oxidado en la  $\beta$ -oxidación transformándose en acetil coA formando agua y CO<sub>2</sub> a través del ciclo de Krebs (Bouwer y Zehnder., 1993; Whyte *et al.*, 1997) (Figura 3).

Los alquenos y cicloalcanos son degradados aeróbicamente por mecanismos similares a la degradación de los alcanos, aunque debido a los enlaces dobles y triples de su estructura que son químicamente más reactivos, se utilizan reacciones adicionales como la epoxidación o hidratación (Caplan, 1993).



**Figura 3.** Degradación aeróbica de HC's alifáticos hasta ácidos carboxílicos. Fuente: Bouwer y Zehner., 1993.

### 1.7.2 Biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos.

Los HC's monoaromáticos son degradados inicialmente mediante una transformación enzimática de los compuestos contaminantes lo cual es referido como una biodegradación primaria (Rittman y McCarty, 2001). En la biodegradación aerobia y anaerobia de compuestos aromáticos se llevan a cabo 4 fases (Atlas, 1988; Eweis *et al.*, 1999; Roberts, 2000).

- Entrada en la célula, lo cual se da por difusión libre o por mecanismos específicos de transporte.
- Activación del anillo aromático, mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno molecular dentro del anillo por medio de las dioxigenasas formando un dihidrodiol.

- Ruptura del anillo, los dihidrodioles son oxidados hasta intermediarios como el catecol los cuales son los encargados de la ruptura del anillo aromático.
- Aprovechamiento de los productos, el catecol es oxidado por vía orto, esta vía sigue una serie de reacciones enzimáticas con el fin de producir ácidos orgánicos de bajo peso molecular y aldehídos que son incorporados por la célula al ciclo de los ácidos tricarbóxicos.

### **1.7.3 Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos.**

Muchos PAHs están sujetos a la degradación bacteriana la cual se puede dar bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas (Cerniglia, 1992; Boldrin *et al.*, 1993; Stringfellow y Aitken, 1995; Jiménez y Bartha, 1996; Daane *et al.*, 2001; Margesin y Schinner, 2001; Sudip *et al.*, 2002; Margesin *et al.*, 2003; Straube *et al.*, 2003; Sarma *et al.*, 2004).

La capacidad de los microorganismos para degradar diversas clases de PAHs esta limitada por diversos factores ambientales como la fuerte adsorción de los componentes a las superficies del suelo (materia orgánica), formación de fases no acuosas (las cuales son fluidos insolubles en agua que migran a través de la capa bajo la superficie como una fase distinta), su baja solubilidad, su baja biodisponibilidad y niveles altos de co-contaminación como es el caso del pentaclorofenol (PCP) que puede inhibir la biodegradación de los PAHs, todos estos factores contribuyen a la persistencia de los PAHs en el ambiente (Stapleton *et al.*, 1998; Kanaly y Harayama, 2000; Sudip *et al.*, 2002; Straube *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2005; Sabaté *et al.*, 2005).

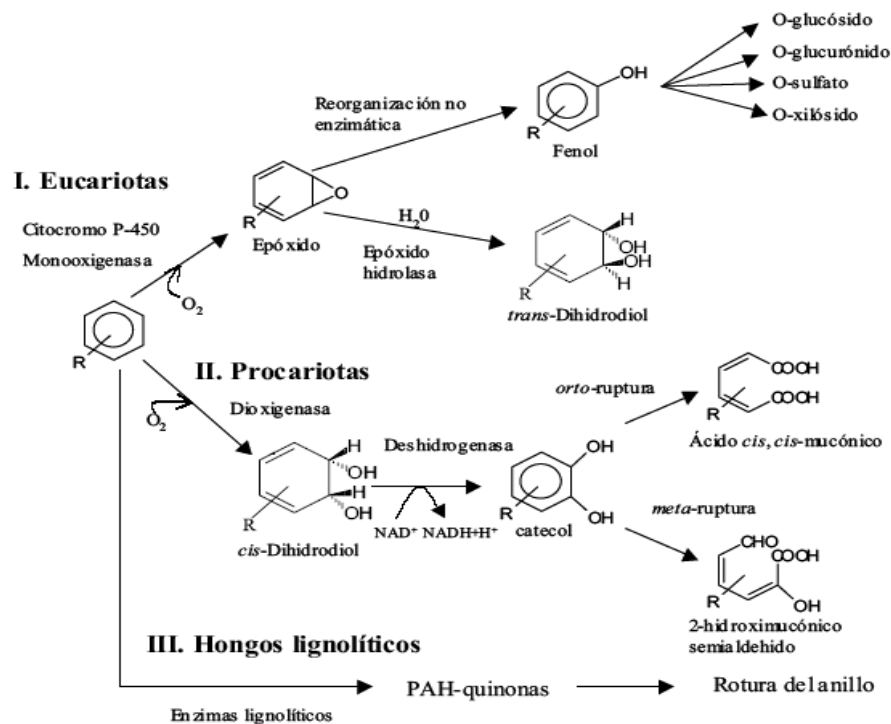
A pesar de estas características gran variedad de microorganismos pueden llegar a degradar PAHs, como bacterias del género *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp, *Micrococcus* sp, *Vibrio* sp, *Acinetobacter* sp, *Alcaligenes* sp, *Sphingomonas* sp, *Rhodococcus* sp y *Mycobacterium* sp y especies de hongos como *Phanaerochaete chrysosporium*, *Pleurotas ostreatus*, *Agaricus bisporus*, *Lentinulus edodes* los cuales tienen la capacidad enzimática para oxidar los PAHs desde el naftaleno hasta el benzo(a)pireno (Schneider *et al.*, 1996; Eggen, 1999; Lamar *et al.*, 2002; Kanaly y Harayama, 2000; Sudip *et al.*, 2002; Straube *et al.*, 2003; Juhasz *et al.*, 2005b; Marin *et al.*, 2005; Sabaté *et al.*, 2005).

La biodegradación de los PAHs tiende a disminuir con el aumento en el número de anillos y con el número de sustituyentes alquilo. Estos se degradan anillo por anillo por mecanismos similares a los que se utilizan para los compuestos monoaromáticos al utilizar dioxigenasas incorporando dos átomos de oxígeno en el sustrato formando dioxetanos los cuales son oxidados a *cis*-dihidrodiol y por último forman dihidroxidos (Eweis *et al.*, 1999; Roberts, 2000; Rittman y McCarty, 2001) (Figura 4).

En la presencia del microorganismo apropiado la biodegradación de los PAHs de bajo peso molecular como el naftaleno (PM= 128) ocurre bajo la acción de las enzimas bacterianas requeridas. Los compuestos de 3 anillos condensados y de mayor peso molecular como el acenafteno (PM=154.2), antraceno (PM=178.2) y fenantreno (PM=178.2) son mucho más resistentes al ataque microbiano, los que tienen 4 o más anillos bencénicos fusionados se cree que son biodegradados mediante cometabolismo (Levin y Gealt, 1997; Boonchan *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2005).

En el cometabolismo los microorganismos transforman un compuesto orgánico, pero el organismo no puede crecer a partir del contaminante y no obtiene energía, carbono u otros nutrientes de la transformación (Eweis *et al.*, 1999).

Los compuestos degradados por cometabolismo son inicialmente resistentes a la degradación por su complejidad y baja solubilidad como el benzo(a)pireno y benzoantraceno (Atlas, 1991). Los compuestos recalcitrantes como asfaltos y resinas poseen una estructura compleja de anillos aromáticos, nitrógeno, azufre y oxígeno en su estructura por lo cual son resistentes al ataque bacteriano (Atlas, 1988).



**Figura 4.** Principales rutas metabólicas utilizadas por microorganismos para la oxidación de PAHs. Fuente: Viñas, 2005.

## 1.8 FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA BIODEGRADACIÓN DE HCs

### 1.8.1 Nutrientes.

Los requerimientos de nutrientes para los microorganismos son aproximadamente los mismos que la composición de sus células, excepto para el carbono el cual es necesario en altas cantidades y es suministrado directamente por el contaminante (Atlas, 1981; Liebeg y Cutright, 1999).

Los elementos principales y que se encuentran en mayor proporción en las células vivas son los macronutrientes. Basándose en su masa son el carbono, oxígeno, nitrógeno, hidrógeno, fósforo y azufre. Los metales o micronutrientes como hierro, manganeso, potasio, cobalto, calcio, cobre y zinc son esenciales porque sirven como cofactores para el transporte de electrones que se lleva a cabo en reacciones específicas catalizadas por enzimas y estos son necesarios en pequeñas cantidades (Roberts, 2000; Mishra *et al.*, 2001; Vidali, 2001) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Composición típica de una célula bacteriana en porcentaje de peso.

Elemento	% Peso seco	Función
<b>Carbono</b>	50	Componente de materiales orgánicos celulares.
<b>Oxígeno</b>	20	Componente de materiales orgánicos celulares y agua celular.
<b>Nitrógeno</b>	14	Componente de proteínas, ácidos nucleicos y coenzimas.
<b>Hidrógeno</b>	8	Componente de agua celular y materiales orgánicos celulares.
<b>Fósforo</b>	3	Componente de ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas.
<b>Azufre</b>	1	Componente de proteínas y coenzimas.
<b>Potasio</b>	1	Catión mayoritario en procesos celulares.
<b>Sodio</b>	1	Catión mayoritario en procesos celulares.
<b>Calcio</b>	0.5	Catión mayoritario en procesos celulares y enzima cofactor.
<b>Magnesio</b>	0.5	Catión mayoritario en procesos celulares, cofactor en reacciones de ATP.

Fuente: Eweis *et al.*, 1999.

Los nutrientes son asimilados por los microorganismos en un número limitado de formas orgánicas e inorgánicas del ambiente (Levin y Gealt., 1997). Las formas más comunes para producir la degradación de compuestos peligrosos y producir biomasa son los macronutrientes y en menor cantidad los micronutrientes (Roberts, 2000).

Generalmente en suelos contaminados o cuando sucede un derrame de HCs se genera un desbalance del nitrógeno y fósforo del suelo, disminuyendo las concentraciones de nutrientes, lo cual disminuye la velocidad de degradación microbiana de HCs (Dibble y Bartha, 1979; Vidali, 2001). Para los procesos de biorremediación y para compensar la ausencia de estos nutrientes es necesario la adición de nutrientes orgánicos en forma de estiércol, compost o lodos residuales, o inorgánicos como fertilizantes químicos comerciales (Hueseman y Moore., 1993).

Los fertilizantes orgánicos contienen diferentes concentraciones de nutrientes, por ejemplo el estiércol de caballo tiene una composición aproximada de 6%, 2.5% y 6% para C, N y P respectivamente. Estos ayudan a la formación de humus favoreciendo la aireación del suelo, facilitan el intercambio iónico, mejoran la circulación y retención de agua y ejercen una

regulación térmica del suelo todo para estimular la actividad microbiana en el suelo (Guri, 1998).

Los fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC) o fertilizantes químicos comerciales contienen un balance de nitrógeno, fósforo y potasio en formas fácilmente disponibles para los microorganismos, algunas veces estos fertilizantes llevan algunos microelementos necesarios para el metabolismo microbiano (Roberts, 2000). Generalmente son formulados en una proporción N:P:K 15:15:15 donde 15% es nitrógeno total (3.1% de nitrógeno amoniacal y 11.96% de nitrógeno orgánico), 15% de fósforo asimilable ( $P_2O_5$ ) y 15% de potasio soluble ( $K_2O$ ) (Bem Systems, 1998; Guri, 1998).

El nitrógeno y el fósforo son los nutrientes mas adicionados en los procesos de biorremediación porque son usados principalmente para la producción de biomasa y pueden ser aplicados como FIC (fertilizantes inorgánicos compuestos) o SIS (sales inorgánicas simples). El nitrógeno es agregado generalmente en forma de  $NH_4^+$  y cuando está presente en forma de  $NO_3^-$  también es utilizado por las bacterias como aceptor de electrones. La fuente de nitrógeno puede ser aplicada en forma de urea, cloruro de amonio o nitrato de amonio todas formas asimilables para los microorganismos. El fósforo se adiciona como fosfato de potasio, fosfato de sodio o sales ortofosfóricas y polifosfatos (Dibble y Bartha, 1979; Liebeg y Cutright, 1999; Roberts, 2000; Castro *et al.*, 2004; Simon *et al.*, 2004).

La proporción recomendada de aplicación de nutrientes en los procesos de biorremediación ya sea en laboratorio o en campo es la relación C:N:P 100:10:1. Esta relación ha sido reportada como adecuada en varios trabajos de biorremediación (Dibble y Bartha., 1979; Atlas, 1988; Atlas, 1991; Margesin y Schinner, 1997b; Liebeg y Cutright, 1999; Margesin y Schinner, 1999b; Margesin y Schinner, 2001; Mishra *et al.*, 2001; Castro *et al.*, 2004).

Sin embargo la adición excesiva de nutrientes puede generar toxicidad, incremento de costos, aumento de salinidad y presión osmótica del suelo. Si el suelo necesita altas concentraciones, la adición de nutrientes se debe realizar en pasos, en lugar de una sola aplicación al comienzo del tratamiento, el uso de fertilizantes granulados puede ser una buena alternativa porque asegura un aporte constante de nutrientes en el tiempo (Eweis *et al.*, 1999).

### **1.8.2 Disponibilidad de agua.**

Para los procesos de biorremediación es necesario que para los microorganismos del suelo exista una buena disponibilidad de agua, pues esta determina la disponibilidad de oxígeno, el potencial redox, la toma adecuada de los nutrientes y la actividad microbiana del sistema del suelo (Levin y Gealt, 1997; Roberts, 2000). El agua es el medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos contaminantes, nutrientes y productos metabolizados van al interior o al exterior de la célula (Rittman y McCarty, 2001).

Cuando en el suelo existe poca humedad se dan zonas secas disminuyendo la actividad de los microorganismos, por el contrario cuando hay exceso de humedad se inhibe el intercambio de gases, se forman zonas anaerobias y se da la eliminación de las bacterias aerobias (Bouwer y Zehnder, 1993; Eweis *et al.*, 1999; Madigan *et al.*, 1998).

El contenido óptimo de agua en los procesos de biorremediación se mide con relación a la capacidad de campo del suelo, la cual se define como la humedad del suelo después que este se ha saturado con agua y dejado drenar libremente durante 24 horas (Eweis *et al.*, 1999). La capacidad de campo de los suelos varían de acuerdo a su textura, por ejemplo los suelos arenosos tendrán una capacidad de campo aproximada del 5% y un suelo arcilloso un 30%, en general el contenido óptimo de humedad para la biodegradación aerobia de hidrocarburos puede estar en un rango de 50 al 75% de la capacidad de campo y de 25 al 28% para la actividad microbiana (Dibble y Bartha, 1979; Leahy y Colwell, 1990; Levin y Gealt, 1997; Eweis *et al.*, 1999; Roberts, 2000; Vidali, 2001).

### **1.8.3 pH.**

La actividad biológica del suelo es afectada significativamente por el pH, pues sus variaciones pueden disminuir la solubilidad y disponibilidad de macro y micronutrientes, así como la movilidad de los contaminantes (Leahy y Colwell, 1990; Roberts, 2000). El crecimiento de muchos microorganismos es máximo en valores de pH entre 6.5 y 8.5, muchas bacterias y actinomicetos tienen un pH óptimo de 7 y algunos hongos crecen en pH menores de 5 (Heitzer y Sayler, 1993; Ordóñez, 1995).

La contaminación por hidrocarburos puede cambiar el pH del suelo durante los procesos de biorremediación, generando condiciones muy ácidas o alcalinas e inhibiendo la actividad biológica del suelo. Cuando esto sucede se debe ajustar el pH, adicionando compuestos que contengan calcio,

calcio/magnesio o acidificando añadiendo azufre elemental o compuestos que contenga azufre (Dibble y Bartha, 1979; Roberts, 2000).

#### **1.8.4 Temperatura.**

La temperatura en el suelo es uno de los factores más importantes que controlan la actividad microbiológica y las tasas de biodegradación de compuestos (Atlas, 1981; EPA, 2000). La temperatura afecta la naturaleza física y la composición de los contaminantes aumentando o disminuyendo su viscosidad, solubilidad y volatilización (Roberts, 2000; Rittman y McCarty, 2001).

Se ha reportado que la temperatura óptima para la biodegradación de hidrocarburos en diferentes ambientes es de 20 °C o superior a 60°C (Dibble y Bartha, 1979; Leahy y Colwell, 1990). A temperaturas superiores a 40 °C la biodegradación se reduce porque se da la desnaturalización de enzimas y proteínas y muchas poblaciones microbianas mueren. Por el contrario a temperaturas aproximadas de 0 °C los hidrocarburos son degradados de forma más lenta y los microorganismos se encapsulan hasta que se da un cambio de temperatura (Eweis *et al.*, 1999). Según Margesin y Schinner (1997b) después de 20 días de tratamiento a 10 °C encontraron una reducción significativa de TPH del 27% a 53% en suelos con fertilizantes.

#### **1.8.5 Aceptores de electrones.**

La cantidad de oxígeno disponible determinará si un sistema es aerobio o anaerobio. La degradación de HCs se da mejor en los sistemas aerobios y para ello los microorganismos deben utilizar O<sub>2</sub> como aceptor de electrones como el oxígeno (O<sub>2</sub>) ya que los procesos de oxidación de los HCs requieren de enzimas oxigenasas. Sin embargo la presencia de otros aceptores de electrones como nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), sulfato (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) o hierro (Fe<sup>+3</sup>) permiten la biodegradación de HCs en ambientes anaerobios (Atlas, 1981; Heitzer y Saylor, 1993; Alexander, 1999; Roberts, 2000).

Para la biodegradación de la mayoría de compuestos orgánicos se requiere aproximadamente de dos partes de oxígeno para metabolizar completamente un parte del compuesto. La oxidación completa de 1 mg de HCs hasta CO<sub>2</sub> y agua requiere de 3 a 4 mg de oxígeno, en general para una biodegradación más rápida es necesario mayor suministro de oxígeno (Zhou y Crawford, 1995; Roberts, 2000).

En los procesos de biorremediación el oxígeno es proporcionado por el uso de aire, oxígeno puro, peróxido de hidrógeno u ozono a través de bombas, propulsores, agitadores, vaporizadores y chorros aunque también se puede suministrar el oxígeno de forma manual mediante el arado directo del sistema (Levin y Gealt, 1997; EPA, 2000).

#### **1.8.6 Densidad de microorganismos.**

La capacidad metabólica de utilizar HC's está ampliamente distribuida entre diversas poblaciones bacterianas (Atlas, 1981). Las transformaciones biológicas de los hidrocarburos se llevan a cabo por la acción de enzimas adecuadas para esa transformación. Las enzimas son específicas con relación al compuesto que atacan y a las reacciones que catalizan, generalmente más de una enzima es requerida para degradar una sustancia orgánica y los microorganismos que poseen las enzimas están presentes ya en el suelo (Atlas, 1981; Rittman y McCarty, 2001).

La densidad de microorganismos en el suelo es un factor primordial en el proceso de biorremediación. Se requiere una concentración mayor de  $1 \times 10^3$  UFC/g<sub>ps</sub> para que se alcance una aceptable actividad biodegradativa por los microorganismos (EPA, 1994; Leahy y Colwell, 1990; EPA, 2000). En ecosistemas no contaminados las comunidades degradadoras de hidrocarburos constituyen menos del 0.1% y en ecosistemas contaminados forman el 85% de microorganismos viables, estas diferencias se dan por el grado de exposición y por la adaptabilidad de los microorganismos a los hidrocarburos del ambiente (Levin y Gealt, 1997; Sylvia *et al.*, 1999; Roberts, 2000).

Antes de iniciar cualquier proceso de biorremediación es importante realizar recuentos de microorganismos heterótrofos y degradadores para conocer la densidad e identificar las especies de microorganismos existentes para escoger una estrategia apropiada de descontaminación para un sitio en particular (Ordóñez, 1995; EPA, 2000).

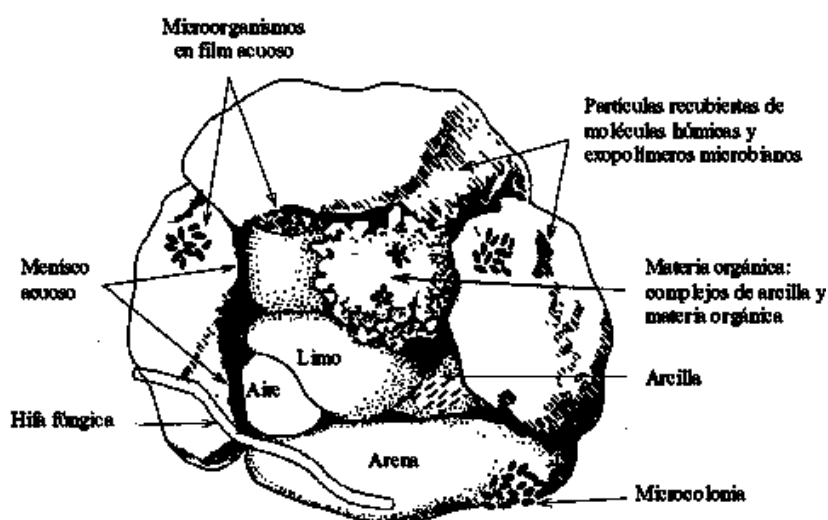
#### **1.8.7 Estructura del suelo.**

La estructura del suelo (granulometría y textura) puede afectar directamente la entrada efectiva de aire, agua, nutrientes y la movilidad del contaminante durante la biodegradación (Atlas, 1981; Vidali, 2001).

Un suelo con baja permeabilidad impedirá los movimientos de agua, nutrientes y oxígeno al formarse complejos húmicos de arcilla disminuyendo

la disponibilidad para los microorganismos, de la misma forma esto contribuye a la formación de residuos persistentes en el ambiente (Eweis *et al.*, 1999) (Figura 5).

El contaminante puede ser absorbido en las partículas del suelo formando agregados los cuales son difícilmente transportados hasta las células que los degradan con lo cual aumenta la concentración de la contaminación (Bouwer y Zehnder, 1993) (Figura 5).



**Figura 5.** Sorción del contaminante en las partículas del suelo y formación de complejos húmicos de arcilla. Fuente: Viñas, 2005.

#### 1.8.8 Estructura de los contaminantes.

La estructura y composición de los hidrocarburos contaminantes tienen un mayor impacto en la viabilidad de los microorganismos y en la biodegradación de los compuestos (Hughes *et al.*, 1997; Straube *et al.*, 2003).

Los compuestos que llevan dentro de su estructura grupos amino, metoxi, sulfonatos y nitro, que tienen pesos moleculares altos o cadenas de longitud larga, bencenos sustituidos en la posición meta y cadenas ramificadas de carbonos generan impedimento estérico y por lo tanto dificultan la biodegradación (Ordoñez, 1995; Eweis *et al.*, 1999).

Los HCs con baja solubilidad en agua no pueden ser transportados al interior de la célula, lo mismo ocurre con aquellos hidrocarburos que son absorbidos en las partículas del suelo haciéndolos inaccesibles al ataque enzimático por parte de los microorganismos (Hughes *et al.*, 1997)

La concentración de los hidrocarburos en el ambiente también afecta considerablemente las tasas de biodegradación. Si las concentraciones presentes en el suelo son muy bajas los compuestos presentes no suministran la energía suficiente para el mantenimiento de la célula, y por el contrario si las concentraciones de HCs son altas pueden ser tóxicos para las células al generar cambios en la estructura y función de la membrana celular (Levin y Gealt, 1997; Margesin y Schinner, 2001).

## 1.9 TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN

### 1.9.1 Bioaumentación.

La bioaumentación es la aplicación directa al suelo de consorcios microbianos nativos o externos modificados genéticamente o sin modificar para estimular la biodegradación (Boon *et al.*, 2000; Simon *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2005; Fantroussi y Agathos, 2005). Los microorganismos son cultivados con una fuente de carbono que generalmente es el contaminante para mejorar su habilidad de adaptación a las condiciones de un sitio en particular y reforzar su capacidad degradativa (Mishra *et al.*, 2001).

La siembra de microorganismos en el suelo o la bioaumentación se realizó por primera vez alrededor de 1968, inoculándose *Cellulomonas* sp. y nutrientes bajo condiciones controladas para degradar hidrocarburos, encontrándose que la degradación era más efectiva con la adición de bacterias que únicamente con la aplicación de nutrientes (Fantroussi y Agathos, 2005). A partir de ese momento la bioaumentación es utilizada en diferentes ambientes para degradar compuestos orgánicos con mucho éxito (Kastner *et al.*, 1998; Boon *et al.*, 2000; Straube *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Juhasz *et al.*, 2005a).

En la bioaumentación se emplean mezclas de bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Nocardia* y *Arthobacter* entre otras, estas mezclas pueden consistir de 3 o más cepas de microorganismos para tratar diferentes tipos de contaminantes. Por ejemplo 3 bacterias Gram negativas de las especies *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* y *Flavobacterium* sp. fueron aisladas de suelos contaminados con PAHs incluyendo fenantreno, antraceno y fluoreno

y se observó una eficiente degradación de los compuestos cuando se inoculaban estas cepas mezcladas (Sudip *et al.*, 2002).

Algunos factores que pueden inhibir la inoculación de microorganismos en el suelo son:

- La concentración de los compuestos en el suelo puede ser muy baja y no generar producción de biomasa de las bacterias inoculadas.
- El ambiente natural puede tener sustancias que inhiban el crecimiento de los microorganismos adicionados.
- Puede existir competencia y predación por parte de protozoos.
- Los microorganismos inoculados pueden utilizar otros compuestos orgánicos y por lo tanto no degradar el compuesto de interés.
- Los microorganismos pueden tener dificultad para alcanzar el contaminante a través de los poros del suelo (biodisponibilidad) (Goldstein *et al.*, 1985; Vidali, 2001).

La bioaumentación también puede emplear microorganismos modificados genéticamente, a los cuales se les refuerza su capacidad degradadora de diferentes tipos de compuestos mediante el uso de técnicas como: mutagénesis, conjugación o recombinación de las rutas, transposones, clonación de genes y mutación *in situ* (Rittman y McCarty, 2001). Esta modificación ofrece varias ventajas porque permite ejercer un mayor control sobre las rutas degradadoras enzimáticas, incluyendo la dirección del flujo metabólico para evitar cualquier posible intoxicación intermedia (Levin y Gealt, 1997; Roberts, 2000). Una desventaja de la modificación de genética es que estas bacterias no dan buenos resultados cuando son aplicadas en campo (Eweis *et al.*, 1999).

### **1.9.2 Bioestimulación.**

Es una modificación ambiental que suministra el factor que puede llegar a ser limitante y que está restringiendo el crecimiento microbiano y la tasa de degradación del contaminante. Estos factores son nutrientes (nitrógeno y fósforo), aceptores de electrones (O<sub>2</sub>), humedad y temperatura (Atlas, 1988; Liebeg y Cutright, 1999).

El suministro del factor limitante como macroelementos o microelementos en forma de fertilizantes orgánicos e inorgánicos acelera la reproducción de los

microorganismos y la incorporación de los constituyentes químicos a los componentes de la célula para su asimilación y síntesis de nuevo material celular y permitir la degradación total o parcial del contaminante (Eweis *et al.*, 1999; Kaplan y Kitts, 2004; Bento *et al.*, 2005; Chaineau *et al.*, 2005).

Estudios realizados por Atagana y colaboradores (2003) encontraron que la adición de suplementos nutricionales en forma de sales inorgánicas promueven la degradación microbiana de creosota hasta un 68.7% en un periodo de 6 semanas. Armendáriz y colaboradores (2004) lograron una remoción del 60% de TPH al aplicar nutrientes en la proporción 100:10:1 (C:N:P) y al adicionar microorganismos asociados al bagazo de caña.

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 y Agathos, 2005). Estudios recientes de Silva y colaboradores, 2004 encontraron que la bioaumentación y la bioestimulación puede llevar a la mineralización del herbicida atrazina al adicionar citrato-succinato y *Pseudomonas* sp., el estudio arrojó una mineralización del 54% después de 67 días de tratamiento.

### **1.9.3 Biolabranza (*lanfarming*).**

El proceso de biolabranza es una técnica simple en la cual el suelo contaminado es excavado y dispuesto sobre capas delgadas de suelo orgánico, se le adiciona nutrientes, se controla la humedad y es periódicamente arado para estimular la actividad microbiana aeróbica del suelo hasta que los contaminantes sean degradados (Blackburn y Hafker, 1993; EPA, 2000; Vidali, 2001). Además debe existir un monitoreo constante para evitar una potencial migración de los contaminantes hacia aguas subterráneas y emisiones atmosféricas (MAPFRE, 1994).

En este proceso se deben controlar variables fisicoquímicas como el contenido de humedad (50 a 75% de la capacidad de campo), pH (entre 6.5 y 8.5), nutrientes (adición de fertilizantes) mantenido la relación 100:10:1 y suministro de oxígeno (Dibble y Bartha, 1979; Bem Systems, 1998; Eweis *et al.*, 1999).

Este proceso a sido exitoso en el tratamiento de HCs tales como el combustible diesel, aceites combustibles número 2 y 4 en suelos, lodos en

base de aceite, PAHs, creosota y desechos de coque (Dibble y Bartha, 1979; Huesemann y Moore, 1993; Pollard *et al.*, 1994; Levin y Gealt, 1997; EPA, 2000; Mishra *et al.*, 2001; Picado *et al.*, 2001; Marin *et al.*, 2005).

## 2. HIPOTESIS

**Ho:** La bioaumentación causa una mayor degradación de TPH que la bioestimulación.

**Hi:** La bioaumentación causa una menor degradación de TPH que la bioestimulación.

**Ho:** La bioaumentación con bacterias nativas causa una mayor degradación de TPH que la bioaumentación con bacterias comerciales.

**Hi:** La bioaumentación con bacterias nativas causa una menor degradación de TPH que la bioaumentación con bacterias comerciales.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de los procesos de bioaumentación (bacterias nativas vs. comerciales) y bioestimulación en un suelo contaminado con hidrocarburos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Aislar e identificar las bacterias degradadoras de hidrocarburos nativas del suelo.
- Desarrollar un consorcio de bacterias nativas Gram negativas degradadoras de hidrocarburos para ser utilizadas durante la bioaumentación.
- Comparar la degradación de hidrocarburos por un consorcio de bacterias nativas y un consorcio comercial.
- Evaluar el efecto de la bioestimulación con la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC) durante el proceso de biorremediación.

## 4. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

El objetivo del estudio fue evaluar y comparar dos técnicas de biorremediación (bioestimulación y bioaumentación) en la degradación de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) presentes en una mezcla suelo-residuos de destilación de alquitrán.

Inicialmente se realizó una caracterización fisicoquímica preliminar del suelo sin contaminar para determinar la viabilidad del proceso y conocer las características particulares del tipo de suelo que pueden afectar el proceso de biorremediación (Tabla 6). El estudio consistió de dos fases. La primera de laboratorio, en la cual se realizó la estandarización de las técnicas de Numero Mas Probable (NMP) y determinación de nutrientes (amonio, nitrato y fósforo); al mismo tiempo se realizó el aislamiento e identificación de los microorganismos degradadores de HCs, curvas de crecimiento y desarrollo de un consorcio de bacterias nativas degradadoras de HCs (Figura 6).

La segunda fase, de campo, consistió en la evaluación de 3 tratamientos con adición de fertilizante inorgánico compuesto (FIC) triple 15 (NPK), agua y aireación. Se utilizaron parcelas como unidades experimentales (UE) y se hizo el seguimiento durante 120 días. Se llevaron a cabo 5 eventos de muestreo (EM) cada 30 días. Para el estudio se tomaron dos muestras por parcela de forma aleatoria ( $n=2$ ). A cada muestra se le realizaron análisis microbiológicos (recuento de microorganismos heterótrofos y degradadores de HCs) y análisis fisicoquímicos de TPH, nutrientes,  $CO_2$ , pH, humedad y temperatura ambiental (Figura 7).

### 4.1 LOCALIZACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

Las parcelas fueron localizadas en los predios de una empresa petroquímica de la ciudad de Bogotá (Colombia). El clima de la región corresponde a dos estaciones particulares; invierno entre los meses de enero a mayo y verano entre los meses de junio a diciembre, aunque durante todo el año predominan en promedio bajas temperaturas  $<13^{\circ}C$  (IDEAM, 2004). Durante el estudio se presentó una temperatura mínima de  $0\pm 1.5^{\circ}C$  y una máxima de  $31\pm 1.6^{\circ}C$  comprendidas entre los meses de Diciembre 2005 y Abril 2006.

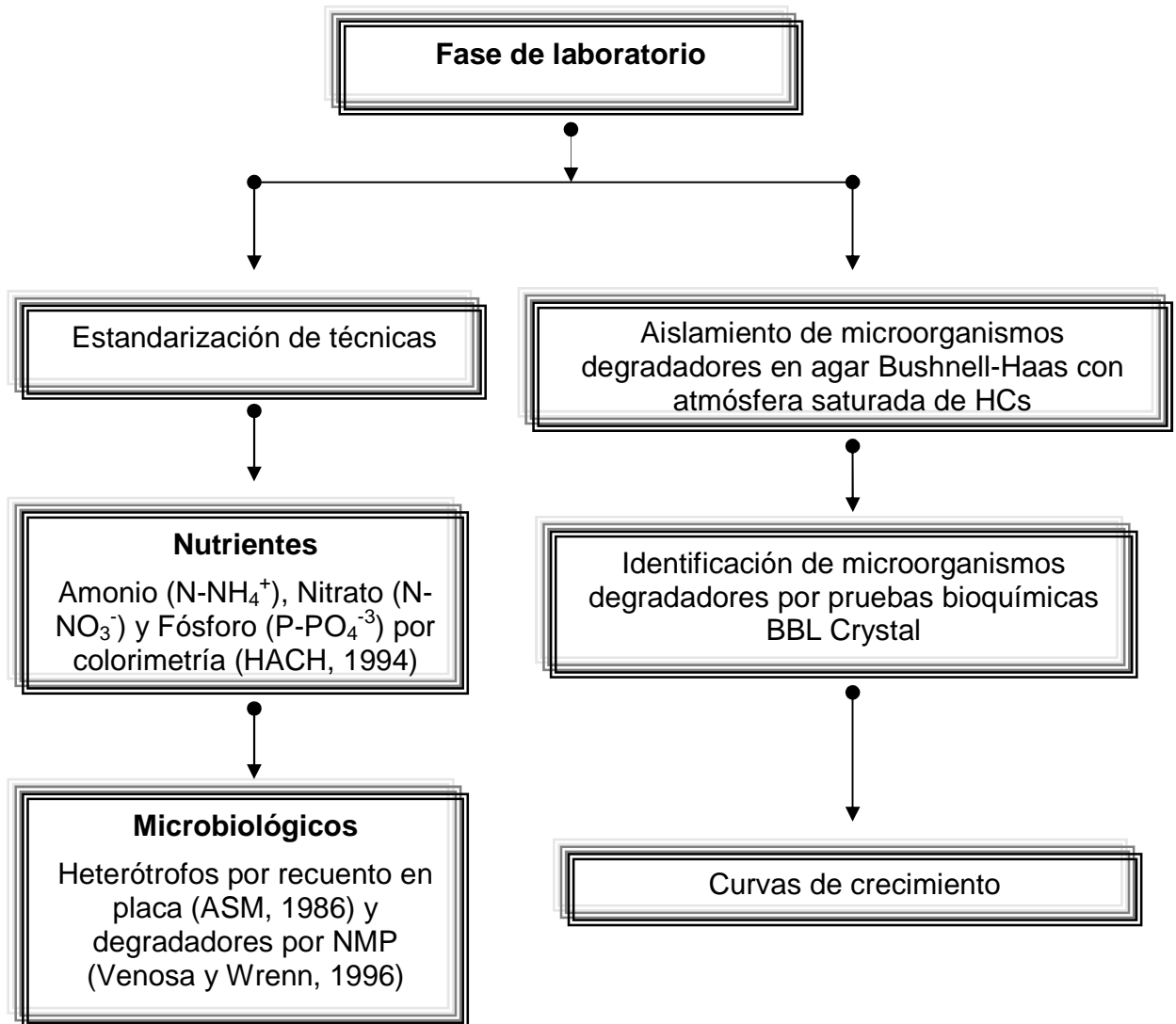
**Tabla 6.** Características fisicoquímicas y microbiológicas preliminares del suelo (n=2).

Análisis	Resultado
pH	8.6±0.14
Carbono orgánico (%)	8.0±1.13
Textura	Franco-Arenosa
Saturación de Humedad (%)	35±1.41
Densidad (g/cc)	1.2±0.07
Conductividad eléctrica (ms/cm)	4.6±0.33
Fósforo PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/kg)	8±0.0
Nitrógeno amoniacal N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/kg)	15±0.0
Nitrógeno nítrico N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)	5±0.0
Concentración inicial de TPH(mg/kg)	13544±106.0
Recuento de heterótrofos UFC/g <sub>ps</sub>	3.8 x10 <sup>6</sup> ±0.43
Recuento de degradadores NMP/g <sub>ps</sub>	2.2 x10 <sup>5</sup> ±0.67

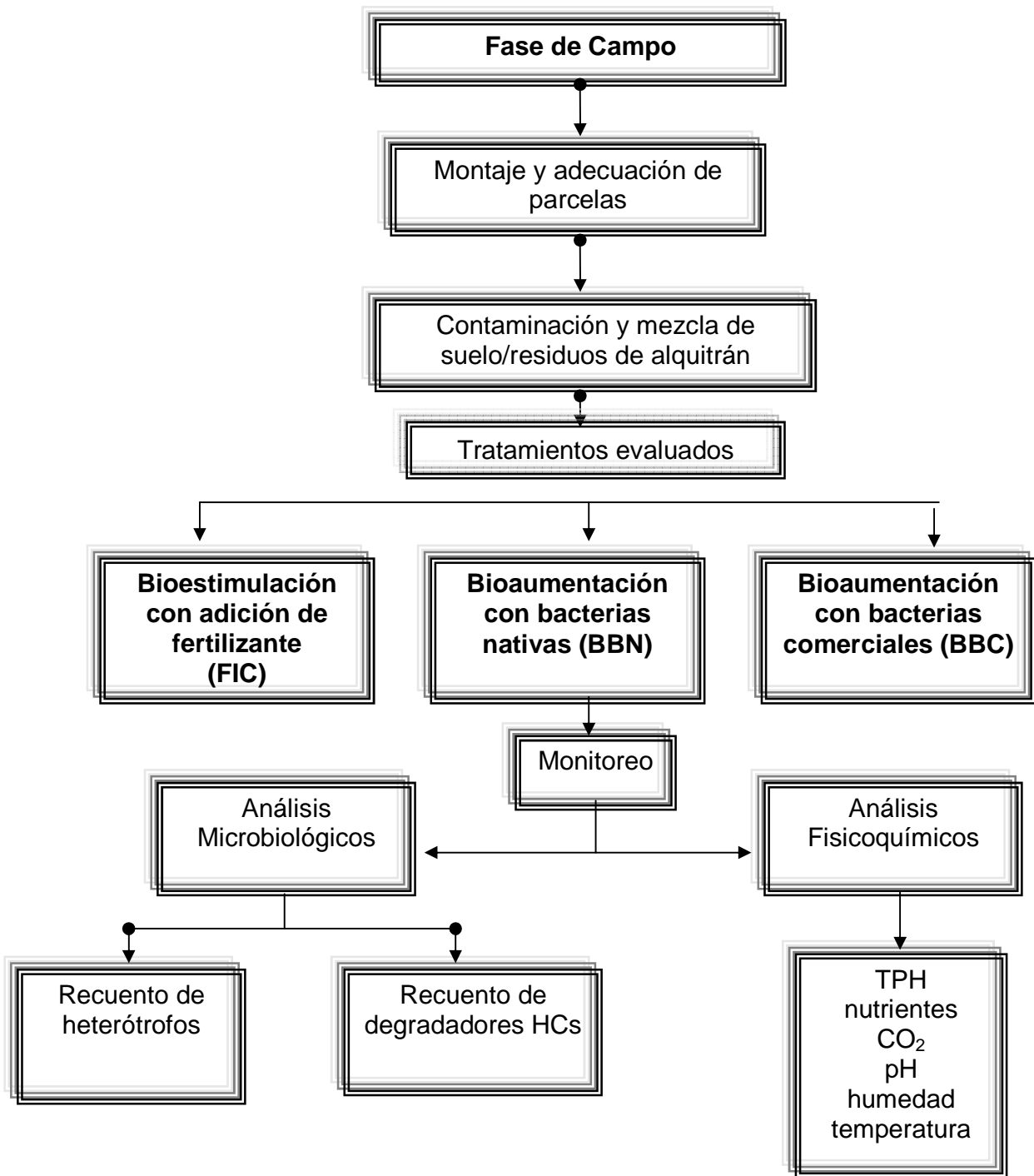
#### 4.2 DESCRIPCIÓN Y ANÁLISIS DEL SUELO

Se tomaron dos muestras compuestas (n=2) de 250 g del suelo sin contaminar las cuales fueron enviadas al laboratorio analítico (Dr. Calderón Ltda.) para análisis preliminares de pH, carbono orgánico, textura, saturación de humedad, densidad, conductividad eléctrica, nitrógeno nítrico N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, nitrógeno amoniacal N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y fósforo PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> (Tabla 6). El resultado de estos análisis permitió conocer la concentración presente de macronutrientes y mediante un balance de masas se determinó la cantidad de fertilizante que se aplicaría durante el estudio.

Igualmente dos muestras de 500 g suelo fueron enviadas al laboratorio Ivonne Bernier Ltda. Para el análisis preliminar de TPH por el método de gravimetría (EPA 3540B-SM5520 F). Los análisis microbiológicos iniciales de heterótrofos por el método de recuento en placa por siembra en superficie (ASM, 1986) y los degradadores de HC's por la técnica del número más probable (NMP) usando como fuente de carbono diesel se realizaron en el laboratorio de la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la pontificia Universidad Javeriana (Tabla 6) (Haines *et al.*, 1996; Venosa y Wrenn, 1996). Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos en cada evento de muestreo fueron realizados en la USBA y los análisis de TPH en laboratorio analítico.



**Figura 6.** Esquema general del estudio durante la fase de laboratorio.



**Figura 7.** Esquema general de trabajo para la fase de campo.

## 4.3 FASE DE LABORATORIO

### 4.3.1 Estandarización de técnicas.

La estandarización de técnicas consistió en la determinación de la precisión y exactitud en la determinación de nutrientes (nitrato, amonio y fósforo) y el conocimiento y entrenamiento de la técnica del número más probable (NMP) para la determinación de microorganismos degradadores.

#### 4.3.1.1 Determinación de nutrientes.

La estandarización de las técnicas para cuantificar nutrientes (amonio, nitrato y fósforo) se realizó durante 4 meses, a lo largo de los cuales se evaluó la exactitud y precisión en la mezcla de reactivos y muestras para su determinación. Para determinar la exactitud y precisión se preparó una solución estándar por cada nutriente a analizar.

- Solución estándar de amonio: Esto se realizó preparando una solución de 1.000 mg/L de cloruro de amonio.
- Solución estándar de nitrato: Realizando una solución de 100 mg/L de nitrato de potasio.
- Solución estándar de fosfato: Preparando una solución de 500 mg/L de fosfato diácido de potasio (Anexo 1).

De las soluciones estándar de cada uno de los nutrientes a analizar se realizaron 4 diferentes diluciones en diferentes rangos de concentración para realizar las curvas de calibración (Tabla 7).

**Tabla 7.** Estándares utilizados para realizar las curvas de calibración (n=2).

Nutriente	Concentración (mg/L)
Amonio N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	50-120-190-260
Nitrato N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5-15-25-35
Fósforo P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	5-20-35-50

#### **4.3.1.2 Curva de calibración para nutrientes.**

Se realizaron curvas de calibración para cada una de las soluciones estándar de amonio, nitrato y fósforo para establecer la precisión al determinar las concentraciones de nutrientes.

#### **4.3.1.3 Análisis microbiológicos.**

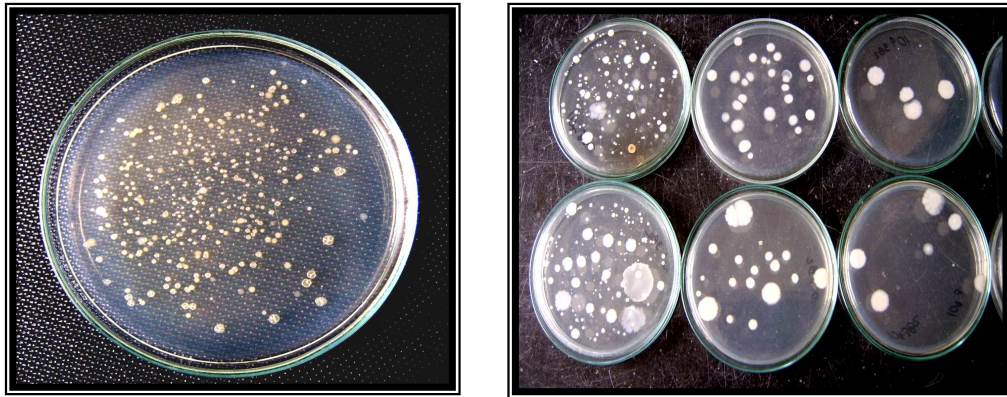
Para el análisis microbiológico inicial del suelo se tomaron 10 g de suelo y se diluyeron en 90 ml de agua buferada (Standard Methods, 1995) (Anexo 2). La solución se agitó por 20 min a 160 rpm para facilitar el desprendimiento de los microorganismos de la matriz del suelo (Towsend y Bonner, 2000).

Se realizaron diluciones seriadas con base 10 en tubos de ensayo de  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$ . Posteriormente se realizó el recuento en placa en agar infusión suelo para la cuantificación de heterótrofos totales (ASM, 1986; Standard Methods, 1995, Maldonado, 2003) (Anexo 3). Para la determinación de los microorganismos degradadores de HCs se utilizó el método del número más probable (NMP) con el indicador INT (Violeta de iodonitrotetrazolium) (Haines *et al.*, 1996; Venosa y Wrenn, 1996, Maldonado, 2003, Vallejo, 2004).

##### **4.3.1.3.1 Recuento de microorganismos heterótrofos.**

El método de recuento en placa por siembra en superficie es empleado para la recuperación y conteo de microorganismos heterótrofos totales presentes en el suelo (ASM, 1986; Standard Methods, 1995). En este método se obtienen solo células viables las cuales son capaces de dividirse para dar lugar a descendencia, es decir cada célula viable puede dar lugar a una unidad formadora de colonia (UFC) al crecer en medios sólidos enriquecidos como el agar infusión suelo u otros medios modificados (ASM, 1986; Madigan *et al.*, 1998).

De las diluciones realizadas se inoculó 0.1 ml en cajas de petri con agar infusión suelo mediante siembra en superficie, las siembras se hicieron por duplicado y las placas se incubaron a temperatura ambiente (22 – 28°C) por 7 días. Posteriormente se realizó el recuento de las colonias que crecieron sobre el agar dentro de un rango entre 30 y 300 (Figura 8).



**Figura 8.** Recuento de heterótrofos en agar infusión suelo.

#### **4.3.1.3.2 Recuento de microorganismo degradadores de HCs por el número más probable (NMP).**

El método del NMP es utilizado para la determinación de la densidad de microorganismos degradadores de HCs junto con el indicador INT para evidenciar la actividad metabólica de los microorganismos (Brown and Braddock, 1990). Para la técnica se utiliza un medio mínimo de sales Bushnell-Haas (BH) (Sigma) (Anexo 4) suplementado con una fuente de carbono específica (Haines *et al.*, 1996; Venosa y Wreen., 1996; Maldonado, 2003).

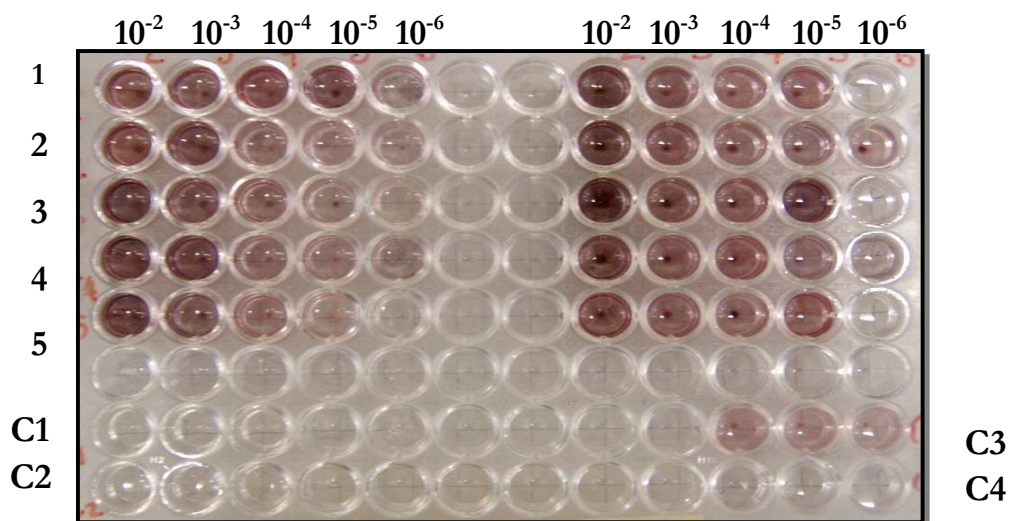
La técnica NMP se realizó usando placas de 96 pozos previamente esterilizadas por luz UV durante 1 h. En cada uno de los pozos se agregaron 180  $\mu$ l de medio BH, luego se inocularon 20  $\mu$ l de las diluciones seriadas ( $10^{-2}$  a  $10^{-6}$ ) cada una con cinco réplicas y por último se adicionó 5  $\mu$ l de diesel como fuente carbono, la evaluación se repito 3 veces y por duplicado para lograr obtener el mayor número de bacterias degradadoras presentes en el suelo. En cada placa se utilizaron cuatro controles cada uno por triplicado (n=3) (Tabla 7).

El control 1 contenía solo medio BH para evaluar la ausencia de microorganismos contaminantes y presencia de fuentes de carbono que pudieran dar falsos positivos. El control 2 fue para determinar la presencia de microorganismos contaminantes en el diesel. El control 3 contenía la cepa degradadora *Acinetobacter* sp. (PUJ-M-Biol-USBA) la cual fue aislada de suelos contaminados con HCs en trabajos realizados en la USBA y fue el control positivo. Al control 4 se le adicionó el microorganismo no degradador *Bacillus cereus* (ATCC 11778) y fue el control el negativo (Tabla 8).

**Tabla 8. Controles utilizados en la técnica del NMP.**

Control	Medio BH	Microorganismo	Diesel
1	+	-	-
2	+	-	+
3	+	+	+
4	+	+	+

Las placas se incubaron a temperatura ambiente (25 °C) durante 15 días recubiertas con papel vinipel para evitar la pérdida por evaporación de HCs (Haines *et al.*, 1996). Transcurrido este tiempo, a cada pozo se le adicionó 50 µl de INT (Sigma) (0.3%) (Anexo 5). El recuento de degradadores se realizó después de 16 horas y se tomaron como positivos los pozos que presentaron una coloración roja-rosada en cada dilución, debido a la reducción del INT (Figura 9).



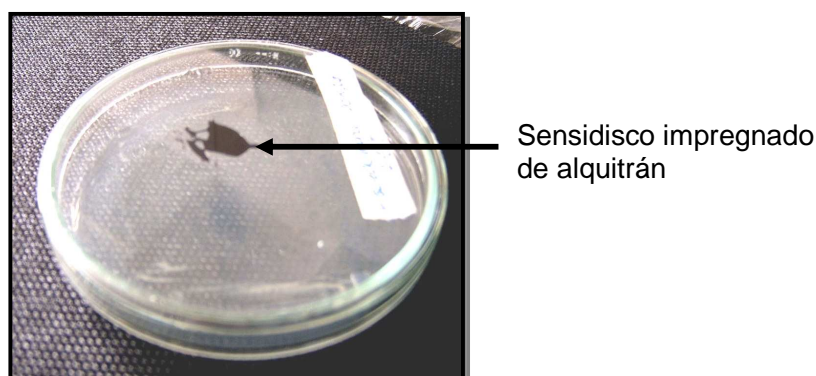
**Figura 9.** Técnica de NMP para bacterias degradadoras de HCs. Columnas: muestras y sus diluciones ( $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$ ). Filas: replicas (1 – 5). Controles: C1: BH, C2: BH y diesel, C3: BH, *Acinetobacter* sp. PUJ-M-Biol-USBA-98 y diesel, C4: BH, *Bacillus cereus* ATCC 11778 y diesel.

El INT compete con el oxígeno en la cadena de transporte de electrones en donde es reducido a formazán, el cual es insoluble y se observa como un precipitado rojo o rosado como indicador de la respiración de los microorganismos (Haines *et al.*, 1996; Venosa y Wreen., 1996). Los resultados obtenidos de pozos positivos y negativos en cada dilución se analizaron en el programa Most Probable Number Calculator, (Versión 4.04), (Cleves y Sandoval, 2001; Vallejo, 2004). Los resultados fueron expresados en NMP/g y transformados a gramos de peso seco (NMP/g<sub>ps</sub>).

#### 4.3.2 Aislamiento de bacterias nativas degradadoras.

De las mayores diluciones que presentaron crecimiento evidenciado por los pozos positivos de cada placa de NMP se tomó una asada y fue sembrada en agar BH. En la tapa de la caja de petri se colocó un papel filtro (Wathman No. 4) impregnado con alquitrán como fuente de carbono para saturar la atmósfera con el compuesto. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente ( $25 \pm 4.24$  °C) por un periodo de 7 días (Maldonado, 2003; Margesin *et al.*, 2003; Vallejo, 2004) (Figura 10).

Para garantizar la capacidad degradadora de las bacterias se realizaron cuatro siembras consecutivas en agar BH y con alquitrán. Luego se repicaron a agar nutritivo (AN) mediante siembra por agotamiento hasta obtener colonias bien aisladas. Finalmente se realizó la observación macroscópica teniendo en cuenta color, tamaño, forma, borde, aspecto, superficie y pigmentación. Mediante coloración Gram se realizó la observación microscópica para determinar la pureza de las cepas aisladas (Madigan *et al.*, 1998).

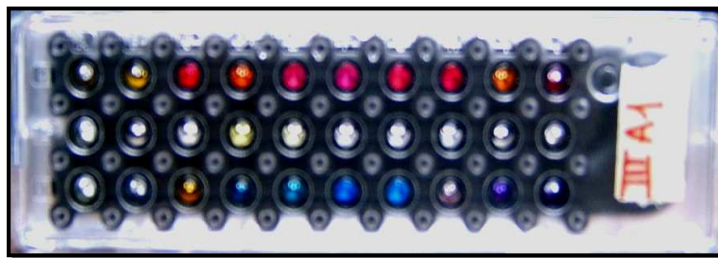


**Figura 10.** Aislamiento de bacterias degradadoras de HCs en agar BH.

#### 4.3.3 Identificación de bacterias nativas degradadoras.

La identificación de las cepas obtenidas se realizó por medio de pruebas bioquímicas BBL CRYSTAL<sup>®</sup> para bacterias entéricas no fermentativas Gram negativas, para ello fue necesario la siembra en agar MacConkey y con cultivos de no más de 24 horas en crecimiento.

El sistema de identificación BBL CRYSTAL<sup>®</sup> se basa en la utilización de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores. Las reacciones de oxidación están basadas en la capacidad de un organismo para metabolizar el sustrato siendo el oxígeno el aceptor final de electrones. Esta reacción se detecta normalmente mediante el uso de un indicador de pH en el sustrato del análisis. Los sustratos cromógenos al sufrir hidrólisis producen cambios de color que pueden ser detectados visualmente (Identification Systems Enteric/Nonfermenter Manual Codebook, 2004) (Figura 11) (Anexo 6).



**Figura 11.** Prueba de identificación bioquímica BBL Crystal.

Una vez identificadas las especies bacterianas fueron conservadas a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  en medio skim milk (Oxoid) e ingresadas al cepario de la USBA de la Universidad Pontificia Javeriana.

#### 4.3.4 Curva de crecimiento.

Para realizar un proceso de bioaumentación exitoso es necesario tener una población de microorganismos entre  $10^6 - 10^8$  UFC/ml (EPA, 2000; Sanjeet *et al.*, 2001; Guevara, 2005). Para determinar el tiempo aproximado en el cual se obtiene una población  $10^8$  UFC/ml fue necesario realizar la curva de crecimiento (absorbancia y UFC/ml vs. tiempo) a la especie bacteriana más abundante previamente aislada e identificada del suelo de estudio (*Pseudomonas putida*). Para ello se realizó un preinoculo y un inoculo con siembras simultaneas en placa en agar de recuento por duplicado y lectura

en el espectrofotómetro a 600 nm durante 24 h (Sanjeet *et al.*, 2001; Guevara, 2005).

Para la obtención del preinoculo *Pseudomonas putida* fue crecida en un medio con melaza al 0.4% (p/v) como única fuente de carbono y urea 0.04% (p/v) como fuente de nitrógeno (Carreño, 2004). El medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 minutos (Al-hadhrami *et al.*, 1997; BEM systems, 1998). Luego el preinoculo se incubó por 24 h a 37 °C a 200 rpm, manteniendo una relación de 1/5 de aireación y se buscó alcanzar una densidad óptica (DO) de 1.0 a 600 nm en el espectrofotómetro (Margesin y Schinner, 1997a; Madigan *et al.*, 1998; Guevara, 2005). El inoculo se realizó agregando 2 ml de preinoculo (1% v/v) a un volumen final de 200 ml de medio melaza 0.4% (p/v) y urea 0.04% (p/v) en frascos de 1000 ml.

#### **4.4 FASE DE CAMPO**

##### **4.4.1 Diseño experimental.**

El estudio se desarrolló durante 120 días evaluando tres tratamientos (bioestimulación con adición de FIC, bioaumentación con adición de un consorcio de bacterias nativas y bioaumentación con adición de un consorcio de bacterias comerciales). Se llevaron a cabo 5 eventos de muestreo (EM) cada 30 días, en cada EM se obtenían dos muestras al azar por cada parcela (n=2). A cada muestra se le realizaron análisis microbiológicos (recuento de heterótrofos y degradadores de HCs), análisis fisicoquímicos (nutrientes, TPH y CO<sub>2</sub>) y se realizó el monitoreo de variables como pH, humedad y temperatura ambiental.

##### **4.4.2 Elaboración de las unidades experimentales (UE).**

Se construyeron 6 parcelas en madera (1.5 x 1.5 x 0.3 m), las cuales fueron recubiertas en su parte inferior con plástico industrial para evitar la pérdida de suelo tratado a través de las uniones de la madera (Figura 12). Igualmente el suelo estuvo cubierto por plástico industrial para evitar que los lixiviados pasen directamente al suelo. Las parcelas estuvieron protegidas de la lluvia mediante una cubierta con tejas de zinc de 11 x 5 m y una altura de 2.5 m. A cada parcela se le adicionaron 0.45 m<sup>3</sup> (450 Kg) de suelo contaminado tamizado hasta una altura de 0,2 m.



**Figura 12.** Parcelas utilizadas durante el estudio.

#### **4.4.3 Contaminación y mezcla del suelo.**

Para el estudio se recolectaron 4 m<sup>3</sup> de suelo cercano a una antigua planta de destilación de alquitrán. El suelo fue tamizado y homogeneizado de forma manual durante un periodo de 5 días para lograr un tamaño de partícula uniforme y facilitar la toma efectiva de O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y nutrientes durante el proceso de biorremediación (Figura 13).

Se colocaron 450 Kg de suelo en cada parcela y se realizó la contaminación en cada una de ellas con residuos de destilación de alquitrán aplicando una proporción de 1:25 (v/v) por parcela para una concentración final de 14,000 mg/Kg, el suelo fue homogeneizando de forma manual hasta que presentó uniformidad de textura y color reduciendo la formación de parches de contaminación (Figura 14) (Anexo 7).



**Figura 13.** Tamizado y homogenizado manual del suelo a contaminar.



**Figura 14.** Proceso de contaminación y mezcla del suelo manual con residuos de destilación de alquitrán.

#### 4.4.4 Descripción de los tratamientos.

Para evaluar el efecto de la bioestimulación y la bioaumentación en la degradación de suelos contaminados con residuos de destilación de alquitrán se evaluaron 3 tratamientos en parcelas (Tabla 9). Cada tratamiento tenía la misma proporción (1:25 v/v) de la mezcla residuos-suelo. Los tratamientos fueron aireados manualmente mediante volteo empleando palas.

**Tabla 9.** Descripción de los tratamientos elaborados.

Tratamientos (n=2)	Adición de FIC	Adición de bacterias nativas	Adición de bacterias comerciales
Bioestimulación con adición de FIC ( <b>FIC</b> )	+	-	-
Bioaumentación con bacterias nativas y FIC ( <b>BBN</b> )	+	+	-
Bioaumentación con bacterias comerciales y FIC ( <b>BBC</b> )	+	-	+

Para el tratamiento con FIC se adicionó fertilizante inorgánico compuesto (FIC) marca Nutrimón® en una proporción 100:10:1 (Dibble y Bartha, 1979; Bem Systems, 1998; Margesin y Schinner, 2001) el cual esta compuesto por N:P:K en la proporción 15:15:15 (Anexo 8).

En BBN se agregó el consorcio de microorganismos nativos aislados e identificados previamente (Tabla 13) con capacidad degradadora de HCs más adición de FIC (Triple 15).

Para BBC se aplicó un consorcio de microorganismos comerciales marca InterBio® (RBC 109) (Anexo 9), compuesto por *Pseudomonas* sp. y *Bacillus* sp. más adición de FIC.

#### **4.4.4.1 Bioestimulación con adición de fertilizante inorgánico compuesto (FIC).**

De acuerdo a los análisis preliminares de concentración de nitrógeno y fósforo realizados en laboratorio analítico (Tabla 11) se hizo un balance de masas para establecer la relación de nutrientes a aplicar en los tratamientos de acuerdo a una relación C:N:P, 100:10:1 (Atlas, 1981; Dibble y Bartha, 1979; Bem Systems, 1998; Cleves y Sandoval, 2001; Margesin y Schinner, 2001; Mishra *et al.*, 2001; Vallejo, 2004) (Anexo 10).

Se aplicaron 12 kg de FIC (Triple 15) por cada parcela, los cuales fueron diluidos en 50 L de agua (equivalente al 60% de la capacidad de campo), colectada con varios días de anticipación para evitar la acción bactericida del cloro. El triple 15 se disolvió por 3 días para facilitar su desintegración y facilitar la absorción por los microorganismos del suelo. Este fertilizante se utilizó por ser empleado en estudios de biorremediación, por ser económico y de fácil adquisición (Cleves y Sandoval, 2001; Vallejo, 2004).

#### **4.4.4.2 Bioaumentación con adición bacterias nativas y FIC (BBN).**

Se realizó un cultivo con las bacterias del consorcio desarrollado (Tabla 13) hasta obtener una densidad de  $10^8$  UFC/ml o superior. Primero se desarrolló un preinoculo para cada una de las especie identificadas en un medio con melaza al 0.4% (p/v) como única fuente de carbono y urea 0.04% (p/v) (Carreño, 2004). El medio fue esterilizado en autoclave a 121 °C por 15 minutos (Al-hadhrami *et al.*, 1997; BEM systems, 1998). Los preinoculos se incubaron por 24 h a 37 C° a 200 rpm, manteniendo una relación de 1/5 de aireación (Margesin y Schinner, 1997a; Guevara, 2005).

Posteriormente se realizó la bioaumentación del consorcio adicionando 7 ml de cada preinoculo hasta obtener un volumen de 35 ml (1% v/v) que se adicionó a tres biorreactores cada uno con 3.5 L de medio con melaza al 0.4% (p/v) y urea 0.04% (p/v), estos se dejaron incubando por 48 h a temperatura ambiente (25°C) (Carreño, 2004) (Figura 15). En cada biorreactor se controlaron los siguientes parámetros de crecimiento: aireación, pH 7.0, y producción de espuma adicionando polietilenglicol al 1% (Umaña *et al.*, 1991; Mishra *et al.*, 2001). Transcurrido el tiempo de incubación se realizaron siembras en agar de recuento para determinar la concentración final alcanzada en los biorreactores para su posterior adición al tratamiento (Figura 16).



**Figura 15 y 16.** Biorreactores utilizados para la bioaumentación del consorcio. Adición del consorcio de bacterias nativas al tratamiento de bioaumentación.

#### **4.4.4.3 Bioaumentación con adición de bacterias comerciales y FIC (BBC).**

Las cepas comerciales InterBio<sup>®</sup> (RBC 109) se prepararon según las especificaciones del fabricante (Anexo 9). Partiendo de una concentración de liofilizado de  $1 \times 10^{12}$  UFC/g, se preparó 1 kg de liofilizado en 10 L de agua destilada, obteniendo una concentración de  $1 \times 10^{11}$  UFC/g y una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/g después de adicionarse al suelo (Anexo 11).

## 4.5 PARAMETROS CONTROLADOS EN LOS TRATAMIENTOS

### 4.5.1 Aireación.

El crecimiento de los microorganismos y el desarrollo de sus actividades metabólicas dependen de la disponibilidad de oxígeno molecular, ya que las bacterias lo utilizan como aceptor final de electrones. El O<sub>2</sub> puede ser suministrado por acciones de arado, volteo y trillado (Ordoñez, 1995; Levin y Gealt, 1997). Durante el estudio se realizó la aireación en cada parcela una vez por semana mediante volteo manual para adicionalmente dar una mejor homogenización a la mezcla (Figura 17).



**Figura 17.** Aireación de los tratamientos de forma manual.

### 4.5.2 Disponibilidad de agua.

La disponibilidad de agua en el suelo puede convertirse en un factor limitante durante la biorremediación ya que la humedad tiene gran influencia en la actividad microbiana (Dibble y Bartha, 1979; Eweis *et al.*, 1999). Por esta razón se realizó la adición manual de agua a todos los tratamientos intentando mantener un contenido de humedad del 15% adicionando 18 L por parcela semanalmente.

## 4.6 MONITOREO DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

### 4.6.1 Recolección de muestras.

Se colectaron dos muestras por parcela en cada EM de forma aleatoria, utilizando un generador de números aleatorios y una cuadrícula de muestreo con un área de 2.25 m<sup>2</sup> dividida en 36 cuadrantes de 25 x 25 cm (Figura 18).

Las muestras se tomaron con barreno y cucharas plásticas desechables hasta una profundidad de 20 cm.

#### 4.6.2 Análisis microbiológicos.

Para los análisis microbiológicos se tomaron 250 g de suelo y se colocaron en bolsas plásticas resellables, rotuladas adecuadamente (fecha y número de muestra) y transportadas en nevera (4-6°C) para análisis en el laboratorio USBA (Figura 19). En donde se les realizaron recuentos de heterótrofos (ASM, 1986; Standard Methods, 1995) y recuento de degradadores por el método del NMP (Haines *et al.*, 1996; Venosa y Wrenn, 1996).



**Figuras 18 y 19.** Cuadrícula de muestreo. Recolección de muestras para análisis microbiológicos y fisicoquímicos.

#### 4.6.3 Análisis fisicoquímicos.

Para el análisis de TPH (Gravimetría. EPA 3540 B-SM5520 F) se tomaron 500 g de suelo y se depositaron en frascos de vidrio suministrados por el laboratorio analítico. Estos fueron rotulados adecuadamente con fecha, hora, tratamiento y responsable de la muestra. Los análisis de nutrientes (nitrato, amonio y fósforo) se realizaron utilizando 20 g de suelo y su determinación se realizó en la USBA (Anexo 12). Estos análisis se hicieron previos a la adición de los residuos de alquitrán y durante el tiempo de estudio.

El monitoreo de pH y humedad en cada parcela se hizo tomando 50 g de suelo para su análisis. También se evaluó la actividad de los microorganismos del suelo mediante la producción de CO<sub>2</sub>, su evaluación se

realizó colocando los montajes directamente sobre las parcelas (n=2) (Figuras 20 y 21). La temperatura ambiental se registró con un termómetro de máximas y mínimas dos veces por semana. Estos análisis se efectuaron durante todo el tiempo de estudio y se determinaron en las instalaciones de la empresa (Tabla 10).



Trampa con NaOH 1N



Montajes

**Figuras 20 y 21.** Montaje para medir la producción de CO<sub>2</sub> en cada parcela.

**Tabla 10.** Métodos fisicoquímicos realizados durante el estudio.

Determinación	Método	Anexo
TPH	Gravimetría. EPA 3540B-5520 F Laboratorio privado.	
Nitrato N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	366	12
Amonio: N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	391	
Fósforo: P-PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	531 HACH, 1994	
PH	EPA 9045C, 1995	13
HUMEDAD	Peso Seco IGAC, 1979	14
CO <sub>2</sub>	Titulación Campos, 2002	15

## 4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Inicialmente se realizó la prueba de Shapiro Wilk ( $p < 0.05$ ) para evaluar si los datos seguían una distribución normal. Se utilizó análisis de varianzas (ANOVA  $p < 0.05$ ) para comparar las medias de cada una de las variables analizadas e identificar diferencias significativas entre los tratamientos. Para comparaciones múltiples entre las variables se usaron pruebas de Tukey ( $p < 0.05$ ) en el programa JMP<sub>IN</sub> (versión 4.04). Las variables que no se distribuyeron de forma normal fueron analizadas por la prueba no paramétrica Kruskal Wallis ( $p < 0.05$ ) y como prueba posteriori Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons en el programa Statistix 8 (versión 8.0).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 FASE DE LABORATORIO

#### 5.1.1 Descripción y análisis preliminar del suelo.

Antes de la contaminación del suelo con los residuos de destilación de alquitrán la concentración de TPH fue de  $1,200 \pm 0.1$  mg/kg<sub>ps</sub>. El suelo presentó un pH básico ( $8.6 \pm 0.1$ ) y contenidos de materia orgánica de  $8.0 \pm 1.1$ . Estos valores han sido reportados dentro de un rango medio en estudios de biorremediación de suelos contaminados (Tabla 11) (Margesin *et al.*, 2003). Al mismo tiempo se estableció que la conductividad eléctrica fue baja  $4.6 \pm 0.3$  ms/cm.

En nuestro estudio la materia orgánica presente pudo generar una baja disponibilidad de los contaminantes para los microorganismos y además bajas tasas de degradación. Breedveld y Sparrevik (2000) encontraron contenidos medios de materia orgánica (17%), resultando en una fuerte sorción de compuestos hidrofóbicos como los PAHs. Los residuos de alquitrán aplicados en el estudio están compuestos por creosota la cual contiene principalmente PAHs, los cuales son fuertemente sorbidos por la materia orgánica y las partículas del suelo (Mueller *et al.*, 1989; Breedveld y karslen, 2000).

El suelo presentó una textura franco-arenosa con altos porcentajes de arena ( $50 \pm 0.1\%$ ), limo ( $47 \pm 0.1\%$ ), y arcilla ( $3.0 \pm 0.4\%$ ). Estas características aumentan la porosidad del suelo, permitiendo la libre circulación de aire y facilitando las labores de contaminación artificial y homogenización con residuos de la destilación de alquitrán (Atlas, 1981; Vidali, 2001). Estos porcentajes son muy similares a los encontrados por Bento y colaboradores (2005) quienes reportaron un porcentaje de arena del 61%, limo del 32% y de arcilla 7% para un estudio de biorremediación de suelos contaminados con diesel.

En cuanto a los macro-nutrientes (fósforo y nitrógeno), el suelo tuvo bajas concentraciones (Tabla 11), por lo tanto se hizo necesario balancear la concentración de nutrientes mediante la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC) para suplir las necesidades fisiológicas de las bacterias del

suelo (Bem Systems, 1998; Guri, 1998; Cleves y Sandoval, 2003; Vallejo, 2004; Viñas *et al* 2005).

El recuento de heterótrofos totales en el suelo ( $3.8 \pm 0.4 \times 10^6$  UFC/g<sub>ps</sub>) fue adecuado para la biorremediación de suelos contaminados con HCs ya que se requiere una concentración mayor de  $1 \times 10^6$  UFC/g<sub>ps</sub> para que se alcance una aceptable actividad biodegradadora por los microorganismos (Leahy y Colwell, 1990; EPA, 2000). Los recuentos menores a este valor podrían indicar la presencia de compuestos tóxicos tanto orgánicos como inorgánicos y esto hace necesario incrementar la densidad poblacional incorporando microorganismos nativos o de cepas comerciales al suelo (Alexander, 1999; Eweis *et al.*, 1999). De acuerdo a lo anterior el recuento de microorganismos heterótrofos y degradadores fue alto (Tabla 11).

**Tabla 11.** Características fisicoquímicas del suelo empleado para la mezcla de residuos de destilación de alquitrán.

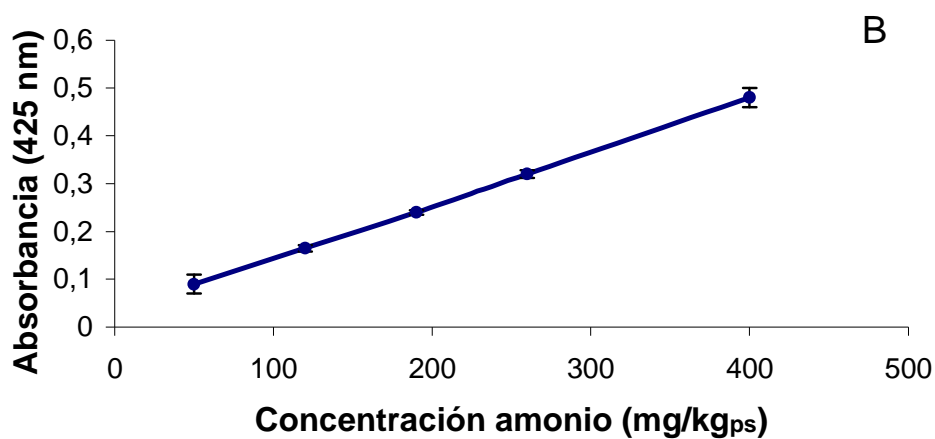
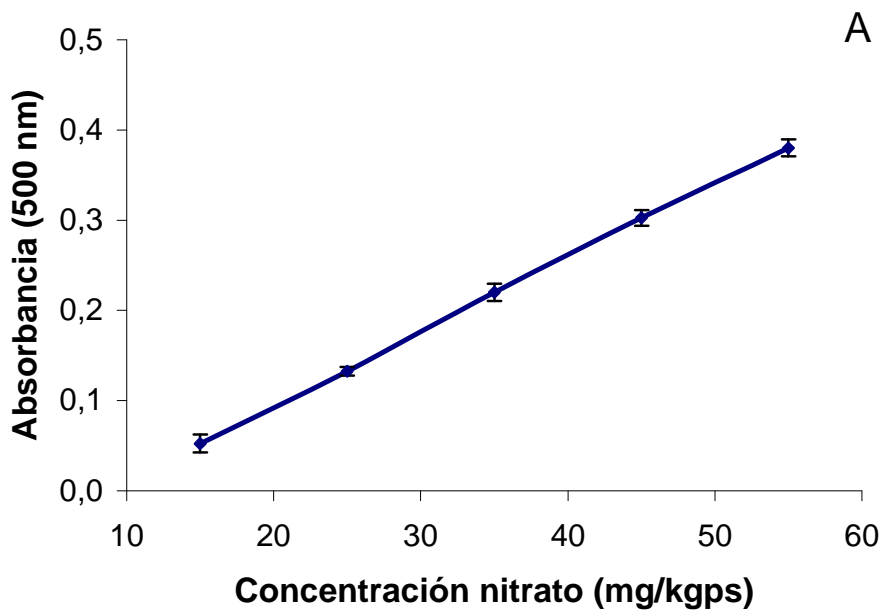
Análisis	Resultado
pH	8.6±0.10
Carbono orgánico (%)	8.0±1.10
Textura	franco-arenosa
Saturación de Humedad (%)	35±1.40
Densidad (gr/cc)	1.2±0.10
Conductividad eléctrica (ms/cm)	4.6±0.30
Fósforo PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> (mg/kg)	8.0±0.00
Amonio N-NH <sub>4</sub> (mg/kg)	15.0±0.00
Nitrato N-NO <sub>3</sub> (mg/kg)	5.0±0.00
Potasio (me/100 cc)	0.38±0.00
Calcio (me/100 cc)	7.61±0.02
Magnesio (me/100 cc)	2.71±0.01
Sodio (me/L)	44.55±0.05
Concentración inicial de TPH (mg/kg <sub>ps</sub> )	1,200 ± 0.10
Recuento de heterótrofos (UFC/g <sub>ps</sub> )	$3.8 \pm 0.43 \times 10^6$
Recuento de degradadores (NMP/g <sub>ps</sub> )	$1.2 \pm 0.70 \times 10^5$

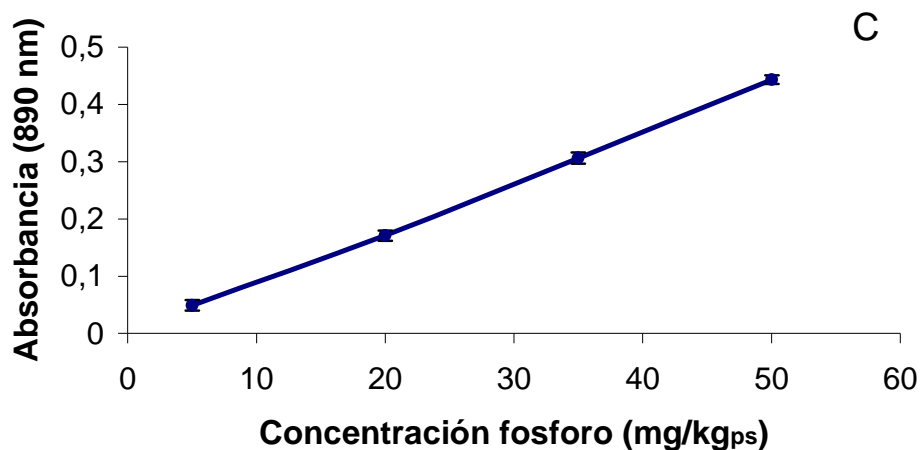
## 5.1.2 Estandarización de técnicas.

### 5.1.2.1 Determinación de nutrientes.

Para la determinación de amonio, nitrato y fósforo en las muestras de suelo de los diferentes tratamientos se realizó una curva de calibración

(absorbancia vs concentración) para cada uno de los nutrientes analizados utilizando soluciones estándar previamente preparadas (Anexo 1). Los valores de  $r^2$  fueron mayores a 0.99 indicando un comportamiento lineal y una alta correlación entre los valores de absorbancia y concentración (Tabla 12) (Figura 22).





**Figura 22.** Curvas de calibración para nitrato (A), amonio (B), fósforo (C). Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n=2).

**Tabla 12.** Valores obtenidos para las curvas de calibración de nutrientes.

Nutriente	Pendiente (absorbancia/mg/L)	Intercepto (absorbancia)	r <sup>2</sup>
Amonio	0.0011±0.0001	0.0314±0.0009	0.9997
Nitrato	0.083±0.00028	0.0738±0.0066	0.9987
Fósforo	0.0088±0.0001	0.0008±0.0003	0.9993

### 5.1.3 Aislamiento e identificación de bacterias nativas degradadoras.

De las diluciones más altas del NMP se aislaron 18 morfotipos de bacterias degradadoras de HCs. Estos morfotipos fueron caracterizados macroscópicamente, microscópicamente y por pruebas bioquímicas utilizando el sistema BBL Crystal<sup>®</sup> (Anexo 16). Se identificaron 5 especies de bacterias, siendo *Pseudomonas putida* la especie más abundante con ocho morfotipos, representando el 44.4% del total de morfotipos identificados (Tabla 13). Las características ambientales de las especies aisladas se resumen en la Tabla 14.

**Tabla 13.** Especies bacterianas identificadas mediante BBL Crystal ®.

Espece	Indol/oxidasa	% identificación
<i>Pseudomonas putida</i>	-/-	0.91
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-/-	0.98
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	-/-	0.98
<i>Chromobacterium violaceum</i>	-/-	0.99
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-/-	0.99

**Tabla 14.** Características ambientales de las cepas aisladas e identificadas.

Bacteria	Características	Referencia
<i>Pseudomonas putida</i>	Degradador de una amplia variedad de HCs y PAHs como naftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno, pireno. Es encontrada principalmente en los suelos, aunque también es causante de infecciones nosocomiales.	Krieg y Holt, 1984; Ortega <i>et al.</i> , 2003; Vallejo, 2004, Rodrigues <i>et al.</i> , 2005.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Degradador principalmente de PAHs al incrementar su solubilidad. Es capaz de degradar compuestos como la atrazina, y derivados del petróleo. Igualmente esta asociada a infecciones del tracto urinario y respiratorio en la especie humana.	Madigan <i>et al.</i> , 1998; Straube <i>et al.</i> , 2003; Abalos <i>et al.</i> , 2004.
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	Degrada principalmente diesel, fracciones de petróleo y PAHs. Pueden causar algunas infecciones nosocomiales.	Madigan <i>et al.</i> , 1998; Ruberto <i>et al.</i> , 2003; Vallejo, 2004.
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Degradador de HCs como alcanos. Ocasionalmente patógeno en mamíferos causando serias infecciones.	Krieg y Holt, 1984; Vallejo, 2004.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Metaboliza PAHs como fluoranteno, pireno, benzoantraceno y coroneno entre otros. Encontrado en la flora nativa de la faringe. Infecta heridas, vías urinarias y causa septicemias.	Krieg y Holt, 1984; Madigan <i>et al.</i> , 1998; Juhasz y Naidu, 2000; Maldonado, 2004.

Todas las bacterias identificadas en el estudio han sido reportadas como microorganismos degradadores de un amplio rango de HCs, principalmente PAHs, diesel, fenol, benceno, tolueno y etilbenceno (Whyte *et al.*, 1997; Madigan *et al.*, 1998; Alexander, 1999; Maldonado, 2004; Vallejo, 2004; Guevara, 2005)

El género *Pseudomonas* ha sido ampliamente investigado y existen varios estudios en los cuales se ha analizado su capacidad para degradar HCs. Stallwood y colaboradores (2005) evaluaron la biorremediación en suelos antárticos contaminados con combustible usando bioaumentación y bioestimulación y encontraron que *Pseudomonas* ST41 creció en un amplio rango de HCs a 4°C, igualmente fue el género más abundante en los microcosmos ensayados. Ururahy y colaboradores (1998) realizaron un estudio para la biodegradación de residuos de petróleo a través de bioaumentación encontrando que *Pseudomonas* sp. fue el género que predominó en las diferentes tratamientos evaluadas.

Por otra parte Cerniglia (1992) demostró que las bacterias gram negativas con forma de bacilos como las del género *Pseudomonas* sp. tienen la capacidad de degradar PAHs. Whyte y colaboradores (1997) aislaron *Pseudomonas* sp. de un suelo antártico contaminado con petróleo y evaluaron su capacidad para degradar alcanos y naftaleno por diferentes rutas catabólicas. Margesin y colaboradores (2003) encontraron la prevalencia de *P. putida* en la degradación de PAHs en suelos alpinos de Austria contaminados con desechos industriales empleando análisis de hidridización con PCR.

*Pseudomonas putida* fue utilizada por Rodrigues y colaboradores (2005) para investigar las características del crecimiento bacteriano en presencia de fluoreno y fenantreno, sus resultados indicaron que esta bacteria fue capaz de crecer gracias a la producción de sustancias poliméricas extracelulares que promueven disponibilidad de compuestos hidrofóbicos. En otro estudio Ortega y colaboradores (2003) aislaron tres cepas; *Pseudomonas stutzeri*, *Pseudomonas alcaligenes* y *Pseudomonas putida* las cuales degradaron naftaleno, fenantreno, antraceno y pireno gracias a la quimiotaxia hacia estos compuestos y a la producción de biosurfactantes.

Los biosurfactantes han sido propuestos como un método promisorio para aumentar la tasa de degradación de compuestos hidrofóbicos en suelos contaminados, aunque algunas veces pueden inhibir el crecimiento de

especies de *Pseudomonas* sp. cuando se usa antraceno como único recurso de carbono (Chen *et al.*, 2000). Johnsen y Karslon (2004) registraron que el biosurfactante que produce *Pseudomonas aeruginosa* le facilita el crecimiento en fenantreno y naftaleno al incrementar la solubilidad de los PAHs sugiriendo que el mismo microorganismo puede promover la biodisponibilidad de este sustrato.

Abalos y colaboradores (2004) describieron el aumento significativo de la biodegradación de PAHs y derivados alquilados del crudo Casablanca de un consorcio microbiano en presencia de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10. Straube y colaboradores (2003) estudiaron la biorremediación en suelos contaminados con PAHs usando bioestimulación y bioaumentación con adición de *Pseudomonas aeruginosa* retenida en vermiculita y obtuvieron un 87% de disminución de PAHs después de 11 meses.

*Pseudomonas* sp. también ha sido usada en trabajos de biorremediación por bioaumentación para degradar herbicidas como la atrazina llegando a una rápida mineralización en 28 días de tratamiento (Silva *et al.*, 2004). Koutny y colaboradores (2003) lograron aislar especies del género *Pseudomonas* en suelos prístinos del sur de Siberia las cuales fueron capaces de degradar fenol a diferentes concentraciones.

*Stenotrophomonas maltophilia* anteriormente conocida como *Xanthomonas maltophilia* es capaz de metabolizar una gran variedad de HCs (Madigan *et al.*, 1998). Esta especie fue evaluada en medio líquido de sales (BSM) para la degradación de fluoranteno y cometabolismo de otros PAHs, incluyendo el pireno, benzoantraceno y coroneno (Juhász y Naidu, 2000). Este género también fue aislado de un suelo contaminado con PAHs en un estudio realizado por Boonchan y colaboradores (1998) en el cual evaluaron la habilidad de *S. maltophilia* para degradar compuestos de alto peso molecular en suelos contaminados con PAHs, en sus resultados encontraron que esta especie fue capaz de degradar pireno como único recurso de carbono y energía, así como otros PAHs con más de siete anillos de benceno.

Igualmente *Stenotrophomonas maltophilia* fue aislada en el estudio realizado por Maldonado (2004) en el cual se evaluó la atenuación natural de hidrocarburos de petróleo como supresores de polvo en carreteras sin pavimentar. En la evaluación encontraron que esta especie fue capaz de degradar los lodos aceitosos de alto peso molecular, los cuales son adicionados a las carreteras.

Por otro lado utilizando técnicas de biología molecular se investigaron las comunidades bacterianas de muestras de crudo en Japón usando electroforesis en gradiente de gel denaturante (DGGE), los perfiles demostraron que *Stenotrophomonas maltophilia* fue la mas abundante y frecuentemente encontrada en las muestras analizadas (Yoshida *et al.*, 2005).

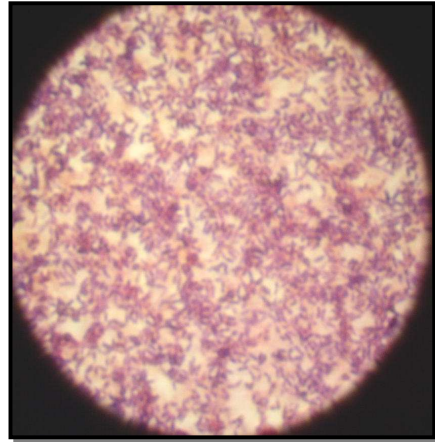
Otra especie aislada en el presente estudio fue *Acinetobacter iwooffi* la cual fue encontrada como la bacteria dominante en un estudio para degradar diesel en un biorreactor simple logrando una remoción del 90% después de 45 días de tratamiento. En el mismo estudio se encontró que *A. iwooffi* degrada rápidamente crudo y diesel gracias a la producción de biosurfactantes y además puede competir eficientemente con otros degradadores de HCs como *Pseudomonas* sp. (Gallego *et al.*, 2001).

En el estudio realizado por Vallejo (2004) en donde se evaluó la bioestimulación en la biodegradación de TPH en suelos contaminados con petróleo, se logro aislar e identificar *Acinetobacter iwooffi* de los suelos utilizados durante el estudio.

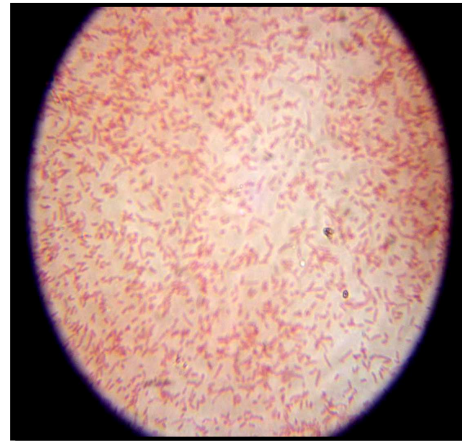
Por otra parte en un estudio realizado para la biorremediación de suelos árticos contaminados con combustible se investigó el efecto de la flora natural, la bioestimulación y la bioaumentación con adición de *Acinetobacter* sp. En sus resultados encontraron una remoción de HCs del 75% para el tratamiento de bioaumentación siendo este el mejor tratamiento (Ruberto *et al.*, 2003). Guevara (2005) evaluó la degradación de 5 cepas de *Acinetobacter* sp. aisladas de suelos contaminados con lodos aceitosos con adición de nutrientes en microcosmos, con la mejor cepa (PUJ-M-Bio-USBA-98) obteniendo un 51% de degradación de TPH durante 98 días.

#### **5.1.4 Observación macroscópica y microscópica de las bacterias identificadas.**

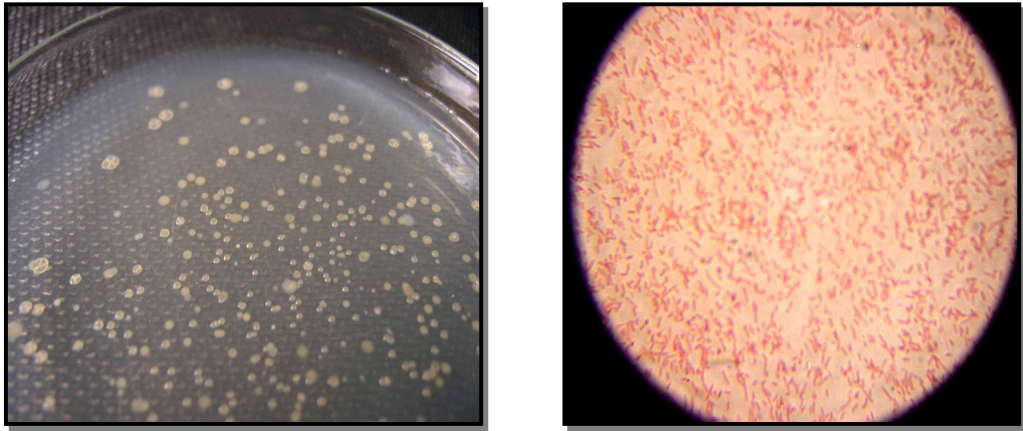
A continuación se presenta la morfología macroscópica y microscópica de las bacterias degradadoras aisladas e identificadas mediante las pruebas BBL Crystal (Figuras 23 - 27) (Tabla 15).



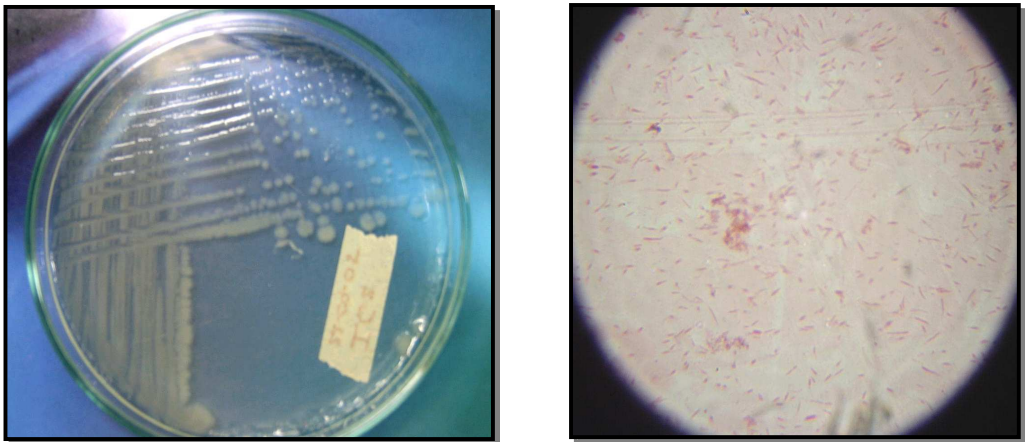
**Figura 23.** Crecimiento macroscópico en agar nutritivo y morfología microscópica (100x) de *Pseudomonas putida*.



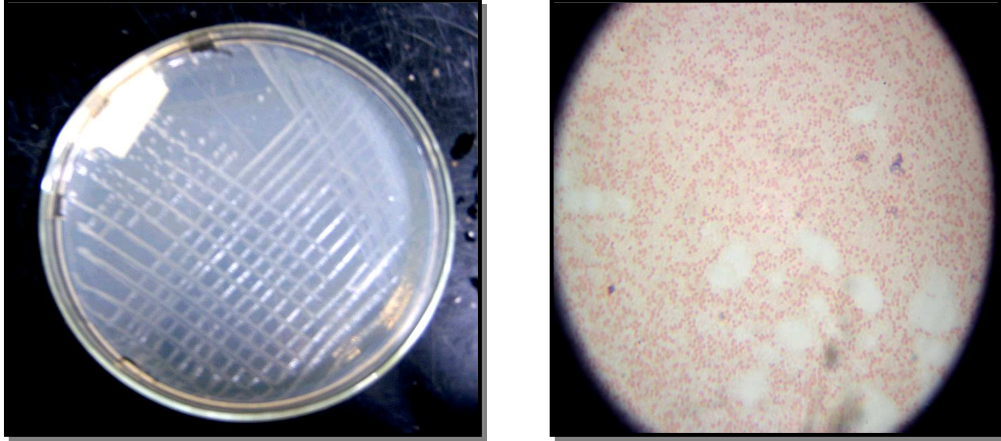
**Figura 24.** Crecimiento macroscópico en agar nutritivo y morfología microscópica (100x) de *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figura 25.** Crecimiento macroscópico en agar nutritivo y morfología microscópica (100x) de *Acinetobacter iwoffii*.



**Figura 26.** Crecimiento macroscópico en agar nutritivo y morfología microscópica (100x) de *Chromobacterium violaceum*.



**Figura 27.** Crecimiento macroscópico en agar nutritivo y morfología microscópica (100x) de *Stenotrophomonas maltophilia*.

**Tabla 15.** Características macroscópicas y microscópicas de los morfotipos de bacterias degradadoras aisladas del suelo.

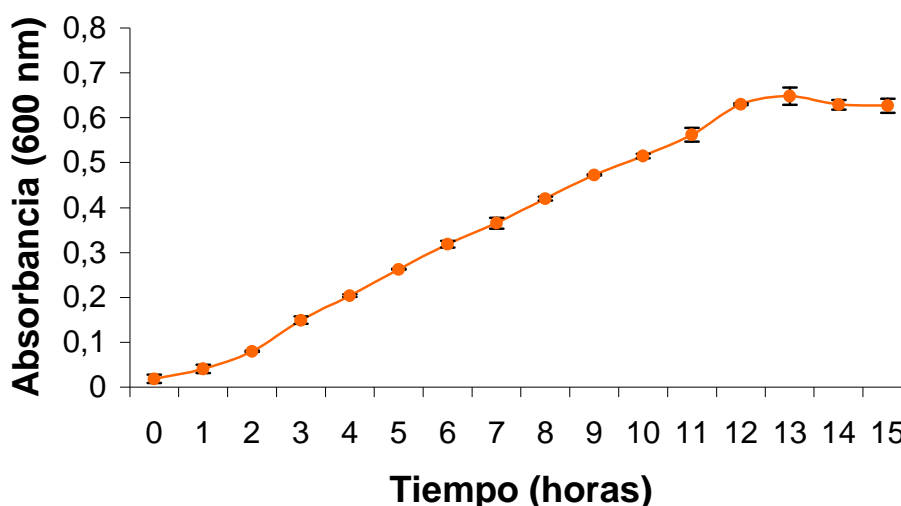
Morfotipos	Características Microscópicas	Características Macroscópicas			
		Color	Textura	Forma	Aspecto
1	Cocobacilos Gram negativos rectos	Blanca	Cremosa	Plana	Brillante
2	Cocobacilos Gram negativos rectos	Blanca	Cremosa	Convexa	Opaca
3	Cocobacilos Gram negativos rectos	Blanca	Cremosa	Plana	Brillante
4	Bacilos Gram negativos rectos	Blanca	Cremosa	Convexa	Brillante
5	Cocobacilos Gram negativos curvos	Rosada	Mucoide	Plana	Brillante
6	Cocobacilos Gram negativos rectos	Marrón	Blanda	Convexa	Brillante
7	Cocobacilos Gram negativos rectos	Marrón	Blanda	Convexa	Brillante
8	Cocobacilos delgados Gram negativos	Crema	Mucoide	Convexa	Brillante
9	Cocobacilos delgados Gram negativos	Crema	Mucoide	Convexa	Brillante
10	Cocobacilos delgados Gram negativos	Blanca	Cremosa	Convexa	Brillante
11	Cocobacilos delgados Gram negativos	Blanca	Cremosa	Convexa	Brillante
12	Cocobacilos delgados Gram negativos	Blanca	Mucoide	Convexa	Brillante
13	Cocobacilos delgados Gram negativos	Blanca	Cremosa	Convexa	Brillante
14	Cocobacilos Gram negativos	Blanca	Mucoide	Convexa	Brillante
15	Cocobacilos Gram negativos	Blanca	Mucoide	Plana	Brillante
16*	Bacilos Gram positivos filamentosos esporulados	Beige	Dura	Plana	Opaca
17*	Bacilos Gram positivos filamentosos esporulados	Beige	Dura	Plana	Opaca
18*	Bacilos Gram positivos filamentosos esporulados	Beige	Mucoide	Convexa	Opaca

\*Los morfotipos 16, 17 y 18 no fueron identificados bioquímicamente porque el objetivo era trabajar con bacterias gram negativas, las cuales han sido reportadas como las más eficientes en la biorremediación.

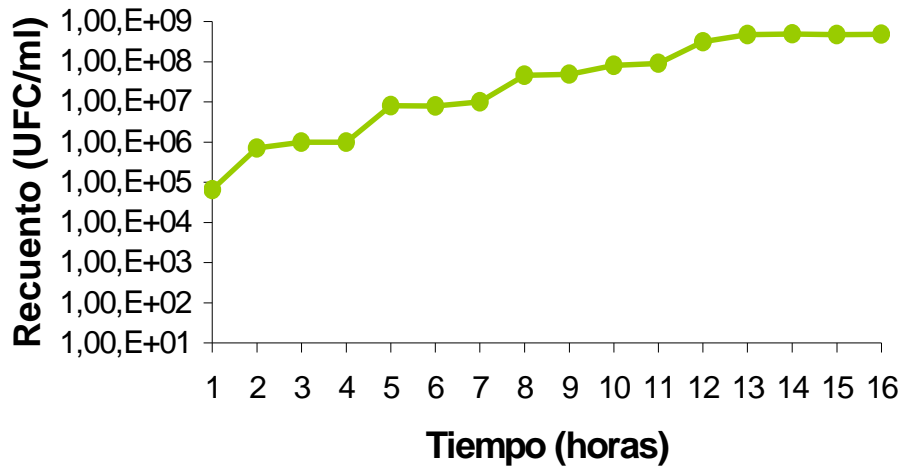
### 5.1.5 Curva de crecimiento de *Pseudomonas putida*.

Las curvas de crecimiento se realizaron para conocer el tiempo en el cual se obtiene una densidad de microorganismos mayor de  $10^8$  UFC/ml. Durante los procesos de bioaumentación se ha determinado que es necesario alcanzar densidades de microorganismos degradadores superiores o iguales a  $10^8$  UFC/ml. Después de adicionar el consorcio bacteriano al suelo contaminado ocurre una disminución significativa de la concentración de microorganismos, por esta razón es necesario aplicar altas concentraciones con el propósito de alcanzar altas tasas de degradación durante el proceso de biorremediación (Margesin y Schinner, 1997; Juhasz *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2000; Mishra *et al.*, 2001; Abalos *et al.*, 2004; Bento *et al.*, 2005; Guevara, 2005).

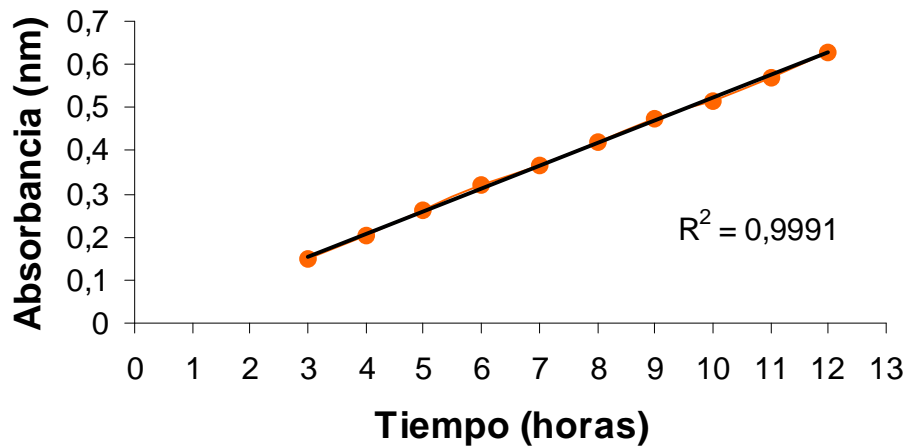
Se estableció que el máximo crecimiento de *Pseudomonas putida* se dió a las 12 horas, alcanzando una concentración celular de  $4.75 \times 10^8$  UFC/ml, a  $37^\circ\text{C}$  a 600 nm y 200 rpm (Figuras 28-30). *Pseudomonas putida* fue elegida para realizar las curvas de crecimiento por ser la especie más abundante encontrada en los aislamientos del suelo previos a la contaminación. Igualmente se escogió esta especie porque en estudios como el realizado por Ortega y colaboradores (2003) se determinó que el crecimiento de *P. putida* es más rápido y este crecimiento fue acompañado por una mayor cantidad de PAHs degradados.



**Figura 28.** Curva de crecimiento *Pseudomonas putida* (absorbancia vs. tiempo x 16h) a  $37^\circ\text{C}$  (n=2).



**Figura 29.** Curva de crecimiento *Pseudomonas putida* (recuento vs. Tiempo x 16 h) a 37 °C.



**Figura 30.** Fase exponencial de crecimiento para *Pseudomonas putida* durante 16 horas a 37 °C.

## 5.2 FASE DE CAMPO

### 5.2.1 Análisis de pH.

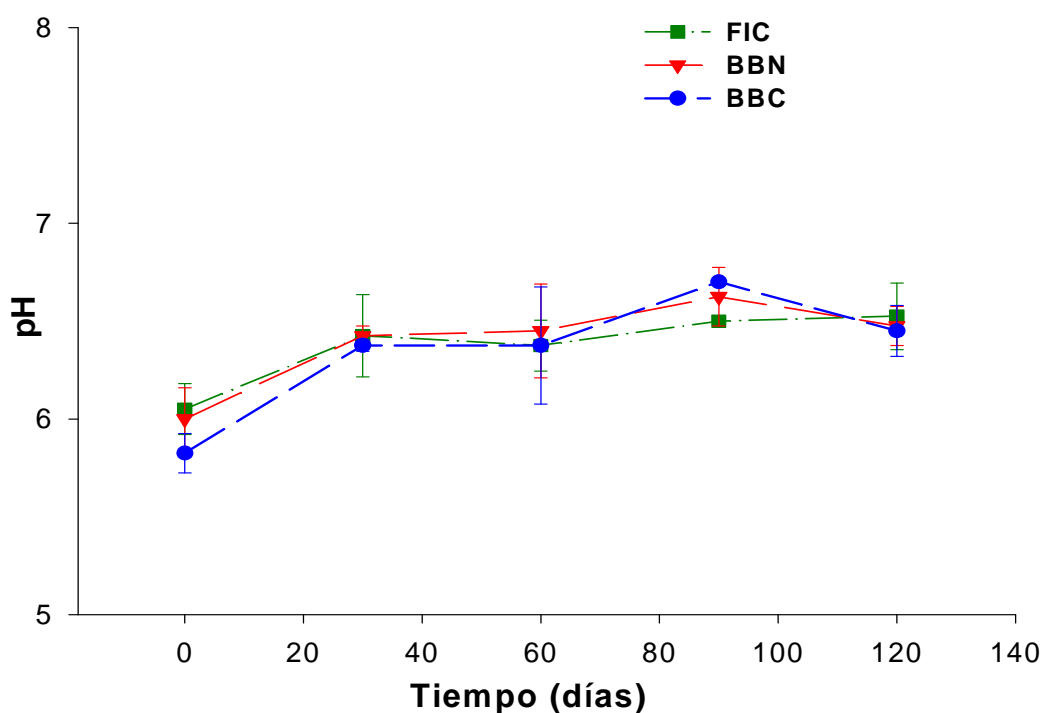
El suelo previo a la contaminación presentó un pH ligeramente básico ( $8.6 \pm 0.14$ ;  $n=4$ ). Este pH puede estar relacionado con la presencia de sodio en el suelo ( $44.55 \pm 0.05$  me/L), el cual forma sales de cloruro de sodio que incrementan el pH. De la misma forma el suelo fue básico debido a la presencia una concentración de HCs ( $1,200 \pm 0.10$  mgTPH/kg<sub>ps</sub>). Se ha establecido que cierto tipo de compuestos poseen un pH alto, elevando este valor en el suelo. En estos casos puede considerarse acidificar el suelo con azufre, ácido sulfúrico, sulfato de aluminio o hierro (Alexander, 1999; Eweis *et al.*, 1999).

Aunque el pH fue básico (8.6) no se ajustó esperando que disminuyera tras la adición de los residuos al suelo y se obtuviera a un valor cercano a la neutralidad (Vallejo, 2004). Valores comprendidos entre 5.0 y 7.0 han sido reportados como óptimos para desarrollar los procesos de biodegradación de TPH en suelos (Dibble y Bartha, 1979; Kastner *et al.*, 1997; Alexander, 1999; Eweis *et al.*, 1999). El pH observado en el presente estudio puede compararse con el reportado por Hansen y colaboradores (2004) quienes registraron un pH de 9.0 al inicio de un tratamiento de biolabranza durante seis meses en un suelo contaminado con PAHs y pentaclorofenol en El Dorado (Arkansas).

Una vez se contaminó el suelo con los residuos de alquitrán y durante el resto del estudio el pH se situó dentro del rango de neutralidad (5.0 y 7.0) (Tabla 16), disminuyendo desde ( $8.6 \pm 0.14$ ) hasta ( $6.7 \pm 0.11$ ,  $n=4$ ). Se ha establecido que valores extremos del pH resultan en efectos negativos sobre las habilidades de los microorganismos para el proceso de mineralización (Dibble y Bartha, 1979; Marín *et al.*, 2005). La disminución en el pH (8.6 a 6.7) es comparable con la observada por Hejazi y Husain (2004) quienes registraron una disminución del pH de 9.6 a un valor comprendido entre 7.1 y 8.4 al adicionar lodos de petróleo a un suelo arenoso durante un estudio de biolabranza.

**Tabla 16.** Valores de pH durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n=4).

Tratamiento	Tiempo (días)				
	0	30	60	90	120
FIC	5.85±0.13	6.43±0.21	6.38±0.13	6.50±0.00	6.53±0.17
BBN	5.93±0.05	6.43±0.05	6.45±0.24	6.63±0.15	6.48±0.10
BBC	5.65±0.13	6.38±0.03	6.38±0.30	6.70±0.00	6.45±0.13



**Figura 31.** Valores de pH durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n=4).

Posterior a la adición del fertilizante (triple 15) a los tratamientos FIC, BBN y BBC se produjo un nuevo descenso del pH hasta valores ligeramente ácidos entre  $5.6\pm 0.13$  y  $5.9\pm 0.05$  para BBN y BBC, respectivamente (Figura 31). Alexander (1999) estableció que valores de pH muy ácidos generalmente inhiben la degradación de los contaminantes en el ambiente. Sin embargo, no se ajustó el pH debido a que valores ligeramente ácidos han sido reportados en diversos estudios en suelos contaminados en los cuales se

han desarrollado procesos de bioremediación de manera exitosa (Vecchioli, 1997; Margessin y Schinner, 1997; Maldonado, 2004; Juhasz *et al.*, 2005).

En términos generales a través del estudio, el pH no presentó diferencias significativas (DS) entre los tratamientos; (Kruskall Wallis, all pairwise,  $p < 0.05$ ;  $n = 80$ ). De la misma forma el pH se mantuvo entre (5.6 y 7.0) el cual es considerado como ligeramente ácido y neutro (IGAC, 1994), excepto durante el primer mes donde se registraron valores promedio más ácidos ( $5.8 \pm 0.1$ ) (Tabla 16). Los valores de pH del presente estudio son comparables con los encontrados por Pardo y colaboradores (2005) quienes registraron en un estudio de biolabranza durante cuatro meses valores de pH entre 4.2 a 6.7 en un tratamiento con FIC, mientras en el control abiótico fue de 4.7 a 6.8.

Durante los treinta días iniciales ocurrió un incremento general del pH para los tratamientos. Este aumento pudo llegar a favorecer la actividad de las bacterias nativas adaptadas a un ambiente de pH más básico y estuvo representado por un mayor número de heterótrofos ( $3.5 \pm 0.2 \times 10^7$  UFC/g<sub>ps</sub>) y de degradadores ( $1.3 \pm 0.4 \times 10^3$  NMP/g<sub>ps</sub>) específicamente en BBN. El aumento del pH coincidió con una liberación del nitrato incrementando su concentración en el suelo (ver numeral 5.2.4.2) (Tabla 16).

Probablemente el incremento del pH en los primeros treinta días se originó en las concentraciones de nutrientes adicionadas a los tratamientos y a su rápida solubilización en el suelo. Atagana y colaboradores (2003) reportaron importantes variaciones del pH en todos los tratamientos durante seis semanas de incubación. Ellos apreciaron que la actividad microbiana siguió incrementándose durante este periodo, teniendo mayor disminución del pH en las proporciones de nutrientes más bajas, mientras en las más altas tuvo un incremento en el pH de 6.48 a 6.57.

A partir del día treinta el pH se mantuvo estable en un rango entre (6.3 y 6.7) en todos los tratamientos. Esta situación estuvo acompañada por un marcado descenso de la concentración de fósforo a partir del primer mes del estudio. Igualmente se conoce que las propiedades del suelo tales como pH neutro y un alto contenido de carbonato resultan en una elevada capacidad buffer del suelo lo cual facilita la biodegradación. Este comportamiento fue descrito por Liebeg y Cutright (1999) quienes lo atribuyeron a una rápida liberación del fósforo, el cual actúa como un amortiguador en el suelo impidiendo que el pH sufra grandes cambios durante el tiempo de tratamiento.

Otro factor fundamental en la estabilidad del pH radicó en el contenido de humedad en los tratamientos, puesto que se ha determinado que el pH cambia con el contenido de humedad del suelo, este pH a su vez influyó una mayor degradación de TPH. Atagana y colaboradores (2003) encontraron una baja degradación de creosota en un tratamiento, lo cual fue atribuido a un pH bajo (4.8) comparado con los otros tratamientos evaluados que tuvieron 6.1 y 6.7 respectivamente.

Cabe resaltar que el pH de FIC en el día cero ( $5.9 \pm 0.1$ ) fue superior al  $5.3 \pm 0.0$  en un tratamiento de bioestimulación con FIC y muy similar al  $5.8 \pm 0.0$  de un control reportado por Vallejo (2004) durante su estudio para la evaluación de la bioestimulación adicionando nutrientes en la biodegradación de TPH en un suelo contaminado con petróleo. Se ha determinado que dicha reducción de pH fue producida por una reacción global ácida generada por un proceso de nitrificación del amonio del fertilizante triple 15 a nitrato donde se liberan iones  $H^+$  produciendo un fenómeno de acidez (Sylvia *et al.*, 1998).

### 5.2.2 Análisis de humedad.

El contenido de humedad a través del estudio estuvo comprendido entre  $16.4 \pm 0.7\%$  y  $13.0 \pm 0.3\%$ , mientras la capacidad de campo del suelo fue calculada en 18.8% (Tabla 17). El contenido de humedad no fue SD a través del estudio entre los tratamientos (Kruskal Wallis, all pairwise,  $p < 0.05$ ,  $n = 80$ ). La capacidad de campo (18.8%) estuvo dentro de los valores normalmente registrados, puesto se ha establecido que la capacidad de campo de un suelo generalmente se encuentra comprendida entre 18 y 30% (Eweis *et al.*, 1999). Diversos estudios coinciden en que este rango 18 y 30% puede considerarse como adecuado para llevar a cabo procesos de biorremediación en condiciones óptimas (Dibble y Bartha 1979; Roberts, 2000; Erickson *et al.*, 1993; Sabaté *et al.*, 2004; Hansen, 2004; Viñas *et al.*, 2005).

**Tabla 17.** Porcentajes de humedad durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar ( $n=4$ ).

Tratamiento	Tiempo (días)				
	0	30	60	90	120
FIC	$13.95 \pm 0.29$	$15.09 \pm 0.85$	$16.41 \pm 0.76$	$15.68 \pm 0.77$	$14.33 \pm 1.42$
BBN	$15.00 \pm 0.00$	$15.00 \pm 0.66$	$15.55 \pm 0.45$	$14.47 \pm 0.78$	$15.03 \pm 1.62$
BBC	$15.00 \pm 0.82$	$15.06 \pm 0.92$	$15.43 \pm 0.63$	$13.08 \pm 0.59$	$13.85 \pm 0.51$

Sin embargo, la capacidad de campo fue baja debido a la poca cantidad de arcilla encontrada en el suelo (3%), esto provocó una baja de retención de agua. Atagana (2004) registró un contenido de humedad entre 16.9% y 24% representando el 52.8 y 75% de la capacidad de campo a 32% p/p durante un estudio sobre bioremediación de suelos contaminados con creosota en Sudáfrica implementando la técnica de biolabranza. Hansen y colaboradores (2004) determinaron como optima la capacidad de campo de 23% al inicio de un estudio de biorremediación de PAHs durante seis meses implementando biolabranza.

Tanto la capacidad de campo (18.8%) como el contenido de humedad ( $14.9\pm 0.8\%$ ), pueden compararse con los reportados por Hejazi y Husain (2004) en un estudio sobre el desempeño de un proceso de biolabranza bajo condiciones áridas, donde tuvieron un suelo con una capacidad de campo de 16.5%. Ellos calcularon que el contenido de humedad para lograr una óptima actividad degradativa microbiana debería estar comprendida entre el 30 y 90% de la capacidad de campo y estimaron que para su estudio la humedad del suelo debería permanecer entre 5 y 15% de contenido de humedad.

El porcentaje de humedad se mantuvo sin fluctuaciones a lo largo de los ciento veinte días de investigación ( $14.86\pm 0.82\%$ ), la escasa fluctuación favoreció el desarrollo de otras variables como el pH y nutrientes (Figura 32). El porcentaje inicial de humedad de todos los tratamientos estuvo representado por diferentes fuentes como la humedad de los residuos de alquitrán y el agua adicionada con los fertilizantes inorgánicos disueltos. En los tratamientos la humedad se mantuvo por la adición semanal de 18 L de agua por parcela y algunas lluvias ocasionales con vientos muy fuertes que arrastraron un poco de agua hacia las parcelas.

El porcentaje de humedad en que se mantuvieron los tratamientos ( $14.9\pm 0.8\%$ ) favoreció significativamente la degradación promedio de TPH al final del estudio la cual fue de 42.93%. Se ha establecido que un bajo porcentaje de humedad puede originar una baja disponibilidad del contaminante (Alexander, 1999; Eweis *et al.*, 1999). Hejazi y Husain (2004) relacionaron el bajo porcentaje de humedad en el suelo y la disminución de la biodegradación en algunos periodos de tiempo, lo cual fue atribuido a los efectos de la aireación y la evaporación del agua por altas temperaturas ambientales.

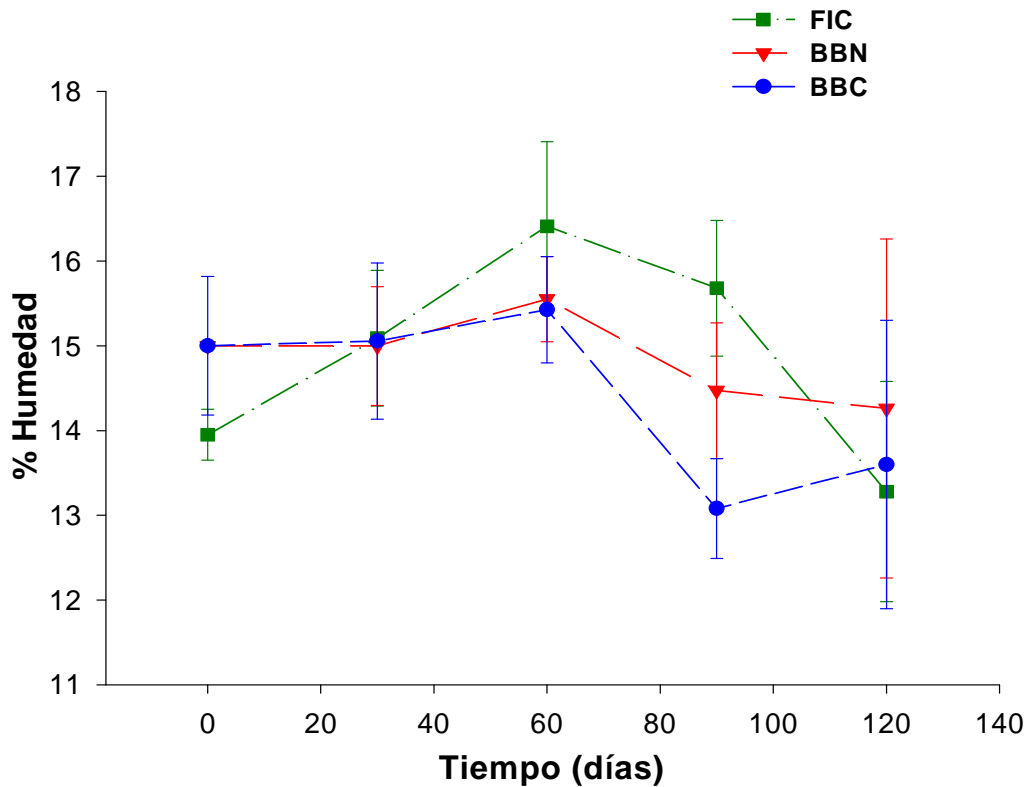
Se ha determinado que los suelos que presentan bajos porcentajes de humedad generan zonas muy secas dando origen a una sensible

disminución de la actividad microbiana. Por el contrario si existe un exceso de humedad se llega a inhibir el intercambio de gases y el transporte de oxígeno a través de la matriz del suelo, lo que a su vez provoca la aparición de zonas anaerobias, hecho que puede dar lugar a la eliminación de microorganismos aeróbios y a la proliferación de anaerobios y facultativos (Eweis *et al.*, 1999).

Aunque el contenido de humedad ( $14.9\pm 0.8\%$ ) a través del estudio fue favorable para la bioremediación, difiere de otros estudios de biolabranza como el realizado por Vallejo (2004) que registró un promedio de  $27\pm 5\%$  de porcentaje de humedad, mientras que representó más del doble del reportado por Cleves y Sandoval (2001) en una zona árida y con bajas precipitaciones registrando un promedio de  $6.1\%$  al final de su estudio. La humedad influye de manera significativa en la actividad biológica, principalmente porque el agua es un componente esencial del protoplasma bacteriano, por lo tanto, su abastecimiento garantiza el mantenimiento de funciones metabólicas como el crecimiento (Eweis *et al.*, 1999).

En el presente estudio varios factores afectaron el contenido de humedad, uno ellos fue la evaporación por las altas temperaturas diurnas ( $32.4\pm 0.9^{\circ}\text{C}$ ) registradas durante los primeros meses del estudio. Esta pérdida pudo incrementarse por efecto de la mezcla semanal al aumentar la evaporación del agua adicionada. Huesemann y colaboradores (2004) registraron que una frecuente aireación puede causar efectos negativos en la estructura del suelo, especialmente en suelos húmedos aumentando las tasas de evaporación. Hejazi y Husain (2004) encontraron que las frecuentes labores de aireación en clima árido y seco no afectaron la estructura del suelo, pero sí influyeron en la fuerte volatilización del contaminante.

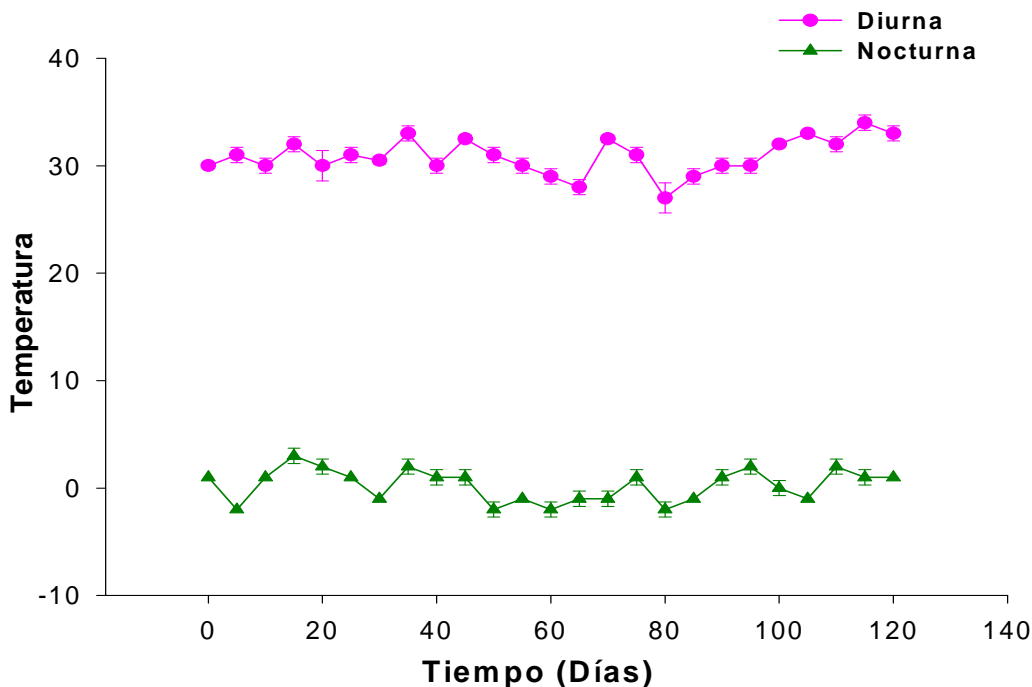
La textura franco-arenosa del suelo generó algunas pérdidas de agua por lixiviación, debido a que presentó un alto porcentaje de arena ( $50.0\pm 0.1\%$ ) y limo ( $47.0\pm 0.1\%$ ), mientras tuvo un bajo porcentaje de arcillas ( $3.0\pm 0.4\%$ ). Esto provocó que el agua suministrada no fuera totalmente retenida y pasara a través de los intersticios del suelo. La densidad y la textura del suelo determinan la capacidad de campo, la cual determina la cantidad de agua que puede ser retenida afectando el oxígeno disponible, el potencial redox y la actividad microbiana (Alexander, 1999).



**Figura 32.** Porcentajes de humedad durante el estudio. Se presenta el promedio y la desviación estándar (n=4).

### 5.2.3 Análisis de temperatura ambiental.

La temperatura ambiental diurna durante el estudio estuvo comprendida entre 33.5 y 27°C, con un promedio de  $30.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ . Igualmente se establecieron grandes diferencias entre la temperatura ambiental diurna y nocturna ( $\pm 30^\circ\text{C}$ ) (Figura 33). Generalmente las diferencias de temperatura no llegan a afectar la actividad bacteriana en el suelo, porque la temperatura del suelo es mayor que la ambiental. La temperatura es un factor importante que gobierna la actividad microbiana, afectando las tasas degradativas de los microorganismos por su efecto sobre la naturaleza física y la composición química del crudo, particularmente el área disponible para la colonización microbiana (Atlas, 1991; Eweis *et al.*, 1999).



**Figura 33.** Valores de temperatura durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación (n=4)

La temperatura no presentó DS a lo largo del tiempo (Kruskall Wallis, all pairwise,  $p < 0.05$ ;  $n = 80$ ). Se ha establecido que la mayoría de los experimentos de biorremediación son llevados a cabo en temperaturas entre 25 y 30°C (Margesin y Schinner 1999b; Chaîneau *et al.*, 2005; Juhasz *et al.*, 2005). Nuestros valores de temperatura máxima (33.5°C) pueden compararse con los registrados por Hejazi y Husain (2004) que registraron en el área de estudio un promedio mensual de temperatura de 35°C en agosto; con un máximo diario entre los 27 y 46°C, mientras entre mayo y septiembre la temperatura estuvo arriba de 30°C.

La degradación de TPH fue favorecida por las altas temperaturas ( $30.86 \pm 0.34^\circ\text{C}$ ) produciendo un aumento de las poblaciones entre dos y cuatro ordenes de magnitud; aunque la adición de nutrientes y los aceptores de electrones y también juegan un papel importante en la degradación (Tablas 21 y 22). La actividad microbiana en el suelo se eleva hasta un límite de aproximadamente 45°C, más allá de esta temperatura la actividad microbiana desciende y prácticamente cesa (Leahy y Colwell, 1990; Pardo *et*

*al.*, 2004). La temperatura ejerce un gran control sobre la actividad de los microorganismos porque la totalidad de las reacciones de degradación microbiológica se producen a través de la actividad de las enzimas, a un mayor incremento de la temperatura, se eleva la actividad metabólica debido a la presencia de más energía en el sistema (Margesin y Schinner, 1999b; Hejazi y Husain, 2004).

La homogeneidad de la mezcla suelo-residuos de los tratamientos pudo ser afectada significativamente por la temperatura. Se ha determinado que la temperatura es interactiva con factores como la cantidad y calidad de la mezcla de HCs, ha bajas temperaturas la viscosidad del crudo se incrementa, la volatilización de los alcanos de cadena corta se reduce y su solubilidad en agua es incrementada (Atlas, 1991; Margesin y Schinner, 1999b).

#### **5.2.4 Análisis de nutrientes.**

El contenido de nutrientes encontrados en el suelo antes de agregar el fertilizante fue de 15.0, 5.0 y 8.0 mg/kg<sub>ps</sub> para amonio, nitrato y fósforo, respectivamente. Estas concentraciones de nutrientes son bajas para llevar a cabo el proceso de bioremediación de forma exitosa, puesto que se ha establecido que generalmente la biorremediación de HCs en suelos necesita una relación C:N:P 100:10:1 (Dibble y Bartha, 1979; Cerniglia, 1992; Breedveld y Sparrevik, 2000; Armendariz *et al.*, 2004; Hansen, 2004; Pardo *et al.*, 2005). En este caso el suelo después de adicionar los residuos presentó una concentración de 13,540.0±4.2 mgTPH/kg<sub>ps</sub> y debería tener 1,354 mgN/kg<sub>ps</sub> y 135.4 mgP/kg<sub>ps</sub>, esto provocó un desvalance entre los HCs y los nutrientes limitando el crecimiento microbiano y así como la degradación de los contaminantes.

La adición de residuos de alquitrán al suelo provocó un mayor desbalance C:N:P. Cuando se introduce creosota en el suelo esto origina un desbalance en la proporción de nutrientes debido a los altos niveles de carbono agregado, por esta razón se hace necesario la adición de nitrógeno y fósforo en el suelo contaminado con HCs para incrementar la biodegradación de los componentes y aumentar la abundancia de las especies microbianas (Alexander, 1999). Los macronutrientes que limitan la degradación microbiana en el suelo son el nitrógeno y el fósforo, ellos toman electrones de los contaminantes para reducir los nutrientes a la forma química utilizada por los constituyentes celulares, y para generar la energía necesaria que posibilite la síntesis y el mantenimiento de la biomasa (Rittmann y McCarty, 1997, Madigan *et al.*, 1998; Eweis *et al.*, 1999).

#### 5.2.4.1 Amonio.

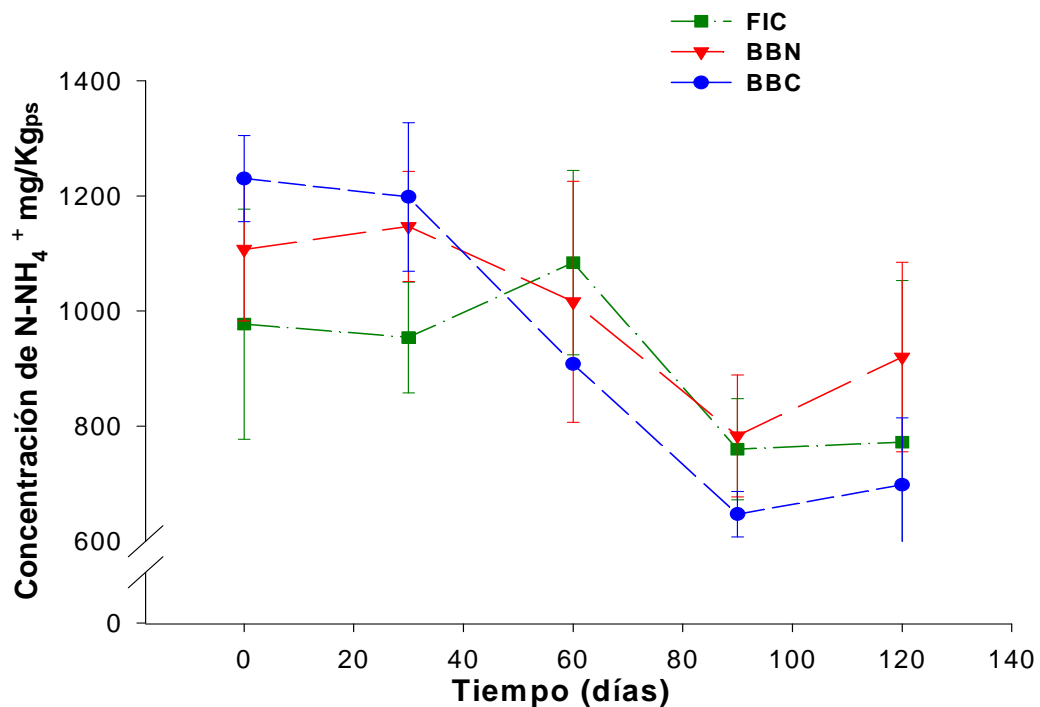
Las concentraciones iniciales de amonio después de adicionar el fertilizante triple 15, fueron mayores en BBC  $1,230.2 \pm 74.7$  mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg<sub>ps</sub>, comparado con BBN fue  $1,107.0 \pm 123.8$  mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg<sub>ps</sub> y FIC de  $976.75 \pm 199.5$  mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg<sub>ps</sub>. Estas diferencias en las concentraciones de amonio ocurrieron porque tanto el medio de soporte que contenía las bacterias comerciales como la melaza utilizada para la bioaumentación de las bacterias nativas contenían diferentes cantidades de amonio.

**Tabla 18.** Concentración de amonio (mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg<sub>ps</sub>) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n=4).

Trata	Tiempo (días)				
	0	30	60	90	120
FIC	976.75±199.5	953.63±96.4	1,084.31±160.0	760.45±88.0	771.81±280.8
BBN	1,107.00±123.8	1,146.81±95.5	1,016.13±209.4	783.18±105.7	919.54±164.4
BBC	1,230.25±74.7	1,197.95±129.0	908.17±112.8	646.81±39.3	697.95±116.4

Sin embargo, las concentraciones iniciales de amonio (día cero) no fueron SD entre los tratamientos con fertilizante FIC, BBN y BBC (Kruskall Wallis, all pairwise,  $p < 0.05$   $n=16$ ) registrándose un promedio de concentración de  $1,104 \pm 100.3$  mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg<sub>ps</sub>. La concentración promedio en el día cero mostró que se alcanzó el objetivo de solubilizar rápidamente el amonio y que se dio un consumo constante, puesto no se incremento su valor en los meses siguientes. Estos resultados se produjeron porque el fertilizante inorgánico (triple 15) fue adicionado en su totalidad al inicio del estudio; diluido en agua (12 kg/parcela) para que fuera integrado al suelo de forma rápida, puesto que normalmente este fertilizante es de lenta liberación.

A partir del día treinta hasta el noventa se observó un consumo continuo de amonio, posteriormente la concentración se mantuvo constante hasta la finalización del proyecto (Figura 34). Esta tendencia pudo deberse principalmente al consumo por la actividad metabólica de los microorganismos. Margesin y Schinner (1997b) registraron que el contenido de amonio decreció por la incorporación a la biomasa microbiana y por efectos de su inmovilización a la matriz del suelo, inicialmente registró 200 a 300 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg<sub>ps</sub> y posteriormente se redujo a 120 mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg<sub>ps</sub> durante un estudio de biodegradación en suelos alpinos.



**Figura 34.** Concentración de amonio ( $\text{mgN-NH}_4^+/\text{kg}_{\text{ps}}$ ) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar ( $n=4$ ).

Durante el estudio la concentración de amonio en los tratamientos disminuyó en promedio un 27.9% pasando de  $1,104 \pm 100.3 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{kg}_{\text{ps}}$  hasta  $796.43 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{kg}_{\text{ps}}$ , siendo mayor a la reportada por Vallejo (2004) quien tuvo una disminución de 22.21%. Margesin y colaboradores (2000a) concluyeron que la adición de grandes cantidades de recursos de carbono en los contaminantes tienden a resultar en una rápida disminución de los nutrientes inorgánicos tales como nitrógeno y fósforo. La proporción exacta de nutrientes adicionados depende de la tasa y la extensión que alcancen los químicos presentes en el sitio, de la biodisponibilidad de nutrientes en el suelo y del tipo de nutrientes que se vayan a utilizar (Leahy y Colwell, 1990).

El contenido de amonio en FIC varió muy poco los primeros treinta días ( $23.1 \pm 3.5 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{kg}_{\text{ps}}$ ), luego se dió un incremento hasta los sesenta días ( $103.7 \pm 2.7 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{kg}_{\text{ps}}$ ). Este incremento coincidió con el mayor porcentaje de reducción de TPH en este mismo periodo de tiempo (76%).

Entre el día sesenta y ciento veinte el amonio en FIC disminuyó ( $312.5 \pm 3.2$  mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg<sub>ps</sub>), esta disminución coincidió con un incremento en los TPH. Chaineau y colaboradores (2005) observaron el efecto de la concentración de nutrientes en la biodegradación de crudo asociado con las poblaciones microbianas del suelo y demostraron que niveles adecuados de fertilización incrementan las tasas de biodegradación mientras que la fertilización excesiva tiene un efecto negativo.

Tanto BBN como BBC presentaron tendencias similares en el contenido de amonio a través del estudio. Los primeros treinta días fueron estables y luego presentaron un significativo descenso hasta el día noventa ( $455.5 \pm 3.5$  mgN-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>/kg<sub>ps</sub>). Posiblemente el descenso se debió a que el amonio fue usado para biomasa tanto en heterótrofos como en degradadores, observándose un aumento en densidad de dos órdenes de magnitud (Tabla 20 y 21). El amonio es el nutriente más utilizado en bioremediación porque es más fácilmente asimilable por los microorganismos aun cuando otras formas de nitrógeno como el nitrato estén presentes (Townsend y Bonner, 2000; Atagana, 2004).

#### 5.2.4.2 Nitrato.

Las concentraciones promedio de nitrato para los tratamientos con fertilizante fueron ( $315.9 \pm 42.7$  mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg<sub>ps</sub>), sin presentarse DS entre tratamientos al inicio del estudio (Kruskall Wallis, all pairwise,  $p < 0.05$   $n=16$ ) (Tabla 19). En el día cero se observó que las concentraciones promedio de nitrato ( $335 \pm 5.3$  mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg<sub>ps</sub>) fueron mucho más bajas que las del amonio ( $1,10 \pm 6.6$  mgN-NH<sub>4</sub>/kg<sub>ps</sub>) representando el 23.28% del nitrógeno total aplicado. Esto se debe a que el nitrógeno contenido en el fertilizante (triple 15) esta compuesto básicamente por amonio y una tercera parte por nitrato (Vallejo, 2004).

**Tabla 19.** Concentración de nitrato (mgN-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg<sub>ps</sub>) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar ( $n= 4$ ).

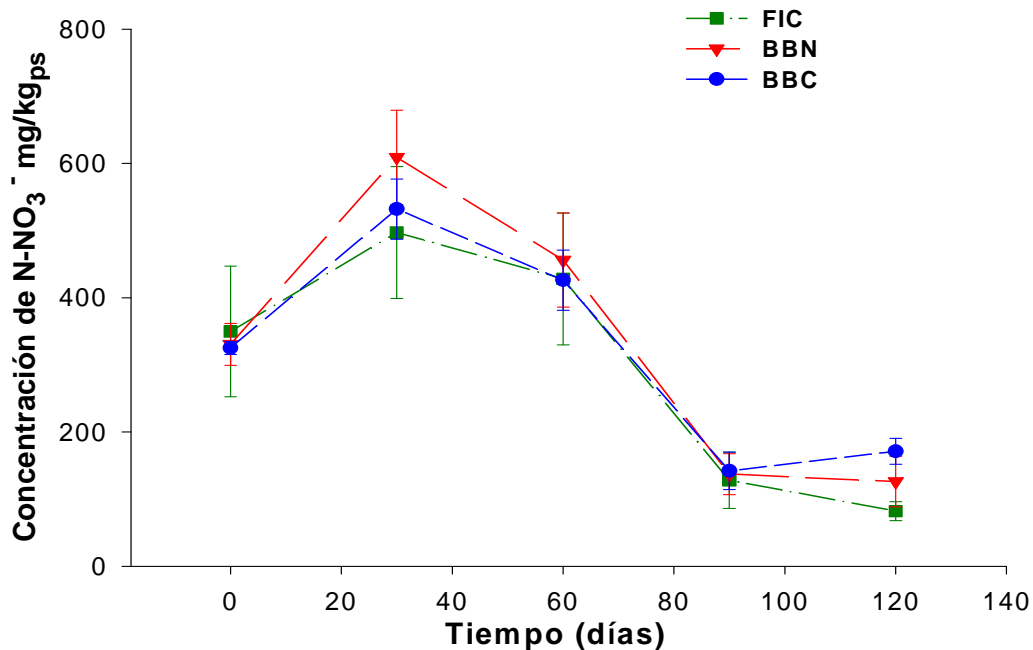
Tratamiento	Tiempo(días)				
	0	30	60	90	120
FIC	349.50±97.34	496.75±98.18	428.25±21.56	128.13±42.04	81.80±14.03
BBN	330.50±31.16	608.75±70.28	456.25±56.82	136.80±30.35	126.14±37.62
BBC	325.25±9.60	531.50±44.84	425.50±39.45	142.13±27.72	170.80±19.21

El aumento de  $195.6 \text{ mgN-NO}_3^-/\text{kg}_{\text{ps}}$  después de treinta días en los tratamientos con fertilizante mostró que el  $\text{NO}_3^-$  no se solubilizó tan rápido como el amonio. Un aumento similar también fue reportado por Vallejo (2004) explicando esto como un proceso de lenta liberación del fertilizante. Después del día treinta en FIC se presentó un descenso general del nitrato hasta los noventa días, de allí en adelante se mantuvo estable o con un leve descenso (Figura 35). Este descenso se originó en el consumo por parte de los microorganismos para su crecimiento.

Posiblemente el incremento de concentración del nitrato al inicio del estudio este relacionado con el hecho de que los nutrientes presentan numerosas interacciones con las bacterias, los contaminantes, el suelo y los aceptores de electrones, esto en conjunto afecta significativamente el proceso de biorremediación. En algunos casos los nutrientes no llegan hasta los microorganismos porque se dan limitantes en la transferencia de masas (Liebeg y Cutright, 1999).

Pardo y colaboradores (2004) en su estudio sobre el efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de HCs en suelos contaminados con petróleo, observaron niveles decrecientes de nitrato y amonio a lo largo de cuatro meses. Ellos atribuyeron este descenso a la asimilación total del nitrógeno adicionado por los microorganismos y por lo tanto no se presentó una liberación de forma inorgánica al medio del fertilizante triple 15.

La pequeña disminución ( $68.5 \pm 12.5 \text{ mgN-NO}_3^-/\text{kg}_{\text{ps}}$ ) en FIC entre los días treinta y sesenta coincidió con un incremento de  $130.68 \text{ mgN-NH}_4^+/\text{kg}_{\text{ps}}$  y con una reducción de TPH de 76%. Mathew y colaboradores (2006) relacionaron la disminución del contenido de nitrato con aumentos en la concentración de amonio y fosfato, así mismo esta situación confirma la actividad metabólica probablemente por muerte y lisis bacteriana. Margesin y Schinner (1997b) encontraron una disminución en la concentración de nitrato del 20%, atribuyendo este descenso al metabolismo microbiano y a procesos de desnitrificación durante algunas etapas donde la humedad se estabilizó en el tratamiento.



**Figura 35.** Concentración de nitrato ( $\text{mgN-NO}_3^-/\text{kg}_{\text{ps}}$ ) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar ( $n=4$ ).

La significativa disminución del contenido de nitrato ( $409.1 \pm 21.1 \text{ mgN-NO}_3^-/\text{kg}_{\text{ps}}$ ) en todos los tratamientos entre los treinta y noventa días se puede atribuir al metabolismo microbiano. Las fuentes de nitrógeno que se incorporan a los tratamientos de bioestimulación son utilizados primordialmente para el crecimiento microbiano; aunque algunas veces sirve como aceptor de electrones si es adicionado como nitrito o nitrato, y cuando los niveles de oxígeno son bajos (Liebeg y Cutright, 1999). En el estudio el nitrato no fue aceptor de electrones porque se suministro una adecuada aireación. Cuando se produce la respiración aeróbica el oxígeno es el aceptor de electrones dominante (Townsend y Bonner, 2000).

#### 5.2.4.3 Fósforo.

La concentración promedio de fósforo en el suelo (después de la adición de los residuos) durante el día cero fue de  $212.5 \pm 21.9 \text{ mgP-PO}_4^{-3}/\text{kg}_{\text{ps}}$ , sin diferencias entre los tratamientos (Tabla 20). El fósforo estuvo presente en menores concentraciones que el nitrógeno debido a que el fósforo adicionado es fuertemente adsorbido por el suelo, provocando que sea menos

disponible. Viñas (2005) encontró que el fósforo adicionado se presentó en concentraciones menores que las del nitrógeno ya que el fósforo es fuertemente absorbido por el complejo suelo y resulta en parte inactivo debido a las características ácidas del medio que desencadenaron una fuerte fijación de los aniones sobre todo el fosfato que se incorpora a las arcillas del suelo.

**Tabla 20.** Concentración de fósforo ( $\text{mgP-PO}_4^{-3}/\text{kg}_{\text{ps}}$ ) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar ( $n= 4$ ).

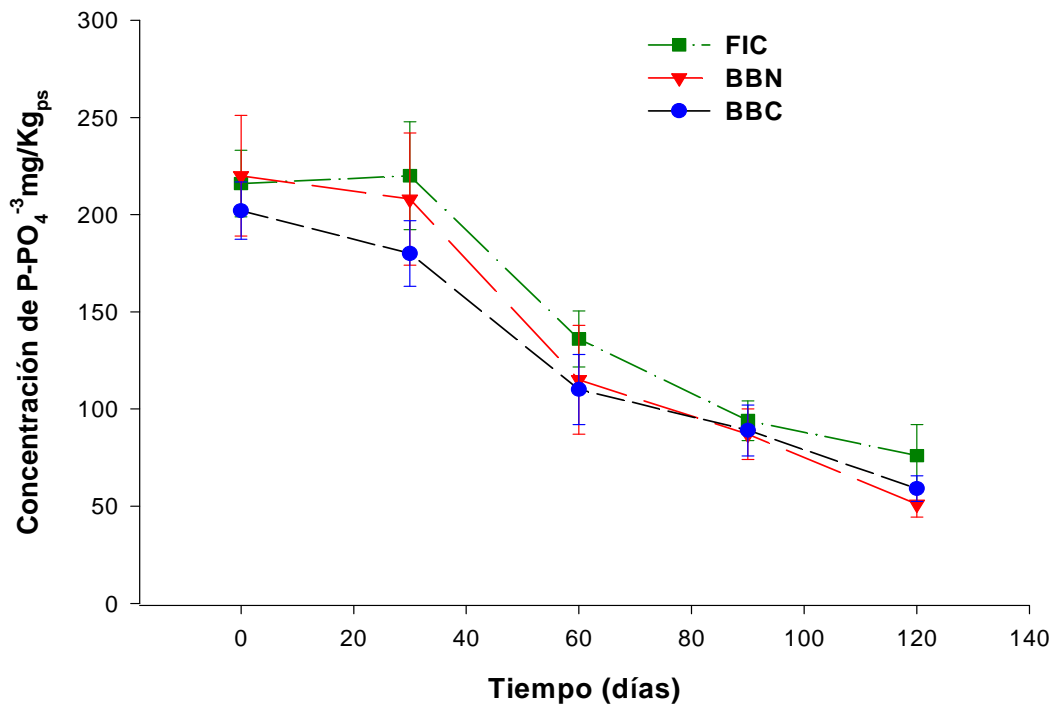
Tratamiento	Tiempo(días)				
	0	30	60	90	120
<b>FIC</b>	215.55±17.07	220.20±27.79	136.48±14.45	94.04±10.20	76.02±15.98
<b>BBN</b>	220.49±27.15	207.99±34.25	114.53±27.55	87.35±12.84	51.31±6.65
<b>BBC</b>	201.60±14.72	179.94±16.84	110.03±18.10	89.24±13.06	68.60±6.56

La concentración del fósforo no mostró DS entre los tratamientos a lo largo del estudio (Kruskall Wallis, all pairwise,  $p<0.05$   $n=80$ ). Esta tendencia tuvo un efecto positivo en la degradación de TPH puesto que facilito el crecimiento de los microorganismos degradadores. Las adiciones de fósforo y nitrógeno inorgánico han demostrado que incrementan significativamente las tasas de transformación de los HCs, sin un aparente incrementó en la biomasa microbiana (Breedveld y Karslen 2000).

A partir del día cero se produjo un descenso del fósforo en los tratamientos (Figura 36). Este descenso se atribuyó a una función metabólica de los microorganismos por inmovilización, en este proceso se incorpora el fosfato soluble al interior del microorganismo y está mediada por el rango del pH que este presente en el suelo (Atlas, 1988; Roberts, 2000; Vallejo, 2004). Pardo y colaboradores (2004) encontraron que después de la aplicación del fertilizante triple 15 se generó un aumento de nitrato, amonio y fósforo en el suelo, debido a que se estimularon los procesos de mineralización microbiana liberando un exceso de nutrientes en forma inorgánica.

La continua reducción de fósforo durante el estudio es el resultado de la combinación de dos factores como un rango de pH neutro (5.6 y 7.0) y un contenido de humedad entre  $13.95\pm 0.29\%$  y  $16.41\pm 0.76\%$ , estos factores facilitaron la liberación de fósforo a partir del día treinta. Atagana (2004) observó un pH cercano al rango neutral durante todo su experimento, lo cual facilitó la solubilización del fósforo. Atagana y colaboradores (2003)

determinaron que la movilización de nutrientes en el suelo y la incorporación de estos nutrientes a la biomasa de los microorganismos requiere cantidades apropiadas de agua.



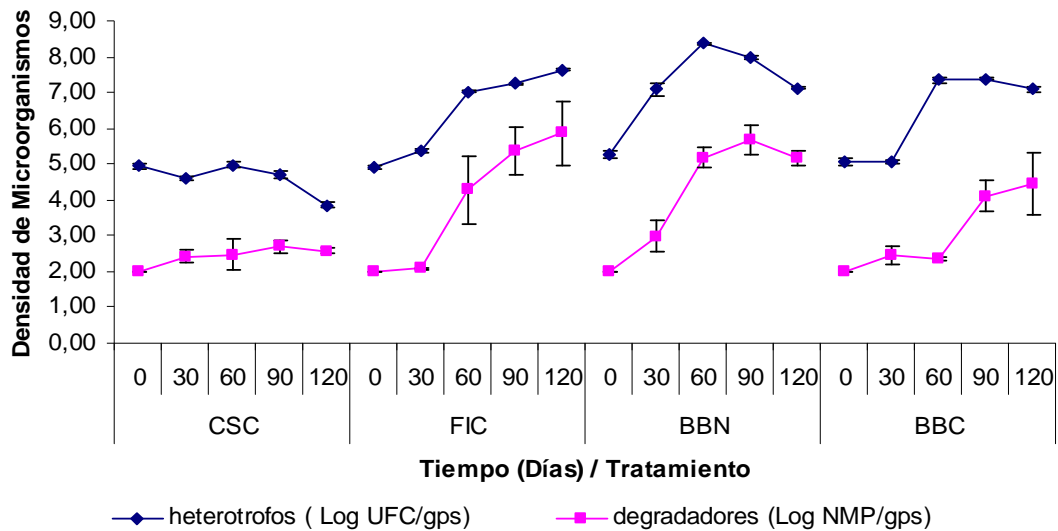
**Figura 36.** Concentración de fósforo (mgP-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/kg<sub>ps</sub>) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n=4).

Margesin y Schinner (1997b) realizaron un estudio de 155 días sobre biodegradación de diesel implementando bioestimulación con fertilizante triple 15. Ellos registraron un contenido de fósforo que permaneció estable durante varios meses y solo disminuyó en un 20% hacia el final de la investigación, esto se presentó porque existió diferente tipo de inmovilización del fósforo en la forma de fosfato férrico-aluminio y de fosfato de calcio. Estos últimos son difíciles de disolver y fueron los responsables de los diferentes contenidos de fósforo en los suelos estudiados.

### 5.2.5 Análisis microbiológicos

Durante los ciento veinte días de estudio el recuento de microorganismos heterótrofos totales fue mayor entre dos y tres órdenes de magnitud que el

recuento de degradadores. Este comportamiento se debe a que en el suelo no todos los heterótrofos son degradadores pero tienen la habilidad de vivir en presencia de HCs (Figura 37) (Margesin *et al.*, 2003).



**Figura 37.** Densidad de microorganismos heterótrofos y degradadores durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n=4).

### 5.2.5.1 Recuento de microorganismos heterótrofos.

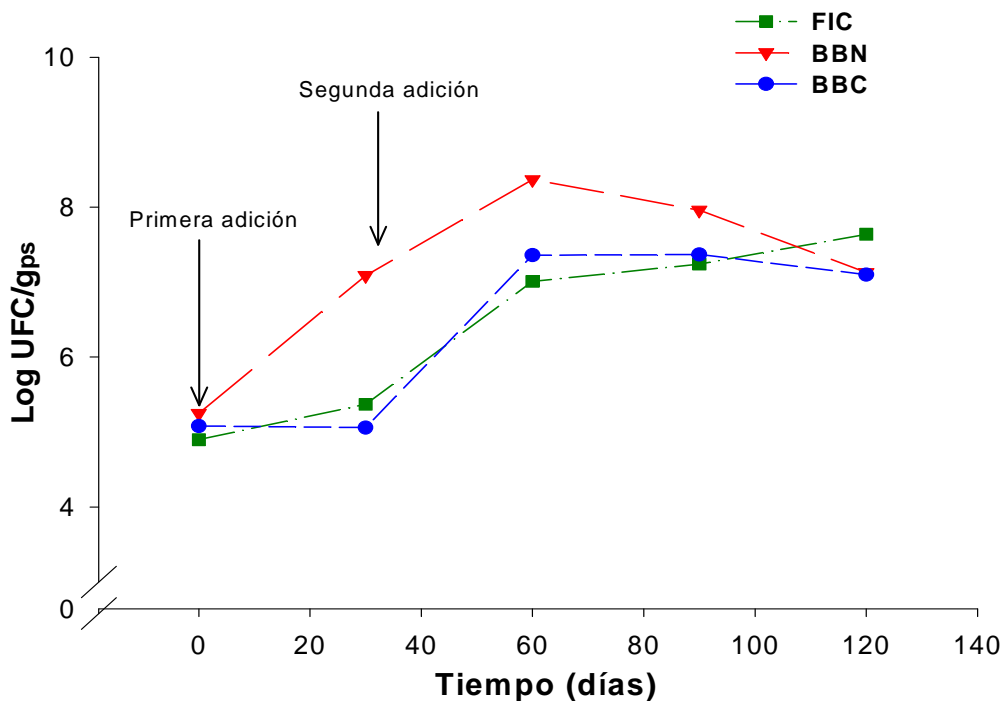
La densidad de microorganismos heterótrofos totales antes de contaminar el suelo fue de  $3.8 \times 10^6 \pm 0.4$  UFC/g<sub>ps</sub>. Esta densidad estaba dentro del rango óptimo para la biorremediación de suelos contaminados con HCs. Se ha establecido que se requiere una concentración inicial mayor a  $1 \times 10^6$  UFC/g<sub>ps</sub> de microorganismos heterótrofos para que se alcance una aceptable actividad degradativa por los microorganismos (Ercoli *et al.*, 2001). Los recuentos de heterótrofos son similares a los reportados por Sabaté y colaboradores (2005), antes de contaminar un suelo con HCs quienes presentaron una densidad de heterótrofos de  $1.8 \times 10^6$  UFC/g<sub>ps</sub>.

**Tabla 21.** Recuento de microorganismos heterótrofos (UFC/g<sub>ps</sub>) durante el estudio. Se presenta el promedio y la desviación estándar (n= 4).

Tratamiento	Tiempo (días)				
	0	30	60	90	120
<b>FIC</b>	8.13±0.05x10 <sup>4</sup>	8.88±0.05x10 <sup>5</sup>	3.02±0.03x10 <sup>7</sup>	2.80±0.03x10 <sup>7</sup>	6.59±0.04x10 <sup>7</sup>
<b>BBN</b>	1.83±0.10x10 <sup>5</sup>	3.53±0.19x10 <sup>7</sup>	3.81±0.04x10 <sup>8</sup>	1.03±0.05x10 <sup>8</sup>	1.88±0.02x10 <sup>7</sup>
<b>BBC</b>	1.30±0.11x10 <sup>5</sup>	1.97±0.03x10 <sup>5</sup>	2.74±0.08x10 <sup>7</sup>	4.12±0.03x10 <sup>7</sup>	1.46±0.08x10 <sup>7</sup>

Después de la adición del consorcio de bacterias nativas se esperaba tener en el suelo una concentración superior a  $1 \times 10^{10}$  UFC/g<sub>ps</sub>, sin embargo, la adición de residuos de alquitrán tuvo efectos negativos sobre los recuentos de heterótrofos, disminuyendo en más de cinco ordenes de magnitud en el día cero, respecto a los conteos previos a la adición ( $3.8 \times 10^6 \pm 0.4$  UFC/g<sub>ps</sub>). El tratamiento con mayor densidad microbiana fue BBN con  $1.83 \pm 0.10 \times 10^5$  UFC/g<sub>ps</sub> y el de menor densidad fue FIC con  $8.13 \pm 0.05 \times 10^4$  UFC/g<sub>ps</sub> (Tabla 21) (Figura 38). Esta notable disminución fue originada por la toxicidad de los residuos de alquitrán, los cuales contienen PAHs de alto peso molecular y han sido reportados como altamente bactericidas (Boldrin *et al.*, 1993; Townsend y Bonner, 2000; Amir *et al.*, 2005; Juhasz *et al.*, 2005a).

Durante el estudio no se presentaron DS entre los tratamientos (Kruskall Wallis  $p < 0.05$ ;  $n = 80$ )., a su vez se estableció que el crecimiento se debió a factores como la adición de agua ya que se conoce que los nutrientes inorgánicos como el triple 15 favorecen el crecimiento de los microorganismos heterótrofos; y el agua es el medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos contaminantes, nutrientes y productos metabolizados van al interior o al exterior de la célula (Rittman y McCarty, 2001). Pardo y colaboradores (2004) durante un estudio de biolabranza utilizando fertilizantes inorgánicos registraron un aumento en el conteo de heterótrofos de  $10^4$  a  $10^6$  en todas las unidades experimentales. Sin embargo, todos los tratamientos fueron superiores a los encontrados en el control biótico.



**Figura 38.** Recuento de microorganismos heterótrofos (UFC/g<sub>ps</sub>) durante el estudio. Se presenta el promedio y la desviación estándar (n=4).

Un efecto inhibitorio sobre los microorganismos nativos pudo producirse por la reducción inicial del pH de 8.6 hasta 5.8 al adicionar los residuos, esto causó una disminución del metabolismo microbiano disminuyendo su crecimiento, posteriormente se adaptaron incrementando su población en tres ordenes de magnitud (Figura 38). Atagana y colaboradores (2003), observaron que los microorganismos involucrados en la utilización de los HCs de creosota en el suelo poseen un amplio rango de tolerancia al pH. Ellos encontraron que los recuentos microbianos se incrementaron hacia la sexta semana entre pH 5.5 y 8.0, sin embargo la máxima actividad fue entre un pH de 6.5 y 7.0.

Todos los tratamientos a partir del día treinta hasta el noventa presentaron un constante crecimiento de los microorganismos heterótrofos de tres órdenes de magnitud (Tabla 21). Sin embargo, en el día ciento veinte se presentó un descenso general en los tratamientos, excepto en FIC y ligeramente en BBC. Este descenso ocurrió probablemente por acumulación de metabolitos

secundarios y a deficiencia de nutrientes. Vallejo (2004) reportó que el descenso en el número de microorganismos heterótrofos al final del estudio fue atribuido a deficiencias en las concentraciones de nitrógeno y fósforo.

### 5.2.5.2 Recuento de microorganismos degradadores de HCs.

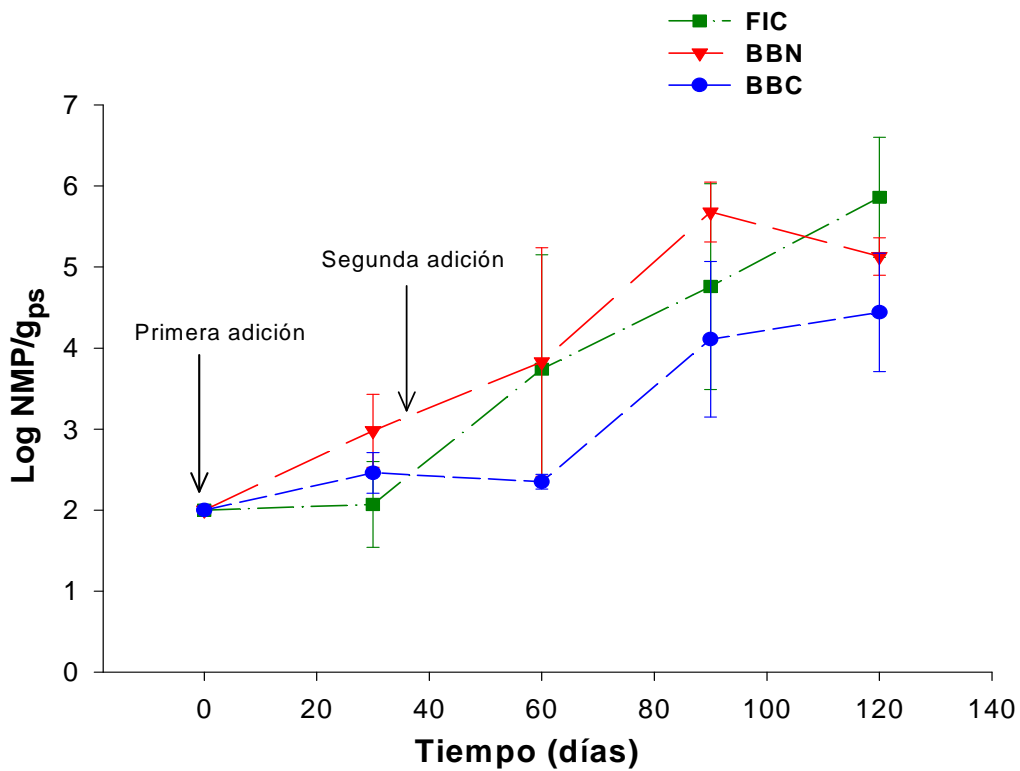
El recuento de microorganismos degradadores previo a la contaminación del suelo fue  $1,2 \times 10^5$  NMP/g<sub>ps</sub>. Esta densidad representó el 3.15% de los heterótrofos totales, siendo considerada suficiente puesto que es necesaria una concentración mínima de  $1.0 \times 10^3$  NMP/g<sub>ps</sub> (Leahy y Colwell, 1990). Igualmente fue muy similar a la registrada por Viñas y colaboradores (2005) quienes presentaron una concentración de  $1.8 \times 10^5$  NMP/g<sub>ps</sub> durante un estudio de un suelo contaminado con creosota. De la misma forma fue superior a la reportada por Vallejo (2004) que presentó una concentración de degradadores entre  $45.0 \times 10^2$  NMP/g<sub>ps</sub> y  $17.0 \times 10^3$  NMP/g<sub>ps</sub> al inicio de su investigación.

**Tabla 22.** Recuento de microorganismos degradadores de HCs (NMP/g<sub>ps</sub>) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n= 4).

Tratamiento	Tiempo (días)				
	0	30	60	90	120
FIC	$1.17 \pm 0.07 \times 10^2$	$1.96 \pm 0.53 \times 10^2$	$5.45 \pm 0.83 \times 10^4$	$3.80 \pm 0.54 \times 10^5$	$1.70 \pm 0.74 \times 10^6$
BBN	$1.42 \pm 0.13 \times 10^2$	$1.29 \pm 0.45 \times 10^3$	$1.83 \pm 0.31 \times 10^5$	$6.34 \pm 0.37 \times 10^5$	$1.61 \pm 0.23 \times 10^5$
BBC	$1.05 \pm 0.16 \times 10^2$	$3.22 \pm 0.25 \times 10^2$	$2.30 \pm 0.09 \times 10^2$	$3.93 \pm 0.96 \times 10^4$	$6.28 \pm 0.73 \times 10^4$

Después de la aplicación de los residuos se presentó una reducción de tres ordenes de magnitud en los degradadores, pasando de una densidad de  $1.2 \pm 1.2 \times 10^5$  NMP/g<sub>ps</sub> a  $1.0 \pm 0.0 \times 10^2$  NMP/g<sub>ps</sub> (Tabla 22) (Figura 39). Debido a los bajos recuentos para degradadores se decidió realizar una segunda adición de bacterias nativas y comerciales después del día treinta. Estos compuestos representan un grado de toxicidad muy elevado para las bacterias, lo cual origina su muerte e inhibición, así como retarda su periodo de adaptación. Huesemann y colaboradores (2004) hallaron que muchos tipos de compuestos inhibitorios del suelo son desconocidos hasta el momento; como los intermediarios de la degradación de los compuestos polares, ellos pueden llegar a restringir importantes funciones de los microorganismos degradadores como su crecimiento y su metabolismo.

A través del estudio no se establecieron DS en el recuento de microorganismos degradadores, entre tratamientos (Kruskal Wallis  $p < 0.05$ ;  $n = 80$ ). Los recuentos no fueron muy altos posiblemente a causa de factores abióticos propios del suelo. Se ha encontrado que en procesos de biorremediación de combustible se redujeron los microorganismos degradadores por causa de un incremento en la salinidad producida por el NaCl (Eweis *et al.*, 1999; Viñas, 2005). Igualmente se estableció una reducción de la actividad microbiana en suelos árticos contaminados con HC's producida por la salinidad y un exceso de nutrientes (Braddock *et al.*, 1997).



**Figura 39.** Recuento de microorganismos degradadores de HC's (NMP/g<sub>ps</sub>) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar ( $n = 4$ ).

Después de treinta días la densidad de degradadores encontrada no fue superior a  $1.2 \pm 0.4 \times 10^3$  NMP/g<sub>ps</sub>, aunque se registró una reducción en los TPH se realizó una segunda adición de bacterias nativas y comerciales

durante la quinta semana adicionando ( $1 \times 10^{11}$  UFC/ml), esperando alcanzar una concentración en el suelo de  $1 \times 10^9$  UFC/g<sub>ps</sub> (Figura 39). Los recuentos menores a  $1 \times 10^3$ - $10^4$  NMP/g<sub>ps</sub> indicaron la presencia de compuestos tóxicos orgánicos y esto hace necesario incrementar la densidad poblacional incorporando microorganismos nativos o cepas comerciales al suelo (EPA, 2000).

A partir del día sesenta se incrementaron en dos órdenes de magnitud los recuentos de degradadores en BBN y BBC, mientras en FIC fue solo de un orden. Este aumento fue producto de la segunda adición de microorganismos y a un consumo de TPH en BBN (34.6%) (Figura 41). Simón y colaboradores (2004) evaluaron dos productos comerciales de bioaugmentación para incrementar la remoción de petróleo en una tierra costera; encontrando que las poblaciones degradadoras de PAHs en los tratamientos contaminados se dio un incremento exponencial posterior a la contaminación del tipo de tres órdenes de magnitud ( $1 \times 10^4$  a  $1 \times 10^7$  UFC/g<sub>ps</sub>) por encima de la población inicial. Ellos concluyeron que el aumento en el número de degradadores es un crecimiento típico como respuesta al abundante recurso de carbono introducido.

El incremento en el número de degradadores registrado en BBC en el día noventa fue desde  $2.30 \pm 0.09 \times 10^2$  NMP/g<sub>ps</sub> hasta  $3.93 \pm 0.96 \times 10^4$  NMP/g<sub>ps</sub>. Esta situación pudo ser causada por una progresiva fase de adaptación de los microorganismos comerciales a los compuestos de alto peso molecular. Es probable que este periodo de tiempo sea necesario para que se produzca la conformación de un consorcio microbiano capaz de utilizar los PAHs de alto peso molecular como recurso de carbono para su crecimiento (Kanaly y Bartha, 1999). Sin embargo, en nuestro estudio este incremento también pudo originarse en el crecimiento de las bacterias nativas.

#### **5.2.6 Análisis de TPH.**

Inicialmente tras la mezcla suelo-residuos de alquitrán las concentraciones de TPH fueron en promedio ( $13,540.0 \pm 4.2$  mgTPH/kg<sub>ps</sub>) (Tabla 23). Estas concentraciones de TPH son similares a las reportadas por otros estudios como en el de Bento y colaboradores (2005) quienes registraron concentraciones iniciales de 12,250 mgTPH/kg<sub>ps</sub> y 10,750 mgTPH/kg<sub>ps</sub>. Por otra parte Viñas y colaboradores (2005) reportaron una concentración inicial de 8,000 mgTPH/kg<sub>ps</sub> considerada como alta.

Las concentraciones de TPH no presentaron DS entre los tratamientos (ANOVA, Tukey  $p < 0.05$ ;  $n = 80$ ). La alta variabilidad en los TPH se originó

principalmente por la formación de bolsillos de contaminación. Los residuos de alquitrán adicionados al suelo son sustancias que pertenecen a la fase no acuosa, dificultando una integración rápida y homogénea al suelo (Alexander, 1999). Por esta causa se hizo necesario realizar una intensa actividad de mezcla y homogenización del suelo antes de iniciar el estudio..

**Tabla 23.** Concentración de TPH (mgTPH/kg<sub>ps</sub>) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n= 4).

Tratamiento	Tiempo (días)				
	0	30	60	90	120
<b>FIC</b>	13,750±3,743	10,800±4,846	3,300±2,136	-	7,400±3,510
<b>BBN</b>	14,125±4,835	8,175±1,043	9,225±5,006	-	9,325±2,338
<b>BBC</b>	12,700±5,724	9,900±716	12,625±1,569	-	6,525±1,592

**Tabla 24.** Porcentajes de remoción de TPH durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n=4).

Tratamiento	% Remoción 30 días	% Remoción 60 días	% Remoción 90 días	% Remoción 120 días
<b>FIC</b>	21.4	76.0	-	46.2
<b>BBN</b>	42.1	34.6	-	34.0
<b>BBC</b>	22.0	0.6	-	48.6

Durante los primeros treinta días se dio un importante descenso de los TPH en BBN con 42.1%, seguido por BBC con 22.0% y FIC con 21.4% (Figura 42). Sin embargo, no existieron DS entre tratamientos (ANOVA, Tukey  $p > 0.05$ ;  $n=16$ ). La tendencia hacia una rápida degradación de TPH fue causada principalmente por la actividad de las bacterias nativas y comerciales adicionadas, la degradación intrínseca y en menor proporción por factores físicos, químicos los cuales actúan sin contar con la intervención humana produciendo la reducción de la toxicidad, la movilidad, y la concentración del contaminante en suelo. Estos procesos pueden incluir dispersión, dilución, sorción, volatilización, estabilización biológica o química, transformación o destrucción de los contaminantes (Alexander, 1997; Vecchioli *et al.*, 1997; EPA, 1999).

La degradación de TPH en BBN se debió a los mayores recuentos de microorganismos heterótrofos y degradadores encontrados durante el día

treinta ( $3.5 \pm 0.2 \times 10^7$  UFC/g<sub>ps</sub> y  $1.2 \pm 0.4 \times 10^3$  NMP/g<sub>ps</sub>). Estos recuentos superaron en dos órdenes de magnitud a los tratamientos FIC ( $8.88 \pm 0.05 \times 10^5$  UFC/g<sub>ps</sub> y  $1.96 \pm 0.53 \times 10^2$  NMP/g<sub>ps</sub>) y BBC ( $1.97 \pm 0.03 \times 10^5$  UFC/g<sub>ps</sub> y  $3.22 \pm 0.25 \times 10^3$  NMP/g<sub>ps</sub>). La diferencia se debió a que las bacterias nativas adicionadas aun poseían una pequeña cantidad de fuente de carbono contenida en la melaza del medio, la cual pudo brindarles la energía suficiente para estimular su crecimiento y a su vez desarrollar una rápida degradación de TPH.

Alhadhrami y colaboradores (1997) utilizaron la melaza como una rica fuente de carbono en la biodegradación de tres grupos de n-alcanos por *Pseudomonas putida* en la presencia de fertilizantes minerales. Durante dicha investigación se observó que su uso aumenta las tasas de degradación por encima de los tratamientos en los cuales se usó fertilizante. Concluyendo que la presencia de vitaminas y elementos traza encontrados en la melaza juegan también un rol importante en la suplementación de requerimientos nutricionales para las bacterias ayudando a la biodegradación.

Mishra y colaboradores (2001) evaluaron la adición de un inoculo para la biodegradación *in situ* de un suelo contaminado con lodos aceitosos. Utilizaron melaza al 2% como única fuente de carbono y energía en un medio mínimo de sales para bioaugmentar un consorcio bacteriano compuesto por *Acinetobacter baumannii* y *Burkholderia cepacia* capaces de degradar lodos aceitosos. Al final del estudio encontraron que el tratamiento de bioaugmentación estimuló la degradación de los TPH desde 69,700 mgTPH/kg hasta 5,530 mgTPH/kg alcanzando una degradación del 92.0% de TPH en 360 días de investigación.

La menor degradación de TPH en BBC respecto a BBN en los primeros treinta días pudo originarse en una menor tolerancia de las bacterias comerciales a los compuestos tóxicos presentes en los residuos de destilación alquitran, esto pudo causar un efecto inhibitorio temporal del consorcio comercial, lo cual estuvo representado por una diferencia de un orden de magnitud en el recuento de microorganismos degradadores con BBN, mientras fue ligeramente superior a FIC que no poseía adición de bacterias.

Los porcentajes de degradación registrados son similares a los reportados durante una investigación comparativa de biorremediación de suelos contaminados con diesel implementando atenuación natural, bioestimulación y bioaugmentación realizada por Bento y colaboradores (2005) se evaluaron

dos suelos provenientes de Long Beach (California) y Hong Kong (China). En las primeras dos semanas encontraron que la mayor tasa de degradación de las fracciones ligeras se obtuvo en el suelo Long Beach, esta disminución representó cerca del 50% del total de los TPH degradados.

En algunos casos se ha encontrado que las pérdidas abióticas debidas a procesos físicos y químicos son pocas o nulas en ambientes con previas contaminaciones, mientras en zonas recientemente contaminadas las pérdidas abióticas presentan una mayor contribución a la descontaminación. Esta variable es a menudo desestimada cuando se desarrolla la biodegradación (Atlas, 1988; Margesin y Schinner 1999b). Sin embargo, en nuestro estudio las pérdidas abióticas fueron menores puesto que se encontraron altas concentraciones de CO<sub>2</sub>, así como mayores porcentajes de degradación en BBN (42.1%) que en BBC (22.0%) por efecto de las bacterias adicionadas.

Las pérdidas abióticas pudieron estar representadas por efecto de la volatilización durante las labores de aireación, sin embargo este efecto fue mínimo puesto que la gran mayoría de volátiles se perdieron durante las labores de contaminación y mezcla de los residuos y el suelo. Atagana (2004) encontró que el incremento de la aireación estimuló la actividad aeróbica a través del arado del suelo produciendo un aumento de la población bacteriana en un 40%, así mismo concluyó que el uso de sólo aireación sin adición de nutrientes reduce los contenidos de creosota en el suelo.

Los resultados registrados son coincidentes con otros estudios de biorremediación en los cuales se ha determinado que en los procesos de degradación se diferencian dos fases, una de alta velocidad en la degradación de HCs en los primeros meses, mientras las fracciones más pesadas especialmente las alifáticas se degradan durante la fase más lenta en los meses finales. En algunos casos de comportamiento bifásico es erróneo atribuir la reducción de la degradación a la biodisponibilidad de los contaminantes porque en realidad existen otros factores como pérdida de sustratos cometabólicos o insuficiente número de degradadores (Huesemann y Moore 1993; Huesemann *et al.*, 2004).

Hansen y colaboradores (2004) reportaron que la degradación de TPH durante la biorremediación implementando biolabranza se desarrolla por un orden jerárquico, iniciando con la degradación de compuestos de bajo peso molecular (dos y tres anillos). Posteriormente se produce un aumento de la

concentración de los compuestos de cuatro y cinco anillos principalmente porque se hacen más disponibles debido a la actividad microbiana. Viñas y colaboradores (2005) determinaron que la cinética de degradación observada durante un estudio de biorremediación de suelo contaminado con creosota tuvo un patrón bifásico porque ocurrió una disminución de la biodisponibilidad, acumulación de metabolitos o aumento de los compuestos recalcitrantes.

Juhasz y colaboradores (2000) realizaron un estudio sobre la degradación microbiana y la detoxificación de TPH de bajo y alto peso molecular utilizando *Stenotrophomonas maltophilia* VUN 10,003. Después de 42 días encontraron mayores porcentajes de degradación en los compuestos de bajo peso molecular como fluoreno 90%, fenantreno 91%, mientras fluoranteno y pireno entre 72-74%. Los PAHs de alto peso molecular como benzo antraceno, benzopireno, dibenzoantraceno y coroneno presentaron menores porcentajes de degradación entre 34-37% en 42 días de tratamiento.

Hacia el día sesenta, FIC fue SD de los otros tratamientos (ANOVA, tukey  $p < 0.05$   $n=16$ ), debido a una significativa disminución de TPH desde  $7,500 \pm 2.5$  mgTPH/kg<sub>ps</sub>, siendo esta disminución fue mas prolongada que la observada en BBN. Durante la primera etapa de los procesos de bioremediación las tasas de degradación se hacen más rápidas indicando que los HCs más fáciles de biodegradar son consumidos rápidamente y posteriormente los microorganismos degradadores actúan sobre otras fracciones más pesadas como los aromáticos los cuales son degradados a diferentes tasas por ser menos biodisponibles para los microorganismos degradadores (Langbehn y Steinhart, 1995; Margesin y Schinner, 1999a).

La disminución de TPH en FIC fue acompañada por un incremento en el número de degradadores de dos ordenes de magnitud ( $1.9 \pm 0.5 \times 10^2$  NMP/g<sub>ps</sub> a  $5.4 \pm 0.8 \times 10^4$  NMP/g<sub>ps</sub>). Vallejo (2004) registró durante su estudio de biodegradación implementando bioestimulación que la disminución en la concentración de TPH en el tratamiento con fertilizante triple 15 fue rápida solo durante los primeros veintiocho días, y que esta disminución fue acompañada por un incremento en el número de degradadores. Sin embargo, después de los treinta días las tasas de degradación se hicieron más lentas y no se tuvieron DS entre los tratamientos y los controles.

La rápida disminución de TPH producida en FIC durante este periodo es similar a aquella generada por el fenómeno *jockey stick*, el cual se caracteriza porque el patrón de la degradación de los químicos orgánicos

presentes en el suelo generalmente tiene una rápida fase de disminución; seguida por un ligero o ningún cambio en la concentración (Bento *et al.*, 2005). Alexander (1999) sostiene que una disminución de los nutrientes, un descenso de las poblaciones microbianas, una baja biodisponibilidad y una alta recalcitrancia de los contaminantes pueden originar esta dinámica.

La disminución de la degradación en BBN durante el día noventa fue causada por el rápido consumo de las fracciones livianas por parte de las bacterias nativas teniendo después poca biodisponibilidad de las fracciones pesadas haciendo más lento el proceso de degradación. En el caso de BBC es posible que los bajos recuentos de microorganismos degradadores por algún tipo de competencia con las bacterias del suelo ocasiono que la mayor cantidad de nutrientes fueran utilizados por los microorganismos heterótrofos aumentando su densidad, sin hacer uso de los TPH del suelo.

Los valores de TPH registrados durante el día noventa no fueron tomados en cuenta para el análisis porque las concentraciones aumentaron de forma significativa en todos los tratamientos. Al terminar el estudio no se encontraron DS en la degradación de TPH entre los tratamientos FIC, BBN y BBC. Los porcentajes de degradación de TPH fueron BBC (48.6%), FIC (46.2%) y BBN (34%) (Figuras 40 y 41). Sin embargo, los porcentajes de degradación de mostraron un efecto positivo y prometedor para disminuir estos compuestos en el suelo.

Estos resultados son comparables con los reportados por Straube y colaboradores (2003) en su estudio sobre remediación de TPH a través de biolabranza implementando técnicas de bioestimulación y bioaumentación. Después de once meses encontraron que el control mostró un 23% de remoción en los TPH, el bioestimulado un 34%, mientras el bioestimulado y bioaumentado mostró un 87% de disminución. Ellos también hallaron un aumento de los TPH en el suelo debido a la aireación; la cual mezcla y rompe las asociaciones suelo arcilla y distribuye el contaminante en toda la superficie.

Un factor importante que influyó la constante degradación de TPH en todos los tratamientos lo constituyeron las tasas de desorción de los contaminantes. Este fenómeno se pudo originar en las pocas fluctuaciones que presentó el pH durante el estudio (5.6 y 7.0). Huesemann y colaboradores (2004) realizaron una investigación acerca de cómo la biodisponibilidad limita la biodegradación mediante una comparación entre la biodegradación de HCs y las tasas de desorción en suelos, estableciendo

que la degradación de los PAHs durante la fase final del proceso de bioremediación es lenta porque es limitada por las bajas tasas de desorción de los HCs en el suelo.

El contenido de humedad ( $14.6\pm 0.6\%$ ) favoreció la degradación de TPH, puesto que a pesar de que el suelo no retenía una gran cantidad de agua si facilitó que los contaminantes más livianos fueran liberados de la matriz del suelo favoreciendo la acción de las bacterias. La humedad que se mantuvo fue importante puesto que bajos contenidos de humedad resultan en la inactividad de muchos microorganismos así como la no biodisponibilidad de los contaminantes. Las variables que limitan significativamente la biodegradación son el contenido de humedad, el contacto de los nutrientes con la matriz del suelo, la homogeneidad del suelo y la temperatura (Alexander, 1999; Liebeg y Cutright, 1999; Atagana 2004).

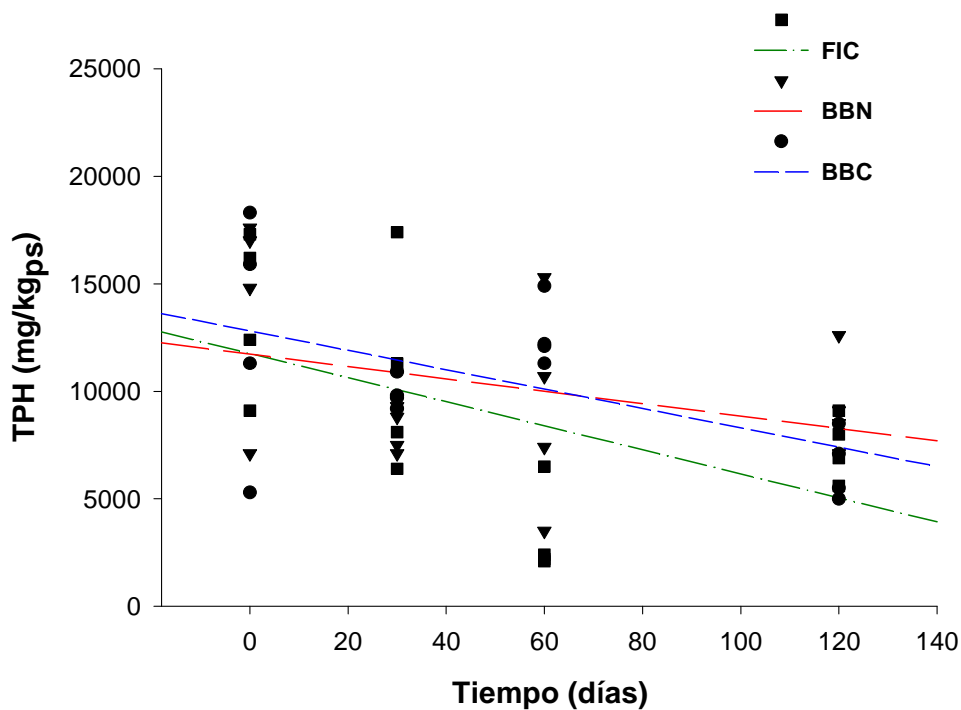
Aunque la degradación de TPH fue alta en todos los tratamientos, es probable que fuera un poco limitada por la pérdida de humedad después de la adición de agua. Esta disminución se debió a factores como la evaporación del agua provocada por las altas temperaturas ambientales ( $30.8\pm 0.8\text{C}^\circ$ ) y por pérdidas de agua debidas a lixiviación. La composición franco-arenosa del suelo con altos porcentajes de arena ( $50\pm 0.1\%$ ) y limo ( $47\pm 0.1\%$ ) así mismo tuvo un bajo porcentaje de arcillas (3%) impidió que el contenido de agua fuera más grande.

Posiblemente la acumulación de metabolitos intermedios al final del estudio limitó las tasas de degradación de TPH en todos los tratamientos porque estos compuestos inhiben la actividad metabólica de los microorganismos. Sabate y colaboradores (2005), establecieron que en algunos casos la lenta degradación y la degradación incompleta de PAHs tienen relación con la acumulación de metabolitos intermedios producto de las diversas rutas metabólicas. Huesemann y colaboradores (2004) estimaron que durante las fases iniciales de la biodegradación los PAHs de cuatro y cinco anillos sufren transformaciones haciendo que la biodegradación resulte incompleta por la presencia de un alto contenido de PAHs en los residuos.

Generalmente los residuos de alquitrán poseen altas concentraciones de sales. Estas sales pueden causar la inhibición de los microorganismos, lo cual limita la actividad bacteriana no permitiendo alcanzar mayores porcentajes de degradación. Marín y colaboradores (2005) en un estudio de la influencia del suelo sobre la actividad microbiana encontraron que los altos contenidos de cloro en los lodos causaron una alta conductividad eléctrica

( $299 \mu\text{cm}^{-1}$ ). Ellos concluyeron que se debe tener cuidado con la disposición de lodos en el suelo, debido a que un contenido excesivo de sales puede llegar a tener un efecto negativo sobre la actividad bacteriana y sobre la biorremediación, especialmente cuando la salinidad es debida a los cloruros en lugar de los sulfatos.

El mejor tratamiento fue FIC ya que presentó la mayor tasa de degradación ( $56.0 \text{ mgTPH/kg}_{\text{ps}}$  por día). La degradación fue estimulada por la rápida incorporación de los nutrientes, lo cual permitió un progresivo crecimiento de los degradadores que se mantuvo a lo largo de todo el estudio desde  $1.0 \pm 0.5 \times 10^2 \text{ NMP/g}_{\text{ps}}$  hasta  $1.7 \pm 0.6 \times 10^6 \text{ NMP/g}_{\text{ps}}$  (Figura 40). Mathew y colaboradores (2006) en una investigación sobre biorremediación de un suelo contaminado con diesel en Singapur compararon tratamientos de bioestimulación. Después de un periodo de 60 días encontraron que en el uso de un fertilizante comercial NPK, produjo una reducción del 53% en los TPH, mientras la aplicación de una mezcla de urea y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  redujo un 48% los contaminantes.



**Figura 40.** Tasas de degradación de TPH ( $\text{mgTPH/Kg}_{\text{ps}}/\text{día}$ ) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar ( $n=4$ ).

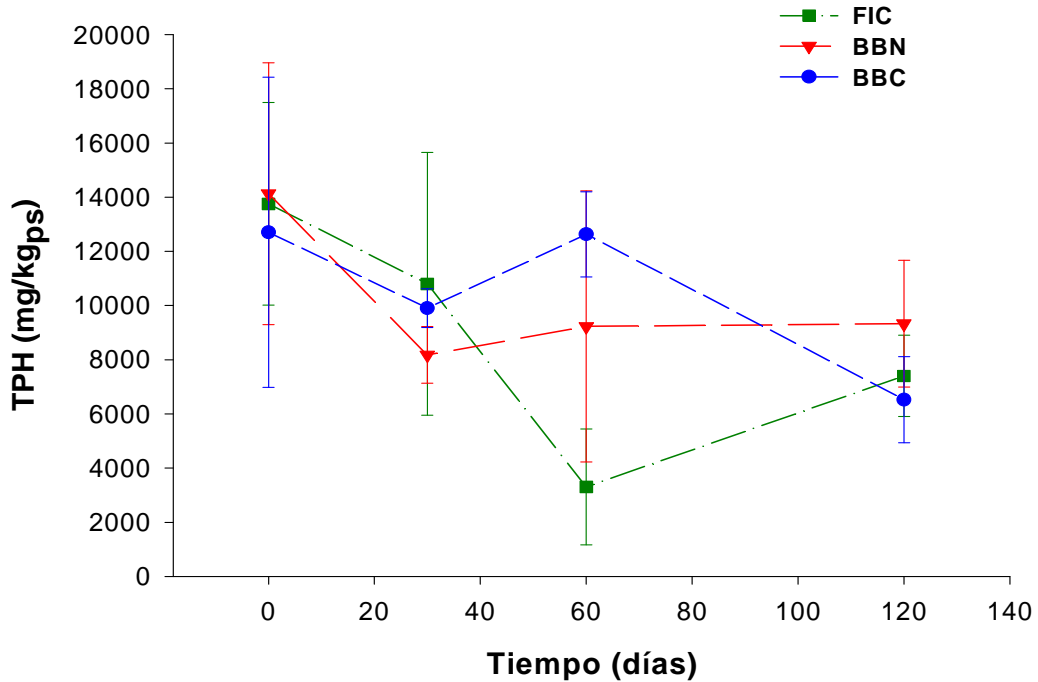
La mayor tasa de degradación hallada en FIC al final del estudio, pudo haberse dado como consecuencia de una serie de sucesiones en las poblaciones bacterianas del suelo. Sabaté y colaboradores (2005) en su estudio sobre biodisponibilidad y destino ambiental de los TPH en un suelo bioestimulado contaminado con creosota reportaron que los nutrientes, la aireación y la adición de agua producen una variación de la comunidad microbiana inicial. Estos cambios generan la presencia de diferentes comunidades microbianas lo cual explica la diferencia en el comportamiento degradativo de los PAHs entre los tratamientos particularmente cuando hay compuestos de alto peso molecular.

Diversos estudios han reportado que el uso de fertilizantes inorgánicos en tratamientos de bioestimulación, obteniendo con ellos altos porcentajes de degradación (Margesin y Schinner, 1997a; Armendariz *et al.*, 2004; Silvia *et al.*, 2004; Pardo *et al.*, 2005). Margesin y Schinner (1997a) en un estudio sobre la eficiencia de microorganismos nativos en la biodegradación de diesel en suelos alpinos, encontraron que el máximo porcentaje de descontaminación (53%) se dio en suelos fertilizados. Igualmente determinaron que la bioestimulación con fertilizantes inorgánicos aumenta significativamente la actividad biodegradativa de los microorganismos nativos del suelo a 10 C° en los suelos evaluados.

Los tratamientos de bioaumentación BBN y BBC no fueron SD, sin embargo, degradaron TPH en diferentes periodos de tiempo. Margesin y Schinner (1999b) determinaron, que los tratamientos de bioestimulación con la adición de nutrientes inorgánicos resultó en un aumento en la degradación de combustible por los microorganismos nativos, mientras la bioaumentación con microorganismos adaptados para degradar combustible en clima frío fueron encontrados algunas veces como poco exitosos. Adicionalmente establecieron diferencias en el grado de descontaminación que se puede obtener en ambientes contaminados con HCs basados en las pérdidas bióticas y abióticas.

Al concluir nuestro estudio la degradación de TPH en BBC (48.6%) y BBN (34%) pudo verse afectada por varios problemas asociados con la implementación de estrategias de bioaumentación en ambientes terrestres. Margesin y colaboradores (2000a); Margesin y Schinner (1997b); Atlas (1991), reportaron que no todos los microorganismos degradadores del suelo pueden llegar a ser aislados y cultivados en el laboratorio y que la aplicación de los organismos viables en las áreas contaminadas afectan significativamente la degradación. En otras circunstancias sucede que los microorganismos pueden utilizar otras sustancias diferentes al contaminante

objetivo o pueden llegar a ser incapaces de moverse a través del suelo hasta el sitio donde se encuentra el contaminante.



**Figura 41.** Concentración de TPH (mgTPH/kg<sub>ps</sub>) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n=4).

Un proceso de adaptación de las bacterias comerciales a su medio puede explicar la tasa de degradación de TPH en BBC al final del estudio ( $28.16 \pm 1.2$  mgTPH/kg<sub>ps</sub> d<sup>-1</sup>) (Figura 40). Alexander (1999) afirmó que las bacterias deben adaptarse a las nuevas condiciones del suelo como aireación y humedad. En el caso de BBC esta adaptación fue facilitada por la disponibilidad del fertilizante tal como lo reportó Atagana (2004) quien encontró que las altas tasas de reducción de creosota observadas durante el cuarto mes de tratamiento se debieron principalmente a que los microorganismos introducidos al suelo estaban adaptados al nuevo ambiente y a que los fertilizantes estuvieron completamente integrados al suelo y fueron más biodisponibles para las bacterias.

Teniendo en cuenta que los residuos de destilación de alquitran aplicados al suelo contienen PAHs de diferente peso molecular es probable que la degradación en BBC al concluir el estudio fuera producto de la consolidación de un fenómeno de cometabolismo que se venía dándose entre las bacterias comerciales y las nativas desde el inicio del estudio. Sabate y colaboradores (2005) hicieron referencia a que la ausencia de lixiviados con concentraciones significativas de metabolitos intermedios durante la degradación de algunos compuestos en los suelos contaminados con creosota, puede ser debido a un fenómeno de cometabolismo entre la comunidad microbiana del suelo.

En diversos estudios se ha comprobado que ciertos compuestos pueden promover el fenómeno de cometabolismo bacteriano. El cometabolismo de este tipo se basa en la estructura de los contaminantes, es decir los compuestos de bajo peso molecular estimulan la degradación de los compuestos mas pesados. Kanaly y Bartha (1999), Juhasz y colaboradores (2000); Huesemann y colaboradores (2004); Sabate y colaboradores (2005) establecieron que los PAHs de bajo peso molecular pueden estimular la biodegradación por cometabolismo de los PAHs de alto peso molecular. Ellos encontraron que el fenantreno promueve la degradación de pireno y el benzo(a) pireno por cometabolismo.

Otra causa de la degradación tardía en BBC pueda atribuirse a factores de competencia entre las bacterias comerciales y las poblaciones nativas, lo cual se notó con un aumento de dos órdenes de magnitud en los degradadores sólo en los últimos sesenta días del estudio, este comportamiento causó una baja degradación en los primeros meses y una mayor al final del estudio (Tabla 22). Margesin y Schinner (1997b) en un estudio sobre biodegradación de diesel en suelos alpinos establecieron que la bioestimulación de suelos por nutrientes inorgánicos puede generar una competencia entre las poblaciones nativas y los microorganismos introducidos. Esto causa posiblemente que los microorganismos introducidos no crezcan tan rápidamente como los nativos y que en algunos casos sean finalmente reemplazados por completo.

La menor tasa de degradación a través del estudio se presentó en BBN ( $28.81 \text{ mgTPH/kg}_{\text{ps}} \text{ d}^{-1}$ ). Sin embargo, el porcentaje de degradación de TPH a los treinta días (42.1%) fue mayor al 34% observado sobre final del estudio. Estos resultados indican que la bioaumentación con bacterias nativas es más eficiente a corto plazo, requiriendo de algún otro sustrato cometabolico para degradar las fracciones mas pesadas. Se ha estimado que la inoculación de microorganismos al suelo en determinados ocasiones puede acelerar la fase

inicial de bioremediación y además pueden llegar a ser favorable en aquellos lugares en los cuales los contaminantes pueden resistir la acción biodegradativa microbiana nativa o cuando la sub-superficie del suelo ha sido esterilizada por algún evento de contaminación severa (Margesin y Schinner, 1997a; Margesin y Schinner, 1997b).

Una explicación para la disminución de las tasas de degradación en BBN después de treinta días se basó en que la bioaumentación con melaza como fuente de carbono favoreció el crecimiento del consorcio en los bioreactores y durante el primer mes en el suelo, pero que a su vez los hizo menos resistentes a otros factores del suelo. En ciertas ocasiones los investigadores han determinado que los microorganismos son capaces de lograr altas tasas de degradación del contaminante en cultivos de laboratorio pero esto no es del todo válido, puesto que pueden llegar a fallar cuando son inoculados en el ambiente natural porque ellos pueden ser susceptibles a diversos factores como las toxinas o predadores del ambiente (Marin *et al.*, 2005; Golstein *et al.*, 1985; Margesin y Schinner, 1997b).

La alta degradación observada en BBN durante los primeros treinta días ( $42.1 \pm 2.0$  mgTPH/kg<sub>ps</sub>), indicó que el consorcio de bacterias nativas adicionadas si poseía una alta capacidad para degradar TPH. Así mismo este porcentaje de degradación mostró que las bacterias no necesitaron una fase de adaptación. Viñas y colaboradores (2005) establecieron durante un estudio de dinámica bacteriana durante la bioremediación de un suelo contaminado con creosota que una alta concentración de bacterias degradadoras al inicio del experimento y la ausencia de una fase de adaptación indicó que la población del suelo presentaba bacterias preadaptadas para degradar TPH.

### **5.2.7 Producción de CO<sub>2</sub>.**

La producción de CO<sub>2</sub> no fue SD entre los tratamientos (Kruskall Wallis  $p < 0.05$ ;  $n=80$ ). La producción de CO<sub>2</sub> fue en aumento desde el día cero ( $4.0 \pm 0.2$  molar) hasta el día sesenta ( $114.2 \pm 20.4$  molar), a partir de allí se estabilizó y se mantuvo hasta el final del tratamiento (Tabla 25). Esta tendencia del CO<sub>2</sub> a través del estudio mostró que los contaminantes fueron utilizados como fuente de carbono por los microorganismos. Igualmente indicó que la mayor actividad degradativa de los microorganismos fue realizada durante los primeros sesenta días y que a partir de ese momento descendió levemente o se mantuvo constante (Figura 42).

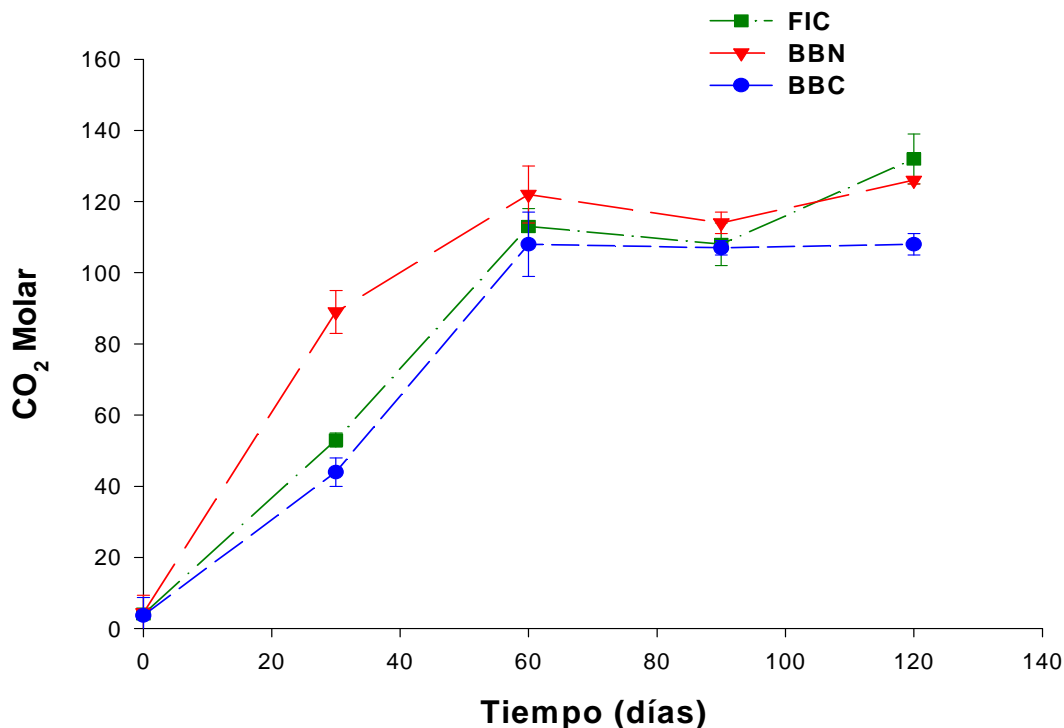
El incremento en la producción de CO<sub>2</sub> durante los primeros sesenta días coincidió con un aumento de las poblaciones de microorganismos degradadores entre dos y tres órdenes de magnitud, salvo en BBC donde no se observó un aumento significativo. Marín y colaboradores (2005) encontraron que la actividad respiratoria se incrementó justo después de la adición de los lodos de la refinería. Ellos atribuyeron estos resultados a que los compuestos susceptibles a la biodegradación necesitan de una alta actividad microbiana para ser metabolizados.

**Tabla 25.** Valores de producción de CO<sub>2</sub> durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n=4).

Tratamiento	Tiempo (días)				
	0	30	60	90	120
FIC	4.10±0.22	53.3±18.2	112.5±35.3	107.7±6.86	131.5±7.55
BBN	4.40±0.22	88.8±18.4	122.3±22.5	114.2±5.12	126.3±21.5
BBC	3.68±0.26	44.3±12.9	108.0±3.40	107.3±12.04	107.5±1.99

Pineda y colaboradores (2004) realizaron un estudio sobre un consorcio microbiano aislado de muestras de crudo que usan asfalteno como recurso de carbono y energía. Ellos determinaron que la respiración de un consorcio que utiliza asfalteno como única fuente de carbono fue 800 molar, siendo SD que las muestras que contenían solo el consorcio microbiano (200 molar CO<sub>2</sub>) o solo asfalteno (300 molar CO<sub>2</sub>). Estos resultados evidenciaron la existencia de microorganismos capaces de degradar asfáltenos en el crudo, igualmente la alta producción de CO<sub>2</sub> demostró que estos compuestos son usados como único recurso de energía.

La alta producción de CO<sub>2</sub> en los primeros sesenta días se pudo originar en la biodisponibilidad de los compuestos para los microorganismos degradadores por efecto de la humedad, y la mezcla durante la aireación. En términos de bioremediación la biodisponibilidad puede ser definida como la extensión en la cual el contaminante es disponible para la conversión biológica (Juhász y Naidu, 2000). Se ha encontrado que la ausencia de agua limita la biodisponibilidad del contaminante y que las medidas de la respiración del suelo nos proporcionan un acercamiento de la actividad microbiana en el suelo, así como de la cantidad y calidad de los sustratos susceptibles a la mineralización (Alexander, 1999).



**Figura 42.** Producción de CO<sub>2</sub> durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar (n= 4).

La estabilización de la producción de CO<sub>2</sub> en los últimos seis meses fue causada por la aparición de fracciones más pesadas, las cuales pueden llegar a restringir significativamente la actividad microbiana ocasionando que el proceso de biodegradación no se lleve a cabo por completo. Breedveld y Karlsen (2000) durante su estudio de estimación de la viabilidad de la biorremediación de PAHs de un suelo contaminado con creosota establecieron que la tasa respiratoria se redujo de 66 mgCO<sub>2</sub>-C/kg hasta 4 mgCO<sub>2</sub>-C/kg al finalizar el estudio después de seis meses de tratamiento. Ellos sugirieron esta reducción sucedió porque los microorganismos fueron inhibidos porque el suelo presentaba una gran concentración de PAHs de cinco y seis anillos.

En términos generales la presencia de altas concentraciones de fósforo en los tratamientos con fertilizante inorgánico favorecieron la producción de CO<sub>2</sub>, registrándose valores muy similares durante los ciento veinte días de estudio (Tabla 25). Esto se produjo porque la constante liberación de fósforo desde el día cero de 202.7 mgP-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/kg<sub>ps</sub> hasta 137.4 mgP-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup>/kg<sub>ps</sub> al finalizar el estudio, permitió elevar las tasas respiratorias (Figura 42). El fósforo aumenta

la tasa respiratoria representada en el consumo de oxígeno, de la misma forma estimula el crecimiento de los microorganismos nativos y foráneos (Liebeg y Cutright, 1999). Margesin y colaboradores (2000b) reportaron que la producción de CO<sub>2</sub> fue significativamente más alta en los tratamientos con fertilizantes inorgánicos que en el control abiótico. Después de once días tuvo un valor máximo, y luego permaneció constante.

La mayor producción de CO<sub>2</sub> en BBN a partir del día treinta en promedio (112.9±16.8 molar) correspondió con un mayor recuento de heterótrofos y degradadores (Figura 43). Así mismo el rápido incremento del CO<sub>2</sub> durante los primeros treinta días correspondió con la máxima degradación de TPH (Figura 40 y 41). Liebeg y Cutright (1999) establecieron que en la generalidad de los casos la actividad biológica y la tasa de degradación de los compuestos está directamente relacionada con la tasa de respiración, estos parámetros son utilizados para comprender los fenómenos interactivos que gobiernan la biorremediación.

Sabaté y colaboradores (2004) en una investigación de biorremediación a escala de laboratorio en suelos contaminados con HCs establecieron diferencias en la producción de CO<sub>2</sub> entre dos suelos. Ellos reportaron que la máxima producción de CO<sub>2</sub> fue registrada en el suelo uno; con un tratamiento que contenía glucosa y nutrientes, mientras en el suelo dos en iguales condiciones que el uno presentó una producción de CO<sub>2</sub> muy baja. Ellos atribuyeron esta diferencia a la ausencia de recursos asimilables de carbón o a la presencia de compuestos tóxicos.

Los bajos recuentos microbianos en BBC durante los primeros sesenta días en nuestro estudio no parecieron afectar la producción de CO<sub>2</sub> en el transcurso del proyecto. Una explicación a este fenómeno de producción de CO<sub>2</sub> en BBC, pudo darse por la mineralización de compuestos orgánicos liberados por la lisis bacteriana (Pineda *et al.*, 2004). Margesin y colaboradores (2000b) afirmaron que el CO<sub>2</sub> puede producirse por liberación de carbonato, pero también puede generarse CO<sub>2</sub> en suelos no calcáreos donde el CO<sub>2</sub> abiótico se produce por descarboxilación química de la materia orgánica.

## 6. CONCLUSIONES

- Los procesos de bioaumentación (BBN y BBC) y bioestimulación (FIC) disminuyeron la concentración de TPH. Sin embargo no se observaron DS entre los procesos de bioaumentación y bioestimulación.
- No existieron diferencias significativas en la degradación de TPH en los procesos de bioaumentación con bacterias nativas y comerciales. Sin embargo, BBN y BBC tuvieron efecto en diferentes periodos de tiempo.
- El tratamiento BBN redujo los TPH en un 42.1% durante los primeros treinta días. Esta reducción demostró que la bioaumentación con bacterias nativas es muy eficiente en periodos de corta duración, puesto que este efecto no pudo ser observado nuevamente durante el estudio.
- La bioaumentación con BBC presento una alta degradación al final del estudio. Sin embargo, no es posible atribuir este efecto tardío únicamente a las bacterias comerciales por la posible actividad degradativa de las bacterias nativas del suelo.
- La influencia de los nutrientes fue establecida hacia el final del estudio cuando sus bajos niveles causaron una disminución en la densidad de microorganismos heterótrofos y degradadores.

## 7. RECOMENDACIONES

Se recomienda que en estudios similares de bioremediación se tengan en cuenta aspectos tales como:

- Realizar seguimientos de los diferentes PAHs mediante cromatografía para conocer cuales compuestos están siendo degradados y cuales son más recalcitrantes.
- Desarrollar ensayos de genotoxicidad para conocer si se estan generando nuevos compuestos mas tóxicos y determinar su posible impacto sobre el medio ambiente.
- Realizar ensayos de respirometría en donde se cuantifique el consumo de O<sub>2</sub> junto con la producción de CO<sub>2</sub> como parámetros para confirmar la mineralización de los contaminantes. Estos ensayos pueden ser realizados en el laboratorio para seleccionar el mejor tratamiento, para su posterior implementación en campo.
- Efectuar monitoreos de la actividad enzimática de los microorganismos (p.e., Dioxigenasas, lipasas) para determinar si la degradación es producida por la actividad de los microorganismos.
- Hacer seguimientos por técnicas moleculares de las bacterias adicionadas para determinar los cambios de estructura poblacional a medida que avanza la bioremediación.
- Emplear en el proceso de bioremediación consorcios microbianos constituidos por cepas que posean rangos más amplios para degradar diferentes compuestos especialmente PAHs.

## BIBLIOGRAFIA

ABALOS, A., VIÑAS, M., SABATE, J., MANRESA, A. y SOLANAS, M. 2004. Enhanced Biodegradation of Casablanca Crude Oil by a Microbial Consortium in Presence of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. **Biodegradation**. 15: 249-260.

ALDRETT, S., BONNER, J., McDONALD, T., MILLS, M. y AUTENRIETH, R. 1997. Degradation of Crude Oil Enhanced by Commercial Microbial Cultures. International Oil Spill Conference.

ALEXANDER, M. 1999. Biodegradation and Biorremediation. Second Edition. Academic Press. USA.

AL-HADHRAMI, M. LAPPIN-SCOTT, H. y FISHER, P. 1997. Studies on the Biodegradation of Three Groups Of Pure n-alkanes in the Presence of Molasses and Mineral Fertilizer by *Pseudomonas aeruginosa*. **Marine Pollution Bulletin**. 34: 969-974.

ALLARD, A., REMBERGER, M. Y ALASDAIR N. 2000. The negative impact of aging on the loss of PAHs components in a creosote- contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 46: 43-49.

AMIR, S., HAFIDI., M., MERLINA, G., HAMDI, H. y REVEL, J. 2005. Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Composting of Lagooning Sewage Sludge. **Chemosphere**. 58: 449-458.

ARMENDARIZ, B., CORRAL, O., LINARES, L., GARCIA, F. y VASQUEZ, R. 2004. Biostimulation of Microorganisms from Sugarcane Bagasse Pith for the Removal of Weathered Hydrocarbon from Soil. **Letters in Applied Microbiology**. 38:373-377.

ASM, 1986. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Department of Nutrition and Food Science. Massachusetts. Institute of Technology, Cambridge. Washintong D.C.

ASTM, 1996. Standard Test Method for Screening Fuels in Soils. United States. D 5831-96.

ATAGANA, H., HAYNES, R. y WALLIS, F. 2003. Optimization of Soil Physical and Chemical Conditions for the Bioremediation of Creosote Contaminated Soil. **Biodegradation**. 14:297-307.

ATAGANA, H. 2004. Bioremediation of Creosote Contaminated Soil in South Africa by Landfarming. **Journal of Applied Microbiology**. 96: 510-520.

ATLAS, R. 1988. Biodegradation of Hydrocarbon in the Environmental. **Environmental Biotechnology**. 45: 211-218.

ATLAS, R. 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. **Microbiology Reviews**. 45: 180-209.

ATLAS, R. 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation of Oils Spills. **Journal of Chemical Technical Biotechnology**. 52: 149-156.

ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades. 2002. Reseña Toxicológica de la Creosota de Madera, Creosota de Alquitrán de Hulla, Alquitrán de Hulla (en inglés). Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Atlanta, GA.

BBL CRYSTAL<sup>®</sup>, 2004. Identification Systems Enteric/Nonfermenter Manual Codebook. Becton Dickinson and Company. Maryland, USA. Pp: 25-29.

BEM SYSTEMS. Environmental Engineers and Scientists. 1998. Process Technical Specification for the Bioremediation Project. New Jersey, USA. Documento Interno Carboquímica S.A.

BENTO, F., CAMARGO, F., OKEKE, B. y FRANKENBERGER, W. 2005. Comparative Bioremediation of Soils Contaminated with Diesel Oil by Natural Attenuation, Bioestimulation and Bioaugmentation. **Bioresource Technology**. 96: 1049-1055.

BLACKBURN, J. y HAFKER, W. 1993. The Impact of Biochemistry, Bioavailability and Bioactivity on the Selection of Bioremediation Techniques. **Trends in Biotechnology**. 11: 328-333.

BLUMER, M. 1976. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Nature. **Science Ambient**. 234: 35-45.

BOLDRIN, B., TIEHM, A. y FRISTZSCHE C. 1993. Degradation of Phenantrene, Fluorene, Fluoranthene, and Pyrene by a *Mycobacterium* sp. **Applied Environmental Microbiology**. 93: 1927-1930.

BOON, N., GORIS, J., VOS, P., VERSTRAETE, W. y TOP, E. 2000. Bioaugmentation of Activated Sludge by an Indigenous 3-Chloroaniline-Degrading *Comamonas testosteronii* Strain, l2gfp. **Applied Environmental Microbiology**. 66:2906-2913.

BOONCHAN, S., BRITZ, M. y STANLEY, G. 1998. Surfactant-Enhanced Biodegradation of High Molecular Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Biotechnology and Bioengineering**. 59: 482-494.

BOUWER, E. y ZEHNDER, A. 1993. Bioremediation of Organic Compounds Putting Microbial Metabolism to Work. **Trends in Biotechnology**. 11: 360-367.

BRADDOCK, F., RUTH, M., CATTERALL, M., WALWORTH, J. y MCCARTHYND, k. 1997. Enhancement and Inhibition of Microbial Activity in Hydrocarbon-Contaminated Arctic Soils: Implications for Nutrient-Amended Bioremediation. **Environmental Science and Technology**. 31:2078-2084.

BREEDVELD, G. y KARLSEN, A. 2000. Estimating the Availability of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Bioremediation of Creosote Contaminated Soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 54: 255-261.

BREEDVELD, G. y SPARREVIK, M. 2000. Nutrient Limited Biodegradation of PAH in Various Soil Strata at a Creosote Contaminated Site. **Biodegradation**. 11: 391-399.

BROWN, E. y BRADDOCK. 1990. Sheen Screen, a Miniaturized Most Probable Number Method for Enumeration of Oil Degrading Microorganism. **Applied Environmental Microbiology**. 56: 3895-3896.

CAMPOS, R. 2002. Guía de Laboratorio "Medición del Metabolismo del Suelo". Guía de Laboratorio para el Curso de Bioecología de suelos. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Agronomía.

CAPLAN, A. 1993. The Worldwide Bioremediation Industry: Prospects for Profit. **Trends in Biotechnology**. 11: 320-323.

CARREÑO, M. 2004. Comunicación personal.

CASTRO, J., ROJAS, M. y MESA, J. 2004. Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo. **NOVA**. Publicación científica. 2:1794-2370.

CERNIGLIA, C. 1992. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. **Biodegradation**. 3:351-368.

CHAINEAU, C., ROUGEUX. y OUDOT Y. 2005. Effects of Nutrient concentration on the Biodegradation of Crude Oil and Associated Microbial Populations in the Soil. **Soil Biology & Biochemistry**. 37: 1490-1497.

CHEN, P., PICKARD, M. y GRAY, M. 2000. Surfactant Inhibition of Bacterial Growth on Solid Anthracene. **Biodegradation**. 11: 341-347.

CLEVES, E. y SANDOVAL, M. 2001. Evaluación de la Biodegradación de Hidrocarburos Presentes en Suelos Contaminados con Lodos Aceitosos de la Industria Petrolera de Campo Dina (Huila-Colombia). Tesis de Pregrado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogota. Facultad de Ciencias.

CULP, S., GAYLOR, D., SHELDON, W., GOLDSTEIN, L. y BELAND, F. 1998. A Comparison of the Tumors Induced by Coal Tar and Benzo(a)pyrene in a 2-year Bioassay. **Carcinogenesis**. 19: 117-124.

DAANE, L., HARJONO, I., ZYLSTRA, G. y HAGGBLOM M. 2001. Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants. **Applied Environmental Microbiology**. 67: 2683-2691.

DIBBLE, J. y BARTHA, R. 1979. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludges. **Applied Environmental Microbiology**. 37: 729-739.

EGGEN, T. 1999. Application of Fungal Substrate from Commercial Mushroom Production - *Pleurotus ostreatus* - for Bioremediation of Creosote Contaminated Soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 44: 117-126.

EPA, 1994. Oil and grease extraction method for sludge and sediment samples, method 9071A. Methods for chemical analysis of water and wastes. Cincinnati, OH, U.S. Environmental Protection Agency.

EPA. 1995. Soil and Waste pH. Method 9045C.

EPA. 1999. Monitored Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons. EPA/600/F-98/021.

EPA. 2000. Landfarming.  
<http://www.epa.gov/swerust1/cat/landfarming.htm>

ERICKSON, D., LOEHR, R. y NEUHAUSER, E. 1993. PAH loss during bioremediation of manufactured gas plant site soils. **Water Research**. 27: 911-919.

EWEIS, J., ERGAS, S., CHANG, D. y SCHROEDER, E. 1999. Principios de Biorrecuperación. 2ª Edición. Mc Graw Hill. Madrid-España.

FANTROUSSI, S. y AGATHOS, S. 2005. Is Bioaugmentation a Feasible Strategy for Pollutant Removal and Site Remediation?. **Current Opinion in Microbiology**. 8: 268-275.

GALLEGO, J., LOREDO, J., LLAMAS, J., VAZQUEZ, F. SANCHEZ, J. 2001. Bioremediation of Diesel Contaminated Soils: Evaluation of Potencial *in situ* Techniques by Study Bacterial Degradation. **Biodegradation**. 12: 325-335.

GOLDSTEIN, R., MALLORY, L. y ALEXANDER, M. 1985. Reasons for Possible Failure of Inoculation to Enhance Biodegradation. **Applied and Environmental Microbiology**. 50: 977-983.

GUEVARA, C. 2005. Programa de Formación de Jóvenes Investigadores. Informe Final. Pontificia Universidad Javeriana. Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA). Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

GURI, J. 1998. Empleo de Fertilizantes Inorgánicos y Orgánicos.  
<http://www.omchemicals.com/tecnico/fertilizantes.htm>

HACH. 1994. DRL/2000. Spectrophotometer Handbook. HACH, Company. Procedures Manual. USA. 567 p.

HAINES, J., WRENN, B., SROHMEIER, K., HERRINGTON, R. y VENOSA, A. 1996. Measurement of Hydrocarbon Degrading Microbial Populations by a 96 Well Plate Most Probable Number Procedure. **Journal of Industrial Microbiology**. 16: 36-41.

HANSEN, L., NESTLER, C., RINGELBERG., D. y BAJPAI, R. 2004. Extended Bioremediation of PAH/PCP Contaminated Soils from the POPILE Wood Treatment Facility. **Chemosphere**. 54: 1481-1493.

HEITZER, A. y SAYLER, G. 1993. Monitoring the Efficacy of Bioremediation. **Trends in biotechnology**. 11: 334-343.

HEJAZI, R. y HUSAIN, T. 2004. Landfarm Performance Under Arid Conditions. 1. Conceptual Framework. **Environmental Science and Technology**. 38: 2449-2456.

HUESEMANN, H. y MOORE, K. 1993. Compositional Changes During Landfarming of Weathered Michigan Crude Oil Contaminated Soil. **Journal of Soil Contamination**. 3: 245-264.

HUESEMANN, M., HAUSMANN, T. y FORTMAN, T. 2004. Does Bioavailability Limit Biodegradation? A Comparison of Hydrocarbon Biodegradation and Desorption Rates in Aged Soils. **Biodegradation**. 15: 261-274.

HUGHES, J., BECKLES, D., CHANDRA, S. y WARD, C. 1997. Utilization of Bioremediation Processes for the Treatment of PAH-Contaminated Sediments. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 18: 152-160.

HUSTON, R., MARQUEZ, R., WHITE, K., SALTAS, J. 2002. Creosota. ¿Qué es? ¿Cuáles son los riesgos?. Comisión de Calidad Ambiental de Texas. Austin. GI-285.

IDEAM. 2004. <http://www.ideam.gov.co>

IGAC. 1979. OLARTE, L., MUÑOZ, B., BENAVIDES, G., GARAVITO, F., LUNA, C., MEJIA, L y ROZO, E. Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. IGAC, Instituto Geográfico "Agustín Codazzi". Subdirección Agrológica. Ministerio de Hacienda y Crédito Público. Cuarta Edición. Bogota, D.E.

JIMENEZ, I., y BARTHA R. 1996. Solvent Augmented Mineralization of Pyrene by a *Mycobacterium* sp. **Applied Environmental Microbiology**. 62: 2311-2316.

JOHNSEN, A. y KARSLON, U. 2004. Evaluation of Bacterial Strategies to Promote the Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 63: 452-459.

JUHASZ, A. y NAIDU, R. 2000. Bioremediation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review of the Microbial Degradation of benzo(a)pyrene. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 45:57-88.

JUHASZ, A., STANLEY, G. y BRITZ, M. 2000. Microbial Degradation and Detoxification of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* Strain VUN 10,003. **Letters in Applied Microbiology**. 30: 396-401.

JUHASZ, A., WALLER, N., LEASE, C., BENTHAM, R. y STEWART, R. 2005a. Pilot Scale Bioremediation of Creosote-Contaminated Soil-Efficacy of Enhanced Natural Attenuation and Bioaugmentation Strategies. **Bioremediation Journal**. 9: 141-157.

JUHASZ, A., WALLER, N. y STEWART, R. 2005b. Predicting the Efficacy of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Bioremediation in Creosote Contaminated Soil Using Bioavailability Assays. **Bioremediation Journal**. 9: 99-114.

KANALY, R. A. y BARTHA, R. 1999. Cometabolic Mineralization of Benzo[a]pyrene Caused by Hydrocarbon Addition to Soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 18:2186-2190.

KANALY, R. y HARAYAMA, S. 2000. Biodegradation of High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. **Journal of Bacteriology**. 182: 2059-2067.

KAPLAN, C. y KITTS, C. 2004. Bacterial Succession in a Petroleum Land Treatment Unit. **Applied and Environmental Microbiology**. 70: 1777-1786.

KASTNER, M., JAMMALI, M. y MAHRO, B. 1998. Impact of Inoculation Protocols, Salinity and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil. **Applied and Environmental Microbiology**. 64: 359-362.

KHAITAN, S., ERICKSON, L., HUTCHINSON, L. y KARTHIKEYAN R. 2001. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in a Soil Containing Polyacrylamide. Kansas State University, Manhattan, Kansas, 66506.

KOUTNY, M., RUZICKA, J. y CHLACHULA, J. 2003. Screening for Phenol Degrading Bacteria in the Pristine Soils of South Siberia. **Applied Soil Ecology**. 23: 79-83.

KRIEG, N. y HOLT, J. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol, 1 William & Wilkins Baltimore (USA). Pág. 296-311.

LAMAR, R., WHITE, R. y ASHELY, K. 2002. Evaluation of White-Rot Fungi for the Remediation of Creosote-Contaminated Soil. **Remediation Autumn**. DOI: 10.10002.

LANGBEHN, A. y STEINHART, H. 1995. Biodegradation studies of hydrocarbons in soils by analyzing metabolites formed. **Chemosphere**. 30:855-868.

LEAHY, J. y COLWELL, R. 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbiological reviews**. 54: 305-315.

LIEBEG, E. y CUTRIGHT, T. 1999. The Investigation of Enhanced Bioremediation through the Addition of Macro and Micro Nutrients in a PAH Contaminated Soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 44: 55-64.

LEVIN, M. y GEALT M. 1997. Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos. 2ª edición. Mc Graw Hill. España. Pp: 170-185.

MADIGAN, M., MARTINKO, J. y PARKER J. 1998. Brock. Biología de los microorganismos. 8ª edición revisada. Prentice Hall. Iberia, Madrid.

MADSEN, E. 1991. Determining in situ Biodegradation: Facts and Challenges. **Environmental Science Technology**. 25: 1663-1673.

MAHADEVAN, B., PARSONS, H., MUSAFIA, T., SHARMA, A., AMIN, S., PEREIRA, C. y BAIRD, W. 2004. Effect of Artificial Mixtures of Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Present in Coal Tar, Urban Dust, and Diesel Exhaust Particulates on MCF-7 Cells in Culture. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 44: 99-107.

MALDONADO, C. 2003. Evaluación de la Atenuación Natural de Hidrocarburos del Petróleo como Supresores de Polvo en Carreteras sin Pavimentar. Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas.

MAPFRE. 1994. Manual de Contaminación Ambiental. Editorial MAPFRE, S.A. 2ª Edición. Madrid. Pp: 293-307.

MARGESIN, R. y SCHINNER, F. 1997a. Efficiency of Indigenous and Inoculated Cold-Adapted Soil Microorganisms for Biodegradation of Diesel Oil in Alpine Soils. **Applied and Environmental Microbiology**. 63:2660-2664.

MARGESIN, R. y SCHINNER, F. 1997b. Bioremediation of Diesel Oil Contaminated Alpine Soils at Low Temperatures. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 47: 462-468.

MARGESIN R. y SCHINNER, F. 1999a. Biodegradation of Diesel Oil by Cold-Adapted Microorganisms in Presence of Sodium Dodecyl Sulfate. **Chemosphere**. 38:3463-3472.

MARGESIN, R. y SCHINNER, F. 1999b. Review Biological Decontamination of Oil in Cold Environments. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 74: 381-389.

MARGESIN, R., ZIMMERBAUER, A. y SCHINNER, F. 2000a. Monitoring of Bioremediation by Soil Biological Activities. **Chemosphere**. 40: 339-346.

MARGESIN, R., WALDER, R. y SCHINNER, F. 2000b. The impact of Hydrocarbon Remediation (Diesel Oil and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) on Enzyme Activities and Microbial Properties of Soil. **Acta Biotechnology**. 20: 313-333.

MARGESIN, R. y SCHINNER, F. 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Bioestimulation) of Diesel Oil Contaminated Oil in an Alpine Skiing Area. **Applied Environmental Microbiology**. 67: 3127-3133.

MARGESIN, R., LABBÉ, D., SCHINNER, F. GREER, W. y WHYTE, L. 2003. Characterization of Hydrocarbon Degrading Microbial Populations in Contaminated and Pristine Alpine Soils. **Applied Environmental Microbiology**. 69: 3085-3092.

MARIN, J., HERNANDEZ, T. y GARCIA, C. 2005. Bioremediation of Oil Refinery Sludge by Landfarming in Semiarid Conditions: Influence on Soil Microbial Activity. **Environmental Research**. 98: 185-195.

MATHEW, M., TAN, L., SU, Q., YANG, X., BAXTER, M. y SENIOR, E. 2006. Bioremediation of 6 % (w/w) Diesel Contaminated Mainland Soil in Singapore: Comparison of Different Biostimulation and Bioaugmentation Treatments. **Engineering Life Science**. 6: 63-67.

MENENDEZ, D. 2004. El Carbón en la Vida Cotidiana. Documento Instituto Nacional del Carbón. Departamento de Tecnología Energética y Medioambiental. Universidad de Oviedo, España.

MISHRA, S., JYOT, J., KUHAD, C. y LAL, B. 2001. Evaluation of Inoculum Addition to Stimulate *in Situ* Bioremediation of Oily Sludge Contaminated Soil. **Applied Environmental Microbiology**. 67: 1675-1681.

MUELLER, J., CHAPMAN, P. y PRITCHARD, H. 1989. Creosote Contaminated Sites: Their Potential for Bioremediation. **Environmental Science Technology**. 23:1197-1201.

ORDOÑEZ, H. 1995. Biorremediación de Residuos Petroleros: Tecnificación de un Proceso de Degradación Natural. Documento Interno Foster Wheeler Andina S.A. Santa Fe de Bogotá.

ORTEGA, J., MARCHENKO, A., VOROBYOV, A. y BOROVICK, R. 2003. Chemotaxis in Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degrading Bacteria Isolated from Coal Tar and Oil Polluted Rhizospheres. **FEMS Microbiology**. 44: 373-381.

PARDO, J., PERDOMO, M. y BENAVIDES, J. 2004. Efecto de la Adición de Fertilizantes Inorgánicos Compuestos en la Degradación de Hidrocarburos en Suelos Contaminados con Petróleo. **Nova**. 2: 40-49.

PICADO, A., NOGUEIRA, A., BAETA-HALL, L., MENDOCA, E., RODRIGUES, M., SÁGUA, M., MARTINS, A. y ALSELMO, A. 2001. Landfarming in a PAH Contaminated Soil. **Journal of Environmental Science Health**. 36: 1579-1588.

PINEDA, G., BOLL, G., LIRA, C. MESTA, A. 2004. A Microbial Consortium Isolated from a Crude Oil Sample that Uses Asphaltene as a Carbon and Energy Source. **Biodegradation**. 1: 1-7.

POLLARD, S., HRUDEY, S. y FEDORAK P. 1994. Bioremediation of Petroleum and Creosote Contaminated Soils: A Review of Constraints. **Waste Management & Research**. 12: 173-194.

RITTMAN, E. y McCARTY L. 2001. Biotecnología del medio ambiente, principios y aplicaciones. 6ª Edición. Graw Hill. Madrid, España.

ROBERTS, E. 2000. Remediation of Petroleum Contaminated Soils. Biological, Physical and Chemical Processes. 1ª Edición. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida. Pp: 263-300.

RODRIGUES, A., WUERTZ, S., BRITO, A. y MELO, L. 2005. Fluorene and Phenanthrene Uptake by *Pseudomonas putida* ATCC 17514: Kinetics and Physiological Aspects. **Biotechnology and Bioengineering**. 90: 281-289.

RUBERTO, L., VAZQUEZ, S. MAC CORMACK. 2003. Effectiveness of the Natural Bacterial Flora, Biostimulation and Bioaugmentation on the Bioremediation of a Hydrocarbon Contaminated Antarctic Soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 52: 115-125.

SABATE, J., VIÑAS, M. y SOLANAS, A. 2004. Laboratory Scale Bioremediation Experiments on Hydrocarbon Contaminated Soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 54: 19-25.

SABATE, J., VIÑAS, M. y SOLANAS, A. 2005. Bioavailability Assessment and Environmental Fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Biostimulated Creosote-Contaminated Soil. **Chemosphere**. 5:1-12.

SANJEET, M., JEEVAN, J., RAMESH, C. y BANWARI, L. 2001. Evaluation of Inoculum Addition to Stimulate in situ Biodegradation of Soil Sludge Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**. 67: 1675-1681.

SARMA, P., BHATTACHARYA, D., KRISHNAN, S. y LAL B. 2004. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by a Newly Discovered Enteric Bacterium *Leclercia adecarboxylata*. **Applied Environmental Microbiology**. 70: 3163-3166.

SCHNEIDER, J., GROSSER, R., JAYASIMHULU, K., XUE, W. y WARSHAWSKY, D. 1996. Degradation of Pyrene, Benzoantraceno, and Benzopyrene by *Mycobacterium* sp. Strain RJGII-135, Isolated from a Former Coal Gasification Site. **Applied Environmental Microbiology**. 62: 13-19.

SCHNEIDER, K., ROLLER, M., KALBERLAH. y WOLZ, S. 2002. Cancer Risk Assessment for Oral Exposure to PAH Mixtures. **Journal of Applied Toxicology**. 22: 73-83.

SILVA, E., FIALHO, A., CORREIA, I., BURNS, R. y SHAW, L. 2004. Combined Bioaugmentation and Biostimulation to Cleanup Soil Contaminated with High Concentrations of Atrazine. **Environmental Science technology**. 38: 632-637.

SIMON, M., BONNER, J., PAGE, C., TOWNSED, T., MUELLER, D., FULLER. C. y AUTENRIETH, R. 2004. Evaluation of Two Commercial Bioaugmentation Products for Enhanced Removal of Petroleum from a Wetland. **Ecological Engineering**. 22: 263-277.

SONG, H., WANG, X. y BARTHA, R. 1990. Bioremediation Potential of Terrestrial Fuel Spills. **Applied Environmental Microbiology**. 56: 652-656.

STALLWOOD, B., SHEARS, J., WILLIAMS, P. y HUGHES, K. 2005. Low Temperatura Bioremediation of Oil Contaminated Soil Using Biostimulation and Bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from Maritime Antarctica. **Journal of Applied Microbiology**. 99: 794-802.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA. 1995. American Public Health Association. 18<sup>a</sup>. Edición. New York.

STAPLETON, R., SAVAGE, D., SAYLER, S. y STACEY, G. 1998. Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons in an Extremely Acidic Environment. **Applied Environmental Microbiology**. 64: 4180-4184.

STRAUBE, L., NESTLER, C., HANSEN, L., RINGLEBERG, D., PRITCHARD, P. y JONES-MEEHAN, J. 2003. Remediation of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Bioestimulation and Bioaugmentation. **Acta Biotechnology**. 23: 179-196.

STRINGFELLOW, W. y AITKEN, M. 1995. Competitive Metabolism of Naphthalene, Methyl-naphthalenes and Fluorene by Phenanthrene Degrading Pseudomonads. **Applied Environmental Microbiology**. 61: 357-362.

SUDIP, S., SINGH, V. y RAKESH, J. 2002. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Environmental Pollution and Bioremediation. **Trends in Biotechnology**. 20: 243-248.

SYLVIA, D., FUHRMANN, J., HARTEL, P. y ZUBERER, D. 1999. Principles and Applications of Soil Microbiology. New Jersey. Second Edition. Prentice Hall.

TOWSEND, R. Y BONNER, J. 2000. Microbial Dynamics During Bioremediation of a Crude Oil Contaminated Coastal Wetland. **Bioremediation Journal**. 4: 203-218.

UMAÑA, R., STAPLES, R., BATES, B., WILCOX, J. y MAHAMA, C. 1991. Effects of a Microbial Stability and Digestibility of Bermuda Grass Ensiled at Two Moisture Contents. **Journal of Animal Science**. 69: 4588-4601.

URURAHY, A., MARINS, M., VITAL, R., GABARDO, I. y PEREIRA, N. 1998. Effect of Aeration on Biodegradation of Petroleum Waste. **Revista de Microbiología**. 29: 1-9.

VALLEJO, V. 2004. Evaluación de la Bioestimulación (Adición de Nutrientes) en la Biodegradación de TPH en un Suelo Contaminado con Petróleo. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. Facultad de ciencias.

VECCHIOLI, G., COSTANZA, O., GIORGIERI, S. y REMMLER, M. 1997. Extent of Cleaning Achievable by Bioremediation of Soil Contaminated with Petrochemical Sludges. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**. 70: 331-336.

VENOSA, A. y WRENN, B. 1996. Selective Enumeration of Aromatic and Aliphatic Hydrocarbon Degrading Bacteria by a Most Probable Number Procedure. **Canadian Journal Microbiology**. 42: 252-258.

VIDALI, M. 2001. Bioremediation. An overview. **Pure and Applied Chemistry**. 73: 1163-1172.

VIÑAS, M., 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis de doctorado, Universidad de Barcelona. Facultad de Biología. Departamento de Microbiología.

VIÑAS, M., SABATE, J., ESPUNY, J. y SOLANAS, A. 2005. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation During Bioremediation of Heavily Creosote Contaminated Soil. **Applied and Environmental Microbiology**. 71: 7008-7018.

VEGA, L. 1986. Estudios Básicos para el Diseño de una Unidad Piloto de Tratamiento de Alquitrán. Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga. Facultad de fisicoquímica.

WHYTE, L., BOURNONNIERE, L. y GREER C. 1997. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychrotrophic *Pseudomonas* strains Possessing both Alkane (alk) and Naphthalene (nah) Catabolic Pathways. **Applied Environmental Microbiology**. 63: 3719-3723.

YOSHIDA, N., YAGI, K., SATO, D., WATANABE, N., KUROISHI, T., NISHIMOTO, K., YANAGIDA, A., KATSURAGI, T., KANAGAWA, T., KURANE. y TANI, Y. 2005. Bacterial Communities in Petroleum Oil Stockpiles. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 99: 143-149.

ZHOU, J. y CRAWFORD, R. 1995. Effects of Oxygen, Nitrogen and Temperature on Gasoline Biodegradation in Soil. **Biodegradation**. 6:127-140.

# **ANEXOS**

## ANEXO 1

### Preparación de las soluciones estándar de amonio, nitrato y fósforo. (HACH, 1994)

- Preparación de la solución de amonio: Se preparó una solución madre de 1000 ppm de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> disolviendo 3.819 g de NH<sub>4</sub>Cl secado previamente a 100 °C durante 24 horas y diluido en 1000 ml de agua desionizada.
- Preparación de la solución de nitrato: Se preparó una solución madre de 100 ppm de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> disolviendo 0.728 g de KNO<sub>3</sub> secado previamente a 100 °C durante 24 horas y diluido en 1000 ml de agua desionizada.
- Preparación de la solución de fósforo: Se preparó una solución madre de 500 ppm de P-PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> disolviendo 219.5 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> diluida en 1000 ml de agua desionizada.

## ANEXO 2

### Agua buferada (STANDARD METHODS, 1995)

**Solución A.** Fosfato de potasio. Se pesan 34 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se diluye en 500 ml de agua desionizada. Se ajusta el pH a 7.2 – 7.5 con NaOH 1N.

**Solución B.** Cloruro de magnesio. Se pesan 81.1 g de  $\text{MgCl}_2$  y se disuelven en 1000 ml de agua desionizada.

### **ANEXO 3**

#### **Agar infusión suelo (ASM, 1986)**

El agar infusión suelo está compuesto de agar nutritivo y de una infusión de suelo.

Composición para un litro de agua.

600 ml Agua destilada

400 ml Infusión suelo

Se agita y esteriliza en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

- Infusión suelo

Se agregan 250 g de suelo en 1 L de agua destilada. Se agita y se calienta sin dejar hervir durante 15 min. Luego la mezcla se pasa por papel filtro No 4. Se toman 400 ml para 1 L de agar infusión suelo.

## ANEXO 4

### Ficha técnica del medio Bushnell-Haas (BH) (Sigma ®)

**Descripción:** Bushnell-Haas (BH) es recomendado para la determinación de la actividad microbiana en sitios contaminados con hidrocarburos. Este medio contiene todos los nutrientes excepto la fuente de carbono, el cual es necesario para el crecimiento bacteriano.

#### Componentes (g/L):

Sulfato de magnesio.....	0.20
Cloruro de calcio.....	0.02
Fosfato monopotasio.....	1.00
Fosfato dipotasio.....	1.00
Nitrato de amonio.....	1.00
Cloruro ferrico.....	0.05

pH final (a 25 °C)  $7.0 \pm 0.2$

**Perfil del producto:** Polvo blanco ligeramente color ámbar, la observación de cultivos se dá después de 7 días a 25 - 30°C.

**Preparación:** Suspender 3.27 gramos de Bushnell-Haas en 1 L de agua destilada. Disolver el medio completamente. Esterilizar en autoclave a 15 lbs de presión (121 °C) por 15 minutos. La formación de un precipitado blanco antes de esterilizar, y que luego se torna amarillo o naranjado después de esterilizar es normal.

## **ANEXO 5**

### **Preparación de Violeta de iodonitrotetrazolium (INT) (Sigma ®)**

Para una concentración de 0.3% se agrega 3 g de INT en 1000 ml de agua destilada.

Se mezcla el indicador INT en el agua destilada previamente estéril con una barrita magnética.

## ANEXO 6

### Ficha técnica BD sistema de identificación BBL CRYSTAL®

**Descripción:** El sistema de identificación BBL Crystal de bacterias entéricas/no fermentadoras (E/NF) sirve para la identificación de bacterias aerobias gram-negativas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* así como también de los bacilos gram-negativos fermentadores y no fermentadores de glucosa aislados con mas frecuencia.

**Procedimiento:** El sistema BBL Crystal requiere los resultados de los análisis de indol y oxidasa, los cuales se deben hacer a una placa de aislamiento no selectiva de no más de 24 horas.

Se toma un tubo de inculo y se etiqueta. Con asa estéril de plástico y usando técnica aséptica se roma una colonia grande bien aislada (diámetro de 2-3 mm o mayor) o 4-5 colonias mas pequeñas de la misma morfología de una placa de agar sangre tal como agar de soja trypticase con hematíes de oveja al 5%. El uso de placa agar MacConkey también es aceptable.

Se suspende las colonias en un tubo de fluido de inculo BBL Crystal para organismo entéricos.

Se tapona el tubo y se agita en vórtex por 10-15 s.

Se toma una base y se vierte todo el contenido del fluido de inculo en el área objetivo de la base.

Se sostiene la base con ambas manos y se mueve el inculo suavemente de un lado a otro a lo largo de las pistas hasta que se hayan llenado todos los pocillos.

Se alinea la tapa de forma que el extremo marcado de la tapa este en la parte superior del área objetivo de la base.

Se aprieta hasta que se perciba una ligera resistencia. Se coloca el pulgar en el borde de la tapa hacia la parte media del panel en cada lado y se aprieta simultáneamente hasta que la tapa encaje en su lugar.

Todos los paneles se deben incubar mirando hacia debajo de 18-20 h a 35-37°C.

**Lectura:** Después del periodo de incubación todos los paneles deben leerse boca abajo utilizando una caja de luz o el visor del panel BBL Crystal. Se consulta la tabla de colores para obtener una interpretación de las reacciones. Se usa el cuaderno de informes BBL Crystal para registrara las reacciones. A cada resultado del análisis con un resultado positivo se le

asigna un valor de 4, 2 o 1, correspondiendo a la fila donde este ubicado el análisis. Se asigna un valor de cero a los resultados negativos. Después se suman los números resultantes de cada reacción positiva en cada columna. Se genera un numero de 10 dígitos; éste es el numero del perfil.

El número del perfil resultante y los resultados de indol oxidasa deben introducirse en un PC en le que se haya instalado el libro de códigos electrónico del sistema BBL Crystal para obtener la identificación.

## ANEXO 7

### Cálculos para la contaminación del suelo hasta 14.000 mg/kg de TPH

Gramos de suelo a utilizar por parcela = 540,000 g suelo

$$540,000 \text{ g suelo} \times \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} = 540 \text{ kg suelo}$$

$$\frac{14,000 \text{ mg residuo}}{\text{kg de suelo}} \times 540 \text{ kg suelo} = 7'560,000 \text{ mg residuo} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 7,560 \text{ g residuo}$$

$$17,581.39 \text{ ml residuo} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ ml}} = 18 \text{ L residuo}$$

## ANEXO 8

### Ficha técnica del fertilizante inorgánico compuesto (FIC) triple 15 (Nutrimón®)

**Marca Comercial:** Abonos Nutrimón®

**Composición Garantizada:**

Nitrógeno Total (N).....	15%
Nitrógeno Amoniacal (N).....	10.3%
Nitrógeno Nítrico (N).....	4.7%
Fósforo Asimilable (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ).....	15%
Potasio Soluble en Agua (K <sub>2</sub> O).....	15%

**Tipo de Abono:** Fertilizante complejo granulado N-P-K para aplicación al suelo

**Aplicaciones:** Fertilizante de propósito general, indicado para una amplia gama de cultivos, particularmente para algodón, sorgo, arroz, caña y para reabonamiento de la papa.

## ANEXO 9

### Ficha técnica del consorcio de bacterias comerciales RBC 109 (Interbio®)

**Descripción:** RBC 109 son cepas bacterianas altamente especializadas, seleccionadas y adaptadas para degradar un amplio rango de desechos orgánicos. Este producto ha sido usado en plantas petroquímicas, plantas químicas, refinerías, plantas de procesamiento de alimentos y plantas de tratamiento de madera. RBC 109 degrada aceite, combustible, creosota, PCP, hidrocarburos clorinados, grasas, fenoles. BTEX y otros compuestos orgánicos complejos.

#### **Características:**

Recuento bacteriano total: 3 billones/gramo

Apariencia: Polvo blanco

Olor: Como levadura

pH: Neutro

pH efectivo: 6 a 9

Rango de temperatura efectiva: 50 – 110 °F

**Manipulación y almacenamiento:** Almacenar en un lugar fresco y seco. Prevenir la inhalación excesiva. Lavar las manos con agua y jabón después de su uso.

**Aplicación:** Añadir 1 kg de RBC 109 en 10 L de agua destilada a una temperatura de 35 a 36 °C. Se mezcla vigorosamente durante una hora (periodo de preaclimatación), tiempo durante el cual las bacterias son activadas para ser aplicadas.

## ANEXO 10

### Balance de masas C:N:P para la adición de FIC

- Cálculos para la adición de fertilizante inorgánico compuesto (FIC), triple 15 marca Nutrimón®

$$\frac{80 \text{ mg NH}_4\text{NO}_3}{28 \text{ mg N}} \times \frac{1400 \text{ mg N}}{\text{kg}} = 4000 \text{ mg NH}_4\text{NO}_3/\text{kg}$$

$$\frac{4000 \text{ mg NH}_4\text{NO}_3}{\text{kg}} \times 450 \text{ kg suelo} = 1800,000 \text{ mg NH}_4\text{NO}_3$$

$$\frac{100 \text{ g fertilizante}}{15 \text{ g N}} \times 1800 \text{ g N} = 12000 \text{ g} \times \frac{1 \text{ kg}}{1000 \text{ g}} = 12 \text{ kg Triple 15}$$

## ANEXO 11

### Densidad bacteriana en el suelo después de la aplicación de RBC 109 (Interbio ®)

$$\frac{1 \times 10^{12} \text{ UFC}}{\text{gr}} \times \frac{1000 \text{ gr}}{10000 \text{ ml}} = 1 \times 10^{11} \text{ UFC/ml}$$

$$\frac{1 \times 10^{11} \text{ UFC}}{\text{ml}} \times \frac{10000 \text{ ml}}{450.000 \text{ gr}} = 1 \times 10^9 \text{ UFC/gr}$$

## ANEXO 12

### Determinación de nutrientes

- Determinación de Nitrato  $\text{N-NO}_3^-$ . Método 366 de HACH, 1994

Para la determinación de  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{N-NH}_4^+$ , se debe realizar una extracción acuosa de N para suelo, para ello se colocan  $3.5 \text{ cm}^3$  de suelo en la botella de extracción y se afora hasta la marca de 25 ml con agua desionizada. Luego se agregan 0.02 g de polvo de extracción para nitrato se cierra la botella y se agita por 30 s. El sobrenadante debe ser claro y transparente. Antes de la extracción las muestras de suelo se deben secar a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante toda la noche.

Para la detección de  $\text{N-NO}_3^-$  de una muestra de suelo se toma 1 ml del extracto acuoso y se diluye con agua desionizada hasta la marca de 25 ml, se adiciona el contenido de 1 sobre de Nitraver 6 el cual contiene cadmio y reduce los iones  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ . Se agita durante 3 min y se deja reposar en un periodo de 2 min donde sigue el asentamiento del cadmio, luego se vacía el sobrenadante a otra celda teniendo cuidado de no transferir partículas de cadmio. En seguida se adiciona un sobre de Nitraver 3 el cual contiene sulfamida que reacciona con los iones presentes de  $\text{NO}_2^-$ , se agita durante 30 s y dentro de 10 min se lee la muestra a una longitud de onda de 500 nm en el espectrofotómetro. A parte se prepara un celda únicamente con agua desionizada el cual es el blanco.

- Determinación de  $\text{N-NH}_4^+$ , Método 391 de HACH, 1994.

Para la determinación de  $\text{N-NH}_4^+$  se toma 1 ml del extracto acuoso anteriormente preparado y se afora hasta la marca de 25 ml con agua desionizada, se aplican 5 gotas de Nitrógeno de Amonio solución 1 a la celda. Luego se adiciona 1 ml de reactivo de Nessler que reacciona con los iones de amonio presentes en la muestra, se mezcla y se lee la muestra a una longitud de onda de 425 nm en el espectrofotómetro.

- Determinación de  $\text{P-PO}_4^{3-}$ , Método 531 de HACH, 1994.

Para la determinación de  $P-PO_4^{3-}$  se hace una extracción de P con bicarbonato, con el cual se convierten todas las formas de fósforo presentes en el suelo a fracciones disponibles de orto-fosfato. Se toma 1 g de suelo y se añade en la botella de extracción y se afora hasta la marca de 20 ml con agua desionizada. Se adiciona 0.9 g del polvo de extracción para suelo No 3, se cierra la botella y se agita durante 30 s. Se deja reaccionar por 10 min, se agrega 0.02 g de polvo de extracción para nitratos y se agita por 30 s. El sobrenadante debe ser claro y transparente. Antes de la extracción las muestras de suelo se deben secar a 60 °C durante toda la noche.

Para el análisis de fósforo se adiciona 5 ml del extracto acuoso en una celda y se afora hasta 25 ml con agua desionizada, se agrega el contenido de un sobre de Phosver 4 en pequeñas proporciones, Phosver 4 contiene ácido ascórbico que reacciona con el orto-fosfato, produciendo color azul. La reacción ocurre en tres minutos y luego se lee la muestra a una longitud de onda de 890 nm en el espectrofotómetro.

## **ANEXO 13**

### **Determinación de pH (EPA 9045C, 1995)**

Se pesan ~20 g de suelo en un vaso de precipitado de 50 ml con 20 ml de agua desionizada, se agita la suspensión continuamente durante 5 min y se deja decantar el suelo durante 1 hora. Luego se hace la medición con un pH-metro HACH con control de temperatura calibrado con una solución amortiguadora de pH 7, comprobando el ajuste con una solución de pH 4.

## ANEXO 14

### Determinación de humedad por peso seco (IGAC, 1979)

Se pesan ~10 g de la muestra de suelo en una bandeja de aluminio la cual debe ser pesada previamente. Las muestras se secan durante 12 horas a 105°C. La diferencia de peso antes y después del suelo, descontando el peso de la bandeja permiten obtener la fracción de peso seco (ps) y de humedad (Roldán, 2002).

El peso seco se utiliza para la corrección de los resultados y su posterior análisis.

$$Ps = \frac{\text{Peso Seco (g)}}{\text{Peso Húmedo (g)}}$$

$$\text{Humedad} = \frac{\text{Peso Húmedo (g)} - \text{Peso Seco (g)}}{\text{Peso Húmedo (g)}} \times 100$$

## ANEXO 15

### Determinación de la producción de CO<sub>2</sub> (CAMPOS, 2002)

La medición se hace directamente sobre las unidades experimentales. Cada una tendrá dos frascos de vidrio con volumen de 210 cc, los cuales estarán colocados boca abajo y cada uno contendrá en su interior un frasco de capacidad de 10 cc. Los frascos de vidrio con capacidad de 10 cc se les añade 10 ml de solución 1 N de NaOH junto con una tira de papel de filtro.

Para incubar los frascos de vidrio dentro de la unidades experimentales estos se cubrirán con los de volumen de 220 cc, teniendo la precaución de enterrar estos últimos 2 cm para prevenir la no salida y entrada de CO<sub>2</sub>.

Una vez concluido el tiempo de incubación se vacían los contenidos de los frascos de 10 cc (NaOH) en un erlenmeyer de 125 ml agregando el papel filtro. Luego se titula con solución de HCl 0.1 N con 3 gotas de fenolftaleína como indicador. Antes de titular se añade 2 ml de cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>) para precipitar el carbonato.

Se deben realizar titulaciones testigo de los 10 ml de frascos sin suelo para cada tratamiento, los cuales darán el valor de referencia para el calculo de CO al cual se le restaran los ml gastados de NaOH en las otras muestras. Los anteriores valores se promedian para obtener un solo valor de titulación testigo, para aplicarlos a todos los tratamientos.

## ANEXO 16

### Perfiles bioquímicos de las especies aisladas según BBL CRYSTAL®

Ingrediente activo	<i>P. putida</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. iwoffii</i>	<i>S. maltophilia</i>	<i>C. violaceum</i>	Principio
Arabinosa	-	-	-	-	-	La utilización de carbohidratos produce un descenso de pH y un cambio en el indicador (rojo-fenol).
Manosa	+	+	-	-	-	
Sacarosa	-	-	-	-	-	
Melibiosas	-	-	-	-	-	
Ramnosa	-	-	-	-	-	
Sorbitol	-	-	-	-	-	
Manitol	-	-	-	-	-	
Adonitol	-	-	-	-	-	
Galactosa	+	+	-	-	-	
Inositol	-	-	-	-	-	
p-n-p-fosfato	-	+	-	+	+	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril sustituido o éster de fosfato libera p-nitrofenol amarillo.
p-n-p a-β-glucósido	-	-	-	+	-	
p-n-p β-galactósido	-	-	-	-	-	
Prolina nitroanilina	+	+	-	-	-	La hidrólisis enzimática del sustrato amida incoloro libera p-nitroanilina de color amarillo
p-n-p bis-fosfato	+	-	-	+	+	La hidrólisis enzimática del glucósido incoloro aril sustituido o éster de fosfato libera p-nitrofenol amarillo.
p-n-p-xilósido	-	-	-	-	-	
p-n-p-a-arabinósido	-	-	-	-	-	

p-n-p-fosforilcolina	-	-	-	-	-	
p-n-p-β-glucurónido	-	-	-	-	-	
p-n-p-N-acetil glucosamidina	-	-	-	-	+	
Y-L-glutamil p-nitroanilida	+	+	-	+	+	La hidrólisis enzimática del sustrato amida incoloro libera p-nitroanilina de color amarillo.
Esculina	-	-	-	+	-	La hidrólisis de la esculina produce un precipitado negro en presencia de iones férricos.
p-nitro-DL-fenilalanina	-	-	-	-	-	La desaminación oxidativa de la fenilalanina produce un color pardo en presencia de iones férricos.
Urea	+	+	-	+	+	La hidrólisis de la urea y el amonio -resultante cambia el color del indicador -de pH (azul de bromotimol)
Glicina	+	+	-	+	+	La degradación de la glicina libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
Citrato	+	+	-	+	+	La degradación del citrato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
Acido malónico	+	+	-	+	-	La degradación del malonato libera metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH (azul de bromotimol)
Cloruro de trifenil tetrazolio	+	+	-	+	+	La reducción del compuesto de tetrazolio produce la formación de un formazán rojo.
arginina	+	+	-	+	+	El catabolismo anaerobio produce una elevación del pH y un cambio en el color del indicador (púrpura bromocresol).
Lisina	+	+	-	+	+	