

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE CIENCIAS EN CONSERVACIÓN DE
SUELOS Y AGUA**



**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ENCALADO (CALCITA), EN LA
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS**

Tesis

Para optar el título de:

INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

MENCIÓN CONSERVACIÓN DE SUELOS Y AGUA

Presentado por:

IMER WAN CHANG HUAYASCO

Tingo María – Perú

2013

DEDICATORIA

A mis padres Cesar Augusto
Chang Briones y Julia Huayasco
Espinoza: por el amor, esfuerzo y
perseverancia y todo el apoyo y
dedicación para con sus hijos

A mi hermano Julio Cesar Chang
Huayasco por apoyarme en momentos
tan importantes a pesar de sus
incomodidades

Al amor de mi vida Deysi Pilar Juárez
Torres, por su comprensión y ayuda en el
logro de mis objetivos para alcanzar las
metas de mi profesionalización

A mis amigos, compañeros, profesores
que me motivaron a seguir adelante a
pesar de las circunstancias adversas y me
enseñaron que todo se puede con
perseverancia y humildad.

AGRADECIMIENTO

- A DIOS, por darme la vida y/o salud, fuerzas y sabiduría para poder permitirme culminar satisfactoriamente mi especialización profesional.
- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva y docentes de la Facultad de Recursos Naturales Renovables, por contribuir en mi especialización profesional.
- Al Mg. Ing. Sandro Ruiz Castre, asesor del presente trabajo de investigación científica, por su aporte durante el trabajo de investigación y copatrocinador del presente trabajo, por sus aportes durante todo el trabajo de investigación y su apoyo con la ejecución de esta tesis.
- Al Blgo. M. Sc. Armando Eneque Puicon, por su apoyo en la obtención de las muestras de suelos contaminados y sus aportes durante todo el trabajo de investigación.
- Al Ing. Ricardo Martin Chávez Asencio por su apoyo, exigencia y consejo para seguir adelante con esta tesis y así alcanzar mi meta de ser profesional.
- A los jurados de tesis: Dr. López López Cesar Samuel, Ing. Mg. Torres Garcia Jaime, y al Ing. Mg. Roberto Obregón Peña, por sus oportunas sugerencias.
- A todas las personas que de una u otra forma me brindaron su apoyo y muy en especial a Gina Lorena Ramos Chepe y al Ing. Richar Sias Bailon por aportar sus conocimientos en la ejecución de esta tesis y por su apoyo en la ejecución de este.

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto del encalado (calcita) en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, en esta investigación se usó un suelo contaminado de Pucallpa facilitado por la empresa MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L. La metodología empleada para obtener la cantidad de hidrocarburo totales de petróleo que contenía este suelo contaminado fue el de Soxhlet, posteriormente se aislaron los microorganismos presentes en este suelo para su selección como organismos degradadores de hidrocarburos totales de petróleo, seguido de esto al suelo contaminado se le agregaron tres tipos de dosis de calcita (4.2, 6.3 y 8.4 gramos/2kg suelo), a continuación de esta acción se extrajo 10 gramos de suelo contaminado al cual se le agregaron las dosis de calcita, cada dosis con dos repeticiones y se colocaron en los biorreactores los cuales contenían medio mínimo de sales, glucosa, los microorganismos seleccionados y activados; a estos biorreactores se les tomaron datos a los 7 y 14 días de haber sido instalados, con una repetición a cada tratamiento, de los datos obtenidos y aplicando el análisis de varianza y prueba HDS de Tukey, se obtuvo que el tratamiento control y el tratamiento 3 (8.4 gr/2kg suelo) significativamente son iguales y mejores que el tratamiento 1 (4.2 gr/2kg de suelo) y tratamiento 2 (6.3 gr/2kg de suelo), a la vez de los datos se obtuvo que el tratamiento 3 se desarrollaron más microorganismos

que en los demás tratamientos a los 7 días de haber iniciado la biorremediación y a los 14 días de iniciado la biorremediación el tratamiento control presento mayor presencia de microorganismos.

Concluyendo que se puede mejorar las condiciones del suelo con respecto a su pH y a la vez se puede obtener una mejor biorremediación, con un suelo con pH adecuado para sembrar algunas plantas.

I. INTRODUCCION

La contaminación de suelos por hidrocarburos es un problema importante en la mayor parte de los países productores de petróleo. La matriz suelo es espacialmente variable y está demostrado que las propiedades químicas, que juegan un papel importante en la adsorción del contaminante, tales como pH, textura y materia orgánica, muestran una distribución altamente variable.

La biorremediación es considerada como la vía más efectiva para la remediación de suelos contaminados, en contraste a alternativas más costosas como la incineración. Los tratamientos biológicos de degradación en suelos pueden ser eficientes y económicos si las condiciones de biodegradación son optimizadas. Se define como Biorremediación al proceso de aceleración de la tasa de degradación natural de hidrocarburos. El proceso de degradación requiere control de variables operacionales tales como nutrientes, humedad y oxígeno.

Esta técnica puede ser aplicada *In-situ*, en el lugar donde se encuentra el suelo contaminado, o *Ex-situ*, cuando el suelo se traslada a una instalación para su tratamiento. El tratamiento *Ex-situ* de suelos, sedimentos y otros sólidos contaminados con hidrocarburos se puede realizar en un variado

número de procesos en fase sólida y en fase lodo. Los procesos en fase sólida son aquellos en donde el suelo se trata con un contenido de agua mínima. En los casos de los procesos en fase lodo se suspende el suelo en agua.

La actividad de los microorganismos presentes en el suelo se puede favorecer mejorando determinadas condiciones edáficas, añadiendo nutrientes, agua, oxígeno y modificando el pH. Otra forma es la introducción de nuevas especies para aumentar la concentración de microbiota presente.

Sobre lo indicado se planteó ¿Cuál es efecto del encalado (calcita) en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos?

Teniendo como hipótesis que el encalado (calcita) permitirá que el proceso de biorremediación se pueda dar en menor tiempo de lo que normalmente necesita y además proporcionará condiciones adecuadas al suelo con respecto al pH, esto debido a que la calcita agregada al suelo influirá acelerando el metabolismo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos totales de petróleo.

1.1. Objetivo general.

Evaluar el efecto del encalado en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

1.2. Objetivos específicos.

- Determinar la cantidad de hidrocarburo totales de petróleo que presenta este suelo contaminado al iniciar a los 7 días y a los 14 días del proceso de biorremediación.
- Determinar la textura, pH y porcentaje de humedad del suelo contaminado con hidrocarburo.
- Determinar las tres dosis de encalado (calcita) que permitan la aceleración de la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.
- Aislar, seleccionar e identificar los microorganismos degradadores de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Composición del crudo del petróleo

2.1.1. Composición general

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (ROSINI, 1960). Los hidrocarburos componen la familia predominante de compuestos (un 50-98% de la composición), por lo que constituyen uno de los grupos de contaminantes ambientales más importantes, tanto por su abundancia, como por su persistencia en distintos compartimentos ambientales (CASELLAS *et al.*, 1995). Mayoritariamente son alcanos de cadena lineal (n-alcanos o n-parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos. La composición elemental de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84-87% de C, 11-14% de H, de 0-8% de S, y de 0-4% de O y N y metales como el níquel y el vanadio. Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones (cuadro 1): i) fracción saturada (n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las cicloparafinas), ii) fracción aromática (monoaromáticos,

diaromáticos y hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), iii) fracción de resinas y iv) fracción de asfaltenos que son menos abundantes y consisten en compuestos más polares, pudiéndose encontrar hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados y agregados de alto peso molecular (SPEIGHT, 1991).

Cuadro 1: composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo

Fracción	Composición
Saturados	<i>n</i> -alcanos, alcanos de cadena ramificados e isoprenoides, y cicloparafinas o cicloalcanos, hopanos.
Aromáticos	Hidrocarburos monoaromáticos, diaromáticos, aromáticos policíclicos (HAP)
Resinas	Agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas
Asfaltenos	Agregados de HAP, ácidos nafténicos, sulfuros, ácidos grasos, metaloporfirinas, fenoles polihidratados.

Fuente: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica, Marc Viñas (2005).

2.1.2. Composición por familias de hidrocarburos

El estudio más detallado de los hidrocarburos de un crudo de petróleo agrupa estos compuestos en las siguientes familias: parafinas volátiles (alcanos no ramificados y ramificados, hasta C10), parafinas no volátiles (alcanos lineales y ramificados entre C10- C40), naftenos (cicloalcanos o cicloparafinas), oleofinas (alquenos) y aromáticos (monoaromáticos y poliaromáticos). En un grupo

aparte residirían los componentes de las resinas y los asfaltenos. (MARC VIÑAS, 2005).

2.1.2.1. Parafinas volátiles (n - alcanos e isoprenoides volátiles).

Representan hasta un 30% del crudo de petróleo. Son n-alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C1-C10 (de 1 a 10 átomos de carbono). Es la fracción más volátil del crudo y por lo tanto la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización. La fracción gas natural contiene, principalmente C1-C5. Los isoprenoides volátiles, están representados principalmente por el isobutano e isopentano. Los homólogos de mayor peso molecular disminuyen su presencia en el crudo con el incremento de peso molecular. Los isoprenoides volátiles también pueden llegar hasta C10 (2,6 dimetil octano).

2.1.2.2. Parafinas no volátiles (n – alcanos e isoprenoides).

Se definen como aquella n-alcanos y aquellas isoprenoides entre C11-C40. Los componentes entre C11-C15 son de volatilidad intermedia. Los n-alcanos oscilan entre C11-C40, aunque se han descrito cadenas más largas y pueden constituir entre el 15-20% de crudos no degradados. Los isoprenoides varían de C12-C22 y constituyen entre 1-2% del crudo, llegando a 15% en crudos degradados. En el cuadro 2 pueden verse los isoprenoides presentes en un crudo con interés en el campo de la geoquímica y la biorremediación.

Cuadro 2: isoprenoides componentes del crudo de petróleo de interés geoquímico

Isoprenoide	Átomos de C	Nomenclatura
Pristano	19	2,6,10,14-tetrametilpentadecano
Fitano	20	2,6,10,14-tetrametilhexadecano
Farnesano	15	2,6,10-trimetildodecano
Norpristano	18	2,6,10-trimetilpentaecano
I21	21	2,6,10,14-tetrametilheptadecano

Fuente: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica, Marc Viñas (2005).

El pristano y fitano se han utilizado como marcadores internos del grado de biodegradación de un crudo, pero actualmente no deberían utilizarse, ya que se han descrito tanto su biodegradación como sus vías catabólicas. Actualmente se utilizan los hopanos.

2.1.2.3. Naftenos (cicloalcanos).

Esta familia está compuesta por las cicloparafinas o cicloalcanos. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31% del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos corresponden al 50-55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%. Esta familia engloba a los hopanos, antes mencionados.

2.1.2.4. Oleofinas (alquenos).

Los alquenos están poco presentes en el crudo de petróleo, encontrándose en concentraciones traza. Adquieren importancia en los productos resultantes del refinado, ya que se generan durante el proceso de cracking, existiendo hasta un 30% en gasolinas y un 1% en fueles.

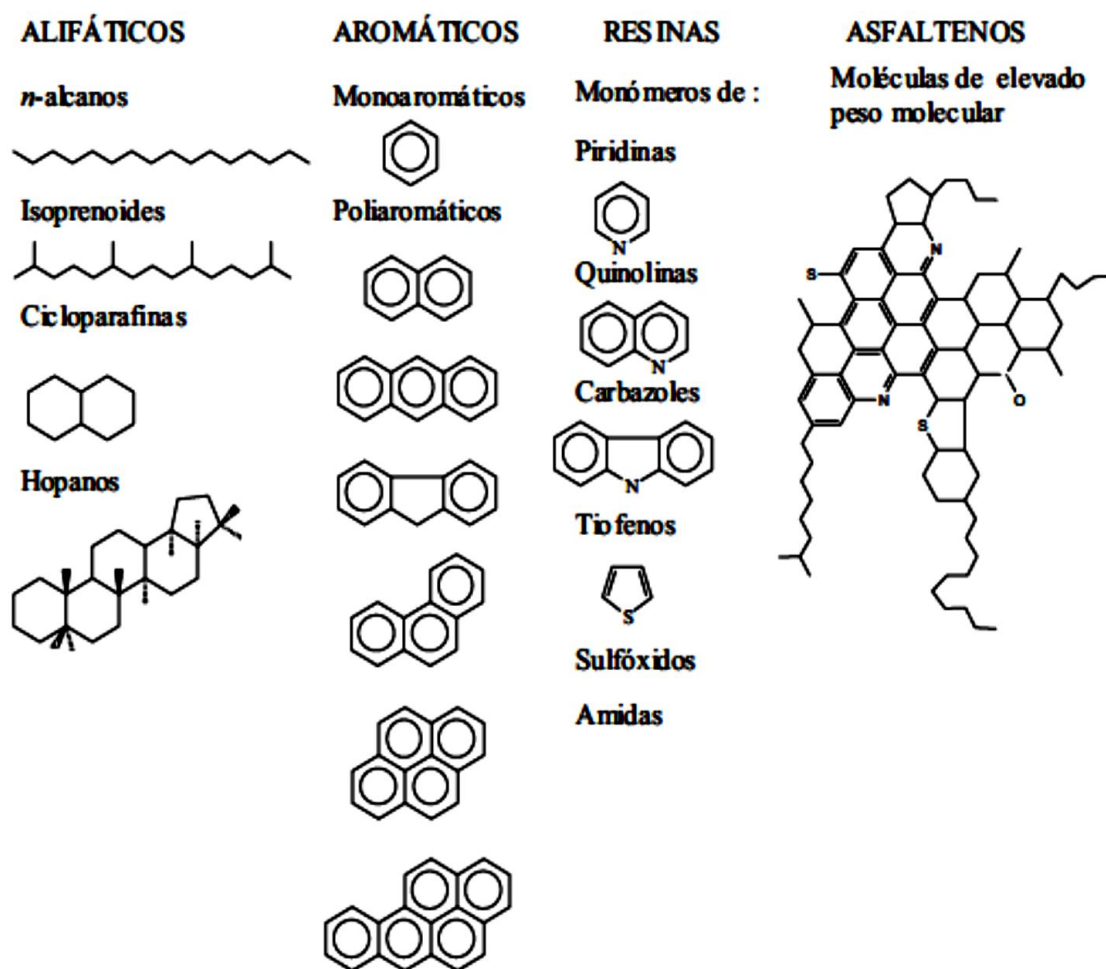


Grafico 1: Estructura química de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo

2.1.2.5. Hidrocarburos aromáticos.

El crudo de petróleo contiene una mezcla muy compleja de hidrocarburos aromáticos. Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Así encontramos hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos).

2.1.2.5.1. Hidrocarburos mono aromáticos.

Se encuentran el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad.

2.1.2.5.2. Hidrocarburos poli aromáticos.

Entre los hidrocarburos diaromáticos, encontramos el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetrametilnaftalenos). Constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en un crudo (Grafico. 1).

Entre los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos, encontramos el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados. El fenantreno y los metilfenantrenos, representan los componentes mayoritarios de los triaromáticos (Grafico. 1).

Entre los hidrocarburos poi aromáticos de más de tres anillos, encontramos el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencenico), pireno y

criseno (4 anillos aromáticos), pireno y benzo(a)pireno (5 anillos aromáticos) y coroneno (un HAP pericondensado con 6 anillos) (Grafico. 1).

También se pueden incluir compuestos muy relacionados con los hidrocarburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre (tiofenos, dibenzotiofenos) o nitrógeno (carbazoles).

2.1.2.6. Resinas y asfáltenos.

Se trata de mezclas complejas, integradas por núcleos policíclicos o naftenoaromáticos. Contienen cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre (componentes NOS del petróleo) y a veces están asociadas con pequeñas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel. Constituyen entre un 10% en crudos poco degradados o ligeros, hasta un 60% en crudos muy degradados. Es la fracción que presenta una mayor recalcitrancia de un crudo de petróleo. Se trata de agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos, amidas, HAP, sulfuros, ácidos nafténicos, ácidos grasos, metaloporfirinas y fenoles polihidratados.

2.1.3. Composición del crudo según el origen

La composición de un crudo varía según su localización. Habitualmente, todos los crudos de petróleo (no degradados) contienen alcanos (de cadena lineal y ramificada, de C1 a C40 aproximadamente, cicloalcanos o naftenos e hidrocarburos aromáticos. Las fracciones de punto de ebullición menor, están formadas por alcanos en todos los casos, mientras que la composición de

las fracciones superiores varía según la fuente del petróleo. Se denomina crudo parafínico o ligero cuando el crudo contiene una elevada proporción de parafinas (n-alcanos y alcanos ramificados), y asfáltico o pesado si predominan naftenos (cicloalcanos), alcanos de cadena larga (C30-C45) y HAPs (Howe- Grant, 1996). Según el origen, tenemos crudos parafínicos o asfálticos.

2.2. Antecedentes en el estudio de la degradación de crudos de petróleo.

2.2.1. Biodegradación de crudo de petróleo mediante cepas aisladas

La elevada complejidad de la composición del crudo de petróleo y derivados, implica la existencia de una amplia capacidad enzimática si se quiere conseguir una degradación significativa del crudo. La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas individuales o con la combinación de diferentes cepas aisladas (SOLANAS *et al.*, 1984). En la mayoría de los casos, son degradadoras de alcanos, debido a que los alcanos son los componentes más abundantes del crudo de petróleo. No obstante en algunos casos, estas cepas tienen la capacidad de oxidar selectivamente las cadenas alquílicas de ciertos HAPs alquilados, compuestos abundantes en el crudo. Resultados anteriores conseguidos en nuestro grupo de investigación utilizando la cepa *Pseudomonas* sp. F21, aislada en medio mineral con un crudo ligero de Arabia corrobora la anterior afirmación; la cepa F21, la cual degrada todos los n-alcanos y los alcanos ramificados de bajo peso molecular (isoprenoides ligeros), también es capaz de degradar selectivamente las formas metiladas del naftaleno, fenantreno, pireno y criseno (BAYONA *et al.*, 1986; SOLANAS *et al.*, 1984). Sin

embargo, la cepa F21 es incapaz de utilizar los HAPs no substituidos (parentales), y por lo tanto la disminuci3n de los alquil-HAPs se debe probablemente a la oxidaci3n de las cadenas alqu3licas, tal y como ya se ha descrito en otros degradadores de alcanos (DAVIS y RAYMOND, 1961). Recientemente, se han descrito algunas cepas con la capacidad de degradar tanto HAPs de elevado peso molecular como alcanos, pero 3sta, no parece que sea una norma general. De hecho los degradadores de alcanos citados habitualmente en la bibliograf3a generalmente no son capaces de romper el anillo arom3tico de los HAPs, mientras que los degradadores de HAPs generalmente no crecen con alcanos (FOGHT *et al.*, 1990).

2.2.2. Biodegradaci3n de crudo de petr3leo por cultivos mixtos.

La alternativa a la utilizaci3n de cepas individuales es la obtenci3n y utilizaci3n de cultivos mixtos, los cuales pueden ser consorcios definidos y consorcios no definidos. Los consorcios definidos se caracterizan por ser una combinaci3n de cepas aisladas con capacidades degradativas conocidas que son complementarias entre s3. (CASELLAS *et al.*, 1998). Los consorcios no definidos se caracterizan por ser el resultado de procesos directos de enriquecimiento a partir de muestras ambientales con historia previa de contaminaci3n y por lo tanto no son el resultado de una combinaci3n de cepas previamente aisladas.

2.2.2.1. Consorcios definidos.

Los consorcios definidos est3n bien caracterizados y son repetitivos pero tienen ciertas desventajas. En primer lugar, se necesitar3a un gran n3mero de

cepas distintas para conseguir una degradación extensa del crudo de petróleo, debido a la gran cantidad de componentes presentes y al espectro metabólico limitado de una cepa bacteriana. De hecho, tal y como se ha descrito anteriormente, muchos degradadores de alcanos no utilizan HAPs parentales, y entre los degradadores de HAPs, se ha descrito que, o bien degradan hidrocarburos monoaromáticos, o bien degradan HAPs de 2 a 3 anillos o de 3 a 4 anillos (VAN HAMME *et al.*, 2003). Existe poca información acerca de cepas que crezcan en los HAPs alquilados de 3 o más anillos aromáticos, muy abundantes en los crudos de petróleo. Además, habitualmente no se describe una degradación significativa de la parte no resuelta por cromatografía (UCM), constituida por componentes aún no identificados. Otra desventaja que podemos encontrar en los consorcios definidos es la posible formación de metabolitos intermediarios que sean tóxicos para la misma cepa o para otras cepas existentes en el mismo (CASELLAS *et al.*, 1998). De hecho, se ha descrito que durante la degradación de mezclas de hidrocarburos se pueden formar intermediarios de persistencia y toxicidad desconocidas, por fenómenos de cometabolismo (GRIFOLL *et al.*, 1995).

2.2.2.2. Consorcios no definidos.

Los consorcios no definidos, especializados en la degradación de hidrocarburos, se obtienen a partir de enriquecimientos de muestras ambientales donde hayan existido episodios previos y recurrentes de contaminación por hidrocarburos. El resultado es una población microbiana seleccionada de forma natural por su cooperación metabólica en la degradación de la mezcla en cuestión,

la cual potencialmente dispone de una mayor eficiencia en la degradación de compuestos conocidos y desconocidos que un consorcio definido. Por lo tanto, es más probable que en un consorcio no definido se hayan seleccionado degradadores de productos finales (dead-end products) que se acumulan como resultado de procesos cometabólicos (GRIFOLL *et al.*, 1995).

2.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

2.3.1. Estructura de los HAPs

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se definen por ser estructuras formadas por 2 o más moléculas de benceno fusionadas. Se conocen unos 100 HAPs diferentes ya que existe una elevada cantidad de isómeros. La estructura atómica del anillo bencénico les confiere una gran estabilidad termodinámica debido a la elevada energía de resonancia negativa que proporciona contener seis orbitales moleculares π por solapamiento cíclico. Todos los compuestos con sistemas electrónicos π -cíclicos son catalogados como aromáticos.

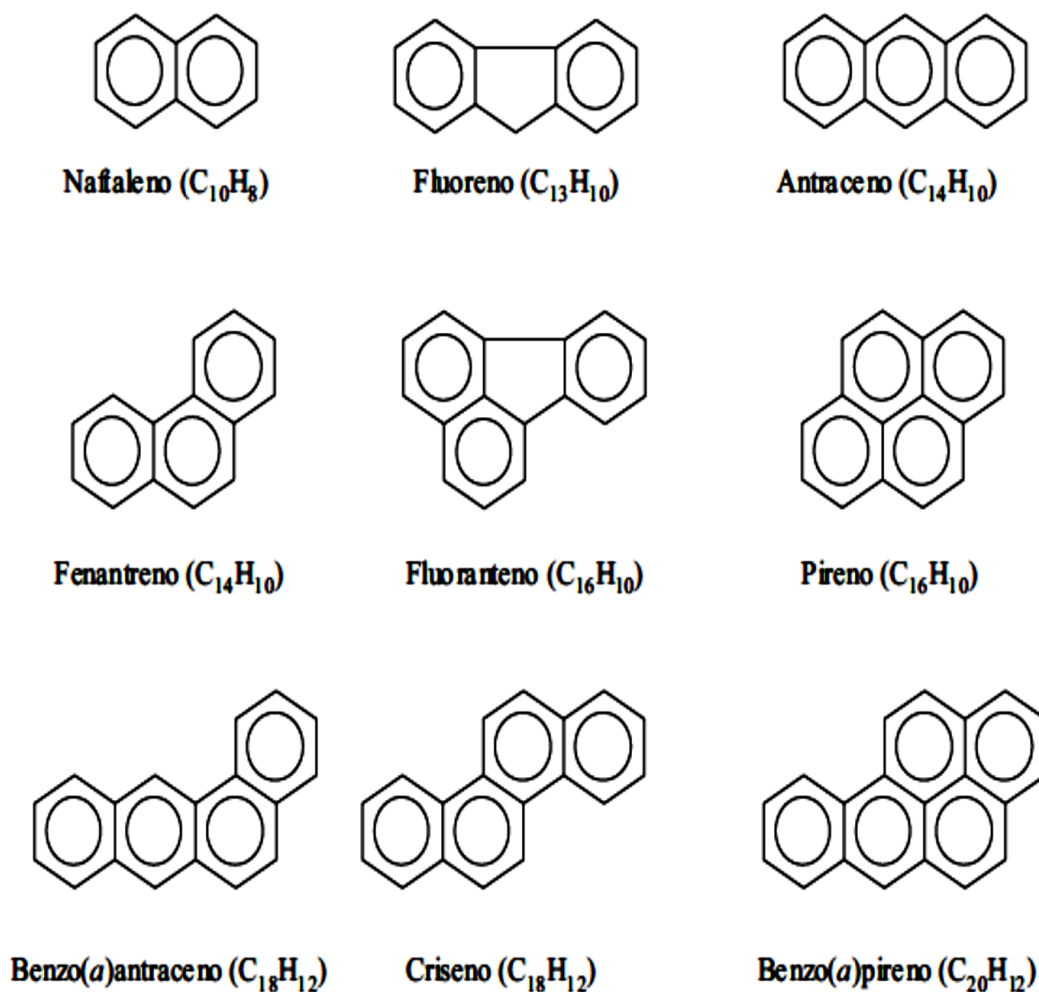


Grafico 2: Estructura química de hidrocarburos aromáticos poli cíclicos

2.3.2. Origen y distribución de los HAPs en el medio ambiente.

El anillo bencénico es una de las estructuras más ampliamente distribuida en la naturaleza. Se encuentra formando parte de compuestos mono y policíclicos, así como de otras sustancias más complejas como la lignina (DAGLEY, 1981). Los HAPs se forman por la exposición de moléculas orgánicas a elevadas temperaturas (pirólisis), así como también por exposiciones a menor

temperatura (100-150°C) y a elevadas presiones durante millones de años en sedimentos, durante la formación del petróleo (origen petrogénico). Las mezclas de HAPs de origen petrogénico se distinguen de las pirolíticas por ser más ricas en HAPs alquilados debido a la diferente temperatura de formación.

Cuadro 3: Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios de la EPA

Compuesto	PM ^a	Punto Fusión (°C)	Punto Ebull. (°C)	Solubilidad agua (mg l ⁻¹) ^b	log k _{ow} ^c	log k _{oc} ^d
Naftaleno	128	80	218	30,0	3,37	3,1
Acenaftileno	152	92	265	16,1	4,07	ND ^e
Acenafteno	154	96	279	3,47	4,33	3,8
Fluoreno	166	116	298	1,8	4,18	3,9
Fenantreno	178	101	340	1,29	4,46	4,1
Antraceno	178	218	342	0,073	4,45	4,3
Fluoranteno	202	110	375	0,260	5,33	4,3
Pireno	202	150	404	0,135	5,32	4,8
Benz(a)antraeno	228	159	435	0,014	5,61	4,8
Criseno	228	256	448	0,0006	5,86	4,9
Benzo(b)fluoranteno	252	168	ND	0,0012	6,57	6,2
Benzo(k)fluoranteno	252	217	480	0,00055	6,84	5,6
Benzo(a)pireno	252	179	495	0,0038	6,04	5,3
Dibenzo(a,h)antraceno	278	267	524	0,0005	6,75	6,3
Benzo(g,h,i)perileno	276	278	ND	0,00026	7,23	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276	162	ND	0,062	7,66	6,2

^aPM: Peso molecular. ^b20°C. ^ck_{ow}: equivale a la proporción del número de moléculas que existirían en la fase octanol respecto a la fase agua si utilizáramos una mezcla octanol:agua 1:1 como solvente. ^dk_{oc} es la proporción de moléculas de HAP que se encontrarían en la materia orgánica del suelo respecto a las que encontraríamos en la fase agua, en un suelo saturado de agua. ^eND: No determinado. Datos de la tabla según (Kästner, 2000).

Fuente: *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*, Marc Viñas (2005).

Las características más importantes que condicionan el comportamiento de los HAPs en el medio ambiente van ligadas a las características fisicoquímicas propias de la estructura de cada HAP (cuadro 3.). Son de gran importancia la hidrofobicidad, que aumenta cuanto mayor sea el número de anillos y la volatilidad de los HAPs de menor peso molecular. Debido a las propiedades hidrofóbicas, los HAPs muestran una fuerte tendencia a adsorberse a las superficies lo que dificulta su biodegradación, así como a acumularse en la cadena trófica. De hecho los compuestos aromáticos heterocíclicos, los cuales contienen átomos de nitrógeno, azufre u oxígeno, también pueden considerarse HAPs, en sentido amplio, debido a que también muestran características similares.

Cuadro 4: Fuentes de HAPs

Naturales:
Fuegos forestales
Producción por seres vivos
Filtraciones naturales de petróleo
Erupciones volcánicas
Antropogénicas :
Combustión de madera y combustibles fósiles
Emisiones de vehículos, aviones y embarcaciones
Industria del petróleo
Prospecciones y extracción
Accidentes de transporte
Almacenamiento
Refinado
Aguas de deslastre
Residuos
Creosota
Utilización de petróleo y derivados
Procesos industriales
Aguas residuales urbanas e industriales
Aguas de escorrentía urbanas y de carreteras
Humo de tabaco
Incineración de residuos

Fuente: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica, Marc Viñas (2005).

Los HAPs existentes en el medio ambiente (atmósfera, suelo y ecosistemas acuáticos) pueden proceder tanto de la naturaleza como de la actividad humana (Cuadro 4).

Básicamente las fuentes de HAPs se resumen en tres: el petróleo o origen petrogénico, la combustión o origen pirolítico (a partir de combustibles

fósiles, madera, erupciones, etc.) y la síntesis por seres vivos, cuya aportación es minoritaria (BORNEFF *et al.*, 1968).

La agencia de protección ambiental americana ha incluido los HAPs entre sus contaminantes prioritarios. Esto fundamentalmente se debe a la peligrosidad intrínseca de los HAPs, debido a la toxicidad aguda y a la toxicidad de tipo teratogénico, mutagénico y carcinogénico que presentan. (CERNIGLIA *et al.*, 1989). Asimismo también se bioacumulan y su biodegradación en general es mucho más lenta, especialmente los de elevado peso molecular que la de otros hidrocarburos.

2.3.3. Biodegradación de HAPs.

Los microorganismos juegan un papel importante en la eliminación de los HAPs en los ecosistemas terrestres y acuáticos, siendo la degradación microbiana el principal proceso de descontaminación natural. Por lo tanto es necesario un buen conocimiento y control de este proceso natural para aplicarlo a tecnologías de biorremediación (WHISE, 2000)

En el Grafico 3. se muestran las primeras reacciones de transformación aeróbica de los HAPs, siendo característico de los hongos y los mamíferos la introducción de un solo átomo de oxígeno mediante una monooxigenasa que contiene el citocromo P-450, y la transformación a trans-dihidrodiol. En este proceso de transformación se generan metabolitos más

solubles, para su posterior eliminación (proceso de detoxificación) (CERNIGLIA, 1984; CERNIGLIA *et al.*, 1985).

Los hongos lignolíticos pueden degradar e incluso mineralizar los HAPs mediante el conjunto de enzimas implicados en la utilización de polímeros vegetales como la lignina. (BUMPUS, 1989). Las bacterias inician la oxidación del anillo aromático mediante la incorporación de dos átomos de oxígeno catalizado por una dioxigenasa (Grafico.3). A partir de esta reacción se forma un cis-dihidrodiol, a diferencia de los hongos y mamíferos que generan un transdihidrodiol, y el anillo pierde la aromaticidad. A continuación una deshidrogenasa NAD + dependiente, reconstituye el anillo aromático formando un catecol (diol). Los dioles son moléculas a partir de las cuales se produce la ruptura del anillo aromático mediante dioxigenasas estereoselectivas. La ruptura se puede dar entre los dos grupos hidroxilos, denominándose orto-ruptura, o adyacente a estos grupos, denominándose meta-ruptura.

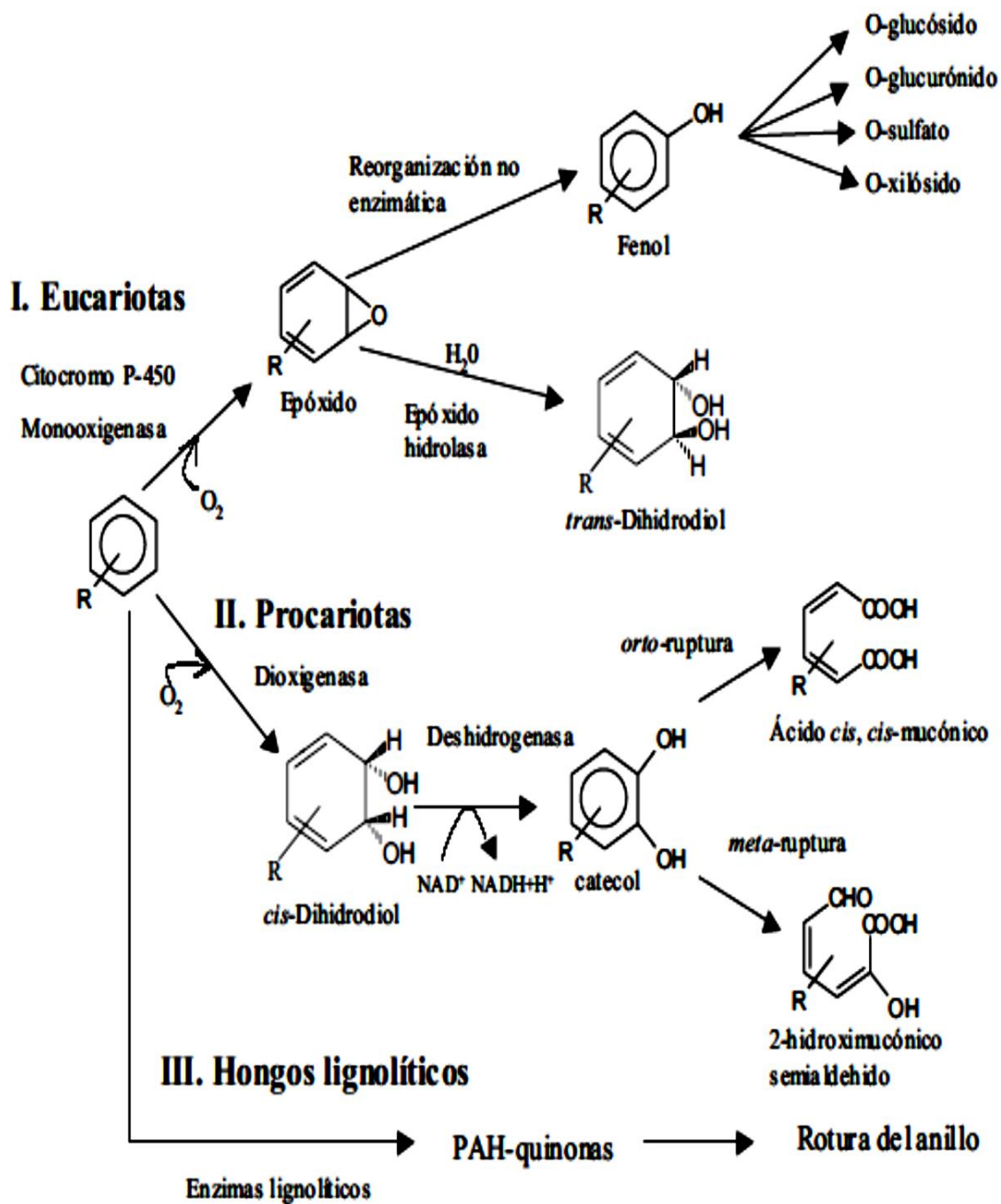


Grafico 3: Reacciones iniciales del metabolismo aeróbico de los HAPs

2.3.4. Microorganismo degradadores de HAPs.

La capacidad de degradación de compuestos que contienen anillos aromáticos está ampliamente distribuida en la naturaleza, y de hecho, se han aislado numerosas especies de bacterias y hongos degradadores de compuestos aromáticos conteniendo entre 2 y 5 anillos.

Se han descrito una gran variedad de géneros bacterianos degradadores de HAPs que incluyen: *Achromobacter*, *Acidovorax*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Comamonas*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neptunomonas*, *Nocardia*, *Paenibacillus*, *Porphyrobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Rhodococcus*, *Sphingomonas*, *Streptomyces*, *Vibrio* y *Xanthomonas*, según MARC VIÑAS (2005), una base de datos, publicada por la Universidad de Michigan, que reúne cepas degradadoras de moléculas orgánicas.

Asimismo también se han descrito una gran variedad de géneros de hongos degradadores de HAPs como: *Agrocybe*, *Aspergillus*, *Candida*, *Crinipellis*, *Chrysosporium*, *Cunninghamella*, *Bjerkandera*, *Fusarium*, *Kuehneromyces*, *Marasmiellus*, *Marasmius*, *Mortierella*, *Mucor*, *Naematoloma*, *Laetiporus*, *Phanerochaete*, *Pleurotus*, *Penicillium*, *Ramaria*, *Rhizoctonia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Syncephalastrum*, *Trametes* y *Trichoderma* (CERNIGLIA, 1997)

2.3.5. Utilización de inóculos exógenos en experiencias de biorremediación.

Ha habido éxitos y fracasos en la utilización de inóculos microbianos exógenos especializados en la descontaminación de diferentes enclaves contaminados (ALEXANDER, 1999). En casos de emplazamientos contaminados por hidrocarburos con exposiciones largas o recurrentemente contaminados, la población autóctona habitualmente responde eficientemente a estrategias de bioestimulación incrementando su población y consiguiendo una biodegradación significativa de los contaminantes. De hecho, se han descrito resultados favorables en procesos de biostimulación en suelos contaminados con distintas familias de hidrocarburos; con aceites minerales pesados, en suelos contaminados por HAPs (ATAGANA, 2004), en enclaves contaminados con crudo de petróleo, bifenilos policlorados (PCBs) y herbicidas. En las situaciones en que la población indígena degradadora de hidrocarburos es inexistente o muy baja, debido a la toxicidad intrínseca de la matriz contaminante o por ser un enclave contaminado muy recientemente, el uso de inóculos exógenos puede ser beneficioso (ALEXANDER, 1999). En realidad se han descrito numerosas situaciones en las que el bioaumento ha funcionado, en suelos, lodos y aguas subterráneas contaminadas (cuadro 5). Sin embargo, es necesario en cada caso particular estudiar la necesidad o no de aplicar inóculos exógenos, así como sus condiciones óptimas de aplicación.

Como puede observarse en la cuadro 5, un gran número de inóculos exógenos utilizados en procesos de bioaumentación se corresponden a cultivos puros de cepas microbianas individuales, en cambio se utilizan consorcios no definidos en pocas ocasiones, aunque en realidad posean un mayor potencial catabólico. Su escasa utilización, reside en que es muy difícil conocer todos los componentes microbianos que existen en un consorcio no definido, cuya obtención es en base a procesos de enriquecimiento secuencial de muestras ambientales reales. Por lo tanto se hace necesario conocer la composición microbiana de los consorcios para adecuarse a la legislación ambiental así como también para comprender mejor el funcionamiento del mismo.

Cuadro 5: Estudios de biorremediación de aguas y suelos contaminados, con éxito en la utilización de inóculos exógenos

Inóculo	Contaminante (matriz)	Referencia
<i>Arthrobacter</i> sp.	Isopropil-N-fenilcarbamato (suelo)	(Clark y Wright, 1970)
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Paration (suelo)	(Barles <i>et al.</i> , 1979)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Paration (suelo)	(Barles <i>et al.</i> , 1979)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (suelo)	(Kilbane <i>et al.</i> , 1983)
<i>Pseudomonas cepacia</i> BRI6001	2,4-Ácido diclorofenoxiacético (suelo)	(Comeau <i>et al.</i> , 1993)
<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	2,4-Ácido diclorofenoxiacético (suelo)	(Daane y Häggblom, 1999)
<i>Flavobacterium</i> sp.	Pentaclorofenol (suelo)	(Crawford y Mohn, 1985)
Lodos anaeróbicos activados	Pentaclorofenol (suelo)	(Mikesell y Boyd, 1988)
Suelo activado	Pentaclorofenol (suelo)	(Barbeau <i>et al.</i> , 1997)
<i>Desulfotobacterium frappieri</i> PCP-1	Pentaclorofenol (suelo)	(Beaudet <i>et al.</i> , 1998)
<i>Alkaligenes eutrophus</i> TCP	2,4,6-Triclorofenol (suelo)	(Andreoni <i>et al.</i> , 1998)
<i>Ralstonia basilensis</i> RK1	2,6-Diclorofenol (suelo)	(Steinle <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	Atrazina (suelo)	(Shapir y Mandelbaum, 1997)
Consorcio	Atrazina (suelo)	(Alvey y Crowley, 1996)
Consorcio	Atrazina (suelo)	(Grigg <i>et al.</i> , 1997)
Consorcio	Atrazina (suelo)	(Newcombe y Crowley 1999)
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14a	Atrazina (suelo)	(Struthers <i>et al.</i> , 1998)
<i>Escherichia coli</i> (pAtzA)	Atrazina (suelo)	(Strong <i>et al.</i> , 2000)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i> EPA505	HAPs (suelo)	(Straube <i>et al.</i> , 1999)
<i>Arthrobacter</i> sp. RP17	HAPs (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
Consorcio	HAPs (lodos)	(Cardinal y Stenstrom, 1991)
<i>Phanerochaete sordida</i>	HAPs (suelo)	(Lamar <i>et al.</i> , 1994)
<i>Arthrobacter</i> sp B1B	Bifenil policlorado (PCB) (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Ralstonia eutrophus</i> H850	Bifenil policlorado (PCB) (suelo)	(Singer <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudomonas</i> sp. P51	1,2,4-triclorobenceno (suelo)	(Tchelet <i>et al.</i> , 1999)
Consorcio	Crudo de petróleo (lodos)	(Mishra <i>et al.</i> , 2001)
Consorcio	fuel (aguas subterráneas)	(Von Wedel <i>et al.</i> , 1988)
<i>Comamonas testosteroni</i> I2	3-cloroanilina (lodos)	(Boon <i>et al.</i> , 2000)
<i>Comamonas testosteroni</i> BR60	3-clorobenzoato (suelo)	(Gentry <i>et al.</i> , 2001)
Cepa bacteriana PM1	Metil-tert-butileter (MTBE) (aguas subterráneas)	(Hristova <i>et al.</i> , 2001)
<i>Burkholderia cepacia</i> PR1301	1,1,1-Tricloroetano (aguas subterráneas)	(Bourquin <i>et al.</i> , 1997)

Fuente: Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica, Marc Viñas (2005).

2.3.6. Estudio de la diversidad de comunidades microbianas.

Durante el último siglo, y especialmente en los últimos 20 años se ha incrementado muy significativamente las metodologías para estudiar la diversidad microbiana existente en la biosfera. En realidad, estudios elaborados por TORSVIK *et al.*, (1990 y 2003) sugieren que existen unos 4000 equivalentes genómicos distintos por gramo de suelo, lo que indica que quizás existan 1000 o incluso más especies microbianas diferentes por gramo de suelo. Esta gran diversidad encontrada por TORSVIK (1990) también estaría en concordancia con un estudio de TRUPER (1992) donde se estima que podrían existir un total de $3 \cdot 10^4$ especies bacterianas diferentes en la biosfera.

Otro punto a tener en cuenta es que tan sólo entre un 0.001 y un 1% de los microorganismos viables son realmente cultivables (TORSVIK *et al.*, 2003). En la tabla 6 pueden verse resultados de diferentes estudios en los que se determina la fracción de microorganismos cultivables respecto a la enumeración total realizada mediante microscopia de epifluorescencia. Es por este motivo, que los estudios clásicos de diversidad microbiana basados únicamente en el aislamiento de microorganismos representan tan sólo una parte minoritaria de la diversidad real existente.

Cuadro 6: Proporción de organismos cultivables (%) en distintos ambientes

Habitat	Cultivables (%)	Referencias
Ecosistema marino	0.001-0.1	(Kogure <i>et al.</i> , 1980; Ferguson <i>et al.</i> , 1984)
Ecosistema aguas continentales	0.25	(Jones, 1977)
Lago mesotrófico	0.1-1	(Staley y Konopka, 1985)
Estuarios	0.1-3	(Ferguson <i>et al.</i> , 1984)
Lodos activados	1-15	(Wagner <i>et al.</i> , 1993; Wagner <i>et al.</i> , 1994)
Sedimentos	0.25	(Jones, 1977)
Suelo	0.3	(Torsvik <i>et al.</i> , 1990)

Fuente: *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*, Marc Viñas (2005).

2.3.6.1. Metodologías dependientes de cultivo.

Son técnicas que requieren el cultivo de los microorganismos para la caracterización de la diversidad de una comunidad microbiana. Entre ellas encontramos las técnicas clásicas de cultivo en placa en medios sintéticos de laboratorio y el número más probable. Más recientemente se ha utilizado el Biolog™, una técnica que se utiliza para el estudio de las comunidades microbianas en base a un perfil fisiológico, y que consiste en inocular muestras ambientales en cada uno de los 96 pocillos que contiene una placa Biolog™ cuyo contenido se basa en distintos medios y sustratos. La comparación entre perfiles fisiológicos de una comunidad o de diferentes muestras ambientales se calcula estadísticamente.

Cuadro 7: Ventajas y limitaciones de los métodos dependientes de cultivo

Método	Ventajas	Limitaciones
Aislamiento en placa	Cultivos puros útiles para estudios posteriores	Solamente una pequeña proporción de la comunidad detectable. Los aislados no necesariamente reflejan la función metabólica
Número más probable (NMP)	Función metabólica de interés detectada	Ausencia de aislados para posteriores estudios. El medio selectivo puede limitar proporción detectada de la comunidad
Biolog TM	Amplia actividad metabólica detectada. Rápido y sencillo.	Resultados sensibles al tamaño del inóculo y efectos de incubación. No se obtienen aislados para posteriores estudios. El medio selectivo puede limitar la proporción detectada de la comunidad.

Fuente: *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*, Marc Viñas (2005).

El principal inconveniente es que solamente se aísla una pequeña proporción de los componentes existentes en la comunidad microbiana, ya que los medios sintéticos de laboratorio y el soporte (sólido o líquido) limitan la proporción de microorganismos aislados (TORSVIK *et al.*, 2003) (cuadro 7). Las técnicas cultivo-dependientes tienen una serie de ventajas e inconvenientes para el estudio de la diversidad microbiana (cuadro 7). Las ventajas más importantes consisten en la obtención de cultivos puros, útiles para estudios posteriores, y de información acerca de actividades metabólicas de interés.

2.4. El suelo.

2.4.1. Estructura y componentes del suelo.

El suelo se define como la parte superior de la corteza terrestre, y se trata de un sistema formado por componentes minerales (meteorización de las rocas), componentes orgánicos (humus y derivados, biomasa viva y muerta), gas (aire en el espacio existente en los poros), y agua envolviendo partículas y el espacio capilar. El suelo constituye la interfaz entre la tierra, el aire y el agua, lo que le confiere la capacidad de desempeñar tanto funciones naturales como de uso antropogénico.

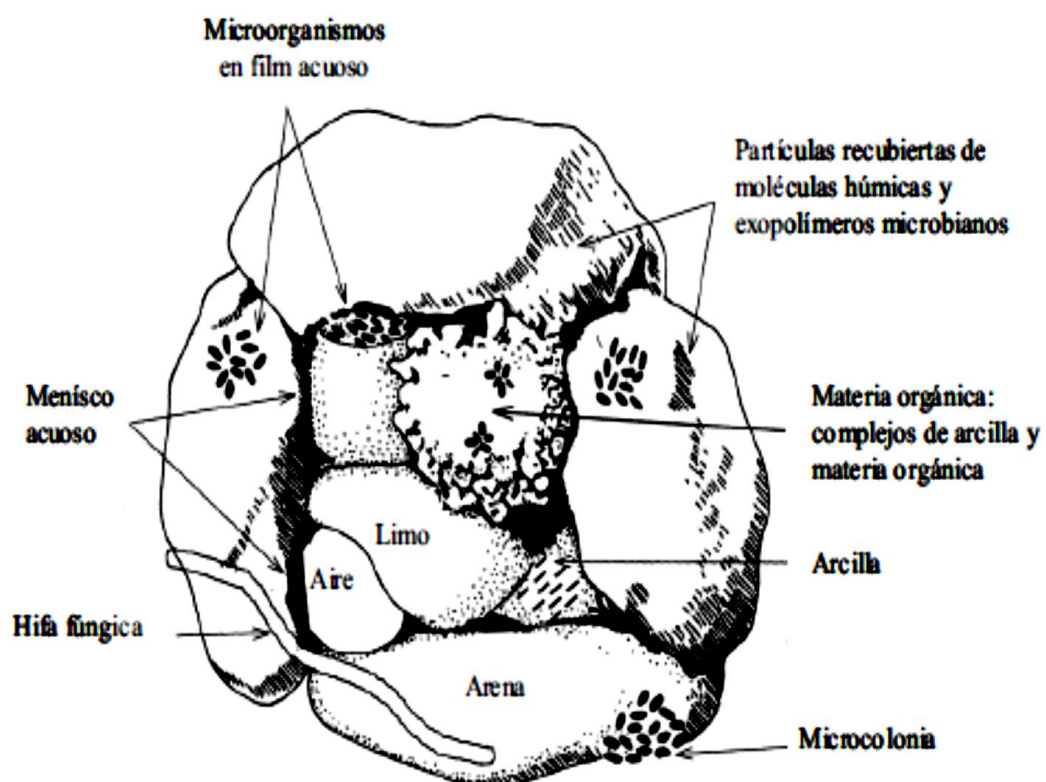


Grafico 4: Esquema de la disposición en el espacio de los agregados constituyentes de un suelo

Según las proporciones de arenas (2-0,05 mm diámetro), limos (2-50 μm de diámetro), arcillas (inferior a 2 μm de diámetro) y materia orgánica, principalmente humus y derivados, existe una gran variedad de tipos diferentes de suelos. Los componentes minerales y la materia orgánica se distribuyen en el espacio generando una estructura porosa (grafico 4). Los poros pueden contener agua o aire, de manera que existen tres fases: sólida, líquida y gaseosa. El agua contenida en los poros del suelo contiene sales minerales y nutrientes y es el medio en el cual se puede desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que lo colonizan. El contenido en agua de un suelo puede oscilar enormemente, afectando dicha actividad.

2.4.2. Las poblaciones microbianas.

La red de poros formada como resultado de la asociación de las partículas minerales (arenas, limos y arcillas) y la materia orgánica (grafico 4), muestra una gran variedad de tamaños y espacios, lo que condiciona el tipo y la diversidad de las poblaciones microbianas existentes. En términos generales se encuentran del orden de 10^6 - 10^9 bacterias cultivables por gramo de suelo, mientras que los hongos se encuentran en dos órdenes de magnitud menos como unidades formadoras de colonias, pero representan una parte importante de la biomasa del suelo (ALEXANDER, 1999). Sin embargo, la estructura de la población microbiana en los microhábitats (poros) del suelo, aún sigue siendo poco conocida, y además se estima que tan solo un 0,1-1% de los microorganismos son cultivables (AMANN *et al.*, 1995). La organización estructural

de las partículas del suelo, confiere una heterogeneidad espacial para los microorganismos, que se caracteriza por la presencia de diferentes sustratos, nutrientes, concentraciones de oxígeno, contenido de agua líquida, así como de un pH variable (LADD *et al.*, 1996). Este hecho implica que en un suelo se puedan encontrar una gran variedad de poblaciones microbianas con capacidades metabólicas distintas, condicionadas también por la biodisponibilidad de las distintas fuentes de carbono y energía, que a su vez está condicionada por las características fisicoquímicas propias de cada suelo.

La capacidad metabólica de las poblaciones microbianas, frente a los contaminantes presentes en un suelo, es el fundamento sobre el que se sustenta la tecnología de la biorremediación (ALEXANDER, 1999). Generalmente, en un suelo con contaminación recurrente o con episodios previos de contaminación, las poblaciones microbianas autóctonas se habrán seleccionado en favor de la metabolización del contaminante, el cual puede ser transformado con mayor rapidez que la materia orgánica húmica del suelo.

Por este motivo, en emplazamientos previamente contaminados, la bioestimulación de la población microbiana indígena, puede acelerar el proceso de biodegradación de los contaminantes, siempre y cuando los compuestos no sean de gran recalcitrancia (ALEXANDER, 1999). Únicamente en aquellos casos de contaminación puntual o de compuestos de gran recalcitrancia, puede ser necesaria la inoculación de poblaciones alóctonas, procedentes de cultivos de laboratorio con capacidades degradativas especializadas, para posibilitar la

degradación de los contaminantes existentes. Sin embargo, a menudo la falta de adaptación de las poblaciones exógenas, puede poner en peligro su supervivencia. Por lo tanto, antes de iniciar cualquier estudio de biorremediación, es esencial conocer si la población microbiana existente en el suelo es potencialmente degradadora de los contaminantes presentes y es suficiente para llevar a cabo el proceso de biodegradación en un tiempo razonable (WRENN y VENOSA, 1996).

2.4.3. Destino ambiental de los contaminantes orgánicos en el suelo.

Como resultado de actividades antrópicas cada año se liberan grandes cantidades de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos en el medio ambiente. La contaminación de suelos, es una consecuencia bastante común de la actividad industrial.

La existencia de tres fases en el suelo (sólida, líquida y gaseosa), así como la gran diversidad de materiales que pueden constituirlo, lo convierten en un compartimento ambiental muy complejo. La distribución de los contaminantes orgánicos se encuentra condicionada por estas características, pudiéndose encontrar adsorbidos sobre el particulado o materia orgánica (mayoritariamente aquellos compuestos de elevada hidrofobicidad como los HAPs y los aceites minerales), en disolución, o en fase de vapor. Al igual que en los medios acuáticos, los contaminantes orgánicos que se encuentran en la superficie pueden sufrir evaporación o fotooxidación. De este modo en el conjunto del suelo, los contaminantes orgánicos pueden ser transformados fisicoquímicamente o sufrir

biodegradación. El proceso de transformación más importante es la biodegradación. Los microorganismos suelen estar distribuidos en el suelo formando micro colonias que se encuentran separadas unos 100 μm , y situadas en poros pequeños entre 0,8 y 3 μm .

Además los productos de oxidación parcial procedentes de los compuestos orgánicos (como los HAPs y otros hidrocarburos) pueden ser movilizados en la fase acuosa (son más polares), pudiendo ser transportados hasta otros suelos o ambientes acuosos.

2.5. Ventajas y limitaciones de los procesos de biorremediación de suelos contaminados.

Entre las distintas tecnologías disponibles para la descontaminación de un suelo, es importante diferenciar aquéllas que suponen una solución temporal o el posible traslado del contaminante a otros compartimentos ambientales de aquéllas que potencialmente pueden transformar los contaminantes en productos inocuos (ALEXANDER, 1999). La tecnología de la biorremediación, basada en la utilización de los microorganismos y su potencial metabólico biodegradador para eliminar o transformar los contaminantes del medio en productos inocuos (ALEXANDER, 1999), tiene ciertas ventajas respecto a los métodos fisicoquímicos (excavación, extracción química y incineración) tanto por su menor coste económico, como por la no afectación de otros compartimentos ambientales y la optimización de los recursos. En el cuadro 8 puede observarse que los costes de las técnicas biológicas (bioventing, biopila, landfarming y plantas

de tratamiento biológico) son mucho más rentables económicamente que las técnicas fisicoquímicas. Una consecuencia de ello es que en Alemania, en 1998, aproximadamente de las 2,2 MTm de suelo que fueron tratadas en las 109 plantas de tratamiento que dispone, un 60% fueron tratadas de forma biológica. Si tenemos en consideración que cada planta de tratamiento de suelos, tiene una capacidad de 4 105 Tm año⁻¹, se podría llegar a tratar una cantidad de suelo 10 veces superior que la procesada en 1998.

Una de las limitaciones que presentan las técnicas biológicas respecto a las técnicas fisicoquímicas es el tiempo necesario para alcanzar una biodegradación aceptable según las normativas. Durante un proceso de biorremediación se produce una ralentización del proceso de biodegradación ya sea por un enriquecimiento de componentes más recalcitrantes o por una disminución de la biodisponibilidad de los contaminantes (ALEXANDER, 1999).

Sin embargo, las técnicas fisicoquímicas, aun pudiendo ser más rápidas y efectivas en la disminución de la concentración de contaminantes, alteran o eliminan por completo la microbiota autóctona del suelo, modifican las características fisicoquímicas del suelo, y además, no eliminan los contaminantes, si no que los trasladan a otro compartimento ambiental. Por lo tanto no cumplen con los criterios de sostenibilidad en los que se debería basar la ley de protección de suelos.

Cuadro 8: Costes económicos en la remediación de suelos contaminados

Tipo de tratamiento	Coste (\$ Tm ⁻¹)	Referencias
Bioventing/Biosparging	10-140	(EPA 2004; Fan y Tafuri, 1994)
Biopila	30-110	(EPA 2004; Fan y Tafuri, 1994)
Landfarming	5-30	(EPA 2004; Fan y Tafuri, 1994)
Planta de tratamiento Biológico	30-60	(Klein, 2000)
Lavado del suelo	75-600	(Dennis <i>et al.</i> , 1994)
Calentamiento por resistividad eléctrica	30-400	(Environmental Science and Technology.Editorial, 2000)
Desorción térmica a elevada T ^a	350-450	(Environmental Science and Technology.Editorial 2000; EPA 2004)
Desorción térmica a baja T ^a	30-70	(EPA, 2004)
Incineración	500-1000	(Environmental Science and Technology.Editorial 2000)
Excavar + vertedero	35	(Environmental Science and Technology, Editorial 2000)

Fuente: *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*, Marc Viñas (2005).

2.6. Factores que condicionan la biorremediación de un suelo.

La biodegradabilidad de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado depende de diversos factores como son: la presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa, la estructura molecular del contaminante, su concentración y biodisponibilidad, y factores ambientales como el pH, temperatura, humedad del suelo, presencia de aceptores de

electrones disponibles, y la existencia de nutrientes inorgánicos (fuente de N y P) disponibles.

2.6.1. El pH, temperatura y la humedad

Cada cepa microbiana tiene un determinado rango de tolerancia a factores ambientales como son: la temperatura, el pH y la salinidad, los cuales pueden afectar al crecimiento y actividad de las poblaciones microbianas. En consecuencia, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos existentes, potencialmente mayor será el rango de tolerancia. No existen unas condiciones preestablecidas que sean óptimas en todos los casos, pero en términos generales a pH y temperaturas extremas y en suelos salinos la biodegradación se ralentiza, siendo los rangos óptimos para la biodegradación: pH entre 6- 8 y temperaturas entre 20-30°C (ALEXANDER, 1999).

La variación del pH del suelo afecta a la actividad microbiana y también a la solubilización y adsorción/absorción de los contaminantes y de los iones. Las formas catiónicas (NH_4^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+}) son más solubles a pH ácido mientras que las formas aniónicas (NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , Cl^-) son más solubles a pH alcalino. En general, el pH óptimo para las bacterias heterótrofas es neutro (pH 6-8), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4-5). El pH óptimo establecido para procesos de biodegradación es neutro (pH 7,4-7,8). VERSTRAETE *et al.* (1976) consiguieron duplicar la biodegradación de un suelo contaminado con gasolina incrementando el pH de 4,5 a 7,4. Para alcalinizar un

suelo se utiliza arena de caliza e iones Ca_{2+} y Mg_{2+} mientras que para acidificar un suelo se utiliza FeSO_4 .

Sin embargo, con poblaciones microbianas adaptadas también se ha descrito biodegradación de HAPs en suelos extremadamente ácidos a pH 2. La temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de biodegradación. La mayor parte de estudios realizados indican que las condiciones mesofílicas (20-30°C) son las óptimas para la biorremediación de suelos contaminados. No obstante, también se ha descrito biodegradación de hidrocarburos temperaturas extremas: a 10°C en suelos subárticos y subalpinos (SPARROW y SPARROW, 1988), 5°C en suelos árticos y hasta 60°C por una cepa termófila de *Bacillus stearothermophilus* aislada de un suelo contaminado con crudo de petróleo del desierto kuwaití.

La humedad del suelo puede limitar de forma severa la biodegradación, fundamentalmente en suelos superficiales afectados por oscilaciones importantes en el contenido de agua. No obstante el nivel óptimo de humedad depende de las propiedades de cada suelo, el tipo de contaminación y si la biodegradación es aeróbica o anaeróbica. Un déficit de agua puede disminuir el transporte de nutrientes y de contaminantes, así como también la migración bacteriana a través del suelo. El exceso de agua en un suelo desplaza el aire residente en los poros del suelo, generándose con mayor facilidad condiciones anaeróbicas, al agotarse el oxígeno disuelto en agua (ALEXANDER, 1999; MENN

et al., 2000). DIBBLE Y BARTHA (1979), describieron un rango de humedad óptimo del 30-90% de la capacidad de campo para la biodegradación aeróbica de lodos contaminados con crudo de petróleo, mientras que LAJOIE Y STROM (1994) y PRAMER Y BARTHA (1972), recomendaron llevar a cabo procesos de biorremediación a una humedad entre el 50 y 70% de la capacidad de campo. En general, en suelos de granulometría fina (elevado porcentaje de arcillas y limos) suele utilizarse una proporción cercana al 40% de la capacidad de campo, mientras que para suelos arenosos suele utilizarse una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (MENN *et al.*, 2000).

2.6.2. Estructura química

De las distintas familias de hidrocarburos del petróleo, los n-alcanos y los alcanos ramificados (isoprenoides) de cadena intermedia (C10-C20) son los sustratos más fácilmente degradables por los microorganismos del suelo, y que por lo tanto tienden a ser eficazmente biodegradados. Sin embargo, los alcanos de cadena larga (>C20) son más difíciles de degradar debido a su (elevado peso molecular) y su baja solubilidad en agua. Los cicloalcanos, por norma general, se degradan más lentamente que los n-alcanos y alcanos ramificados. Asimismo, los HAPs que contienen de 2 a 3 anillos aromáticos pueden ser biodegradados eficazmente en el suelo en condiciones ambientales óptimas, mientras que los HAP de 4 anillos, y especialmente, los de 5 o más anillos bencénicos presentan una mayor recalcitrancia inherente y una baja solubilidad. Las fracciones de

resinas y asfaltenos son las que presentan una menor degradabilidad debido a las complejas estructuras químicas y al elevado peso molecular de sus moléculas.

2.6.3. Biodisponibilidad

La tasa de degradación depende tanto de la capacidad de transporte y del metabolismo microbiano, como de la transferencia de masas del compuesto. La relación entre estos factores se conoce como biodisponibilidad. En los suelos uno de los factores limitantes para la biodegradación es la transferencia de masas, ya que los microorganismos de los suelos contaminados, suelen tener amplias capacidades biodegradativas al estar expuestos a una gran variedad de compuestos orgánicos diferentes. Por lo tanto la adsorción, la absorción, desadsorción, disolución y la difusión son fenómenos, propios de la transferencia de masas, que condicionan la biodisponibilidad de los contaminantes (ALEXANDER, 1999). Un fenómeno que afecta de forma negativa a la biodisponibilidad de los contaminantes es el envejecimiento o ageing que se define como la pérdida de la biodegradabilidad de los compuestos a lo largo del tiempo en el suelo (aunque la población microbiana mantenga intacto su potencial catabólico), el cual es más importante en suelos con elevado contenido en materia orgánica. Este efecto se produce por una serie de fenómenos como son: la adsorción con la materia particulada del suelo, absorción a la materia orgánica del suelo, a la baja difusividad de los compuestos, principalmente desde los microporos; a la disolución en fases líquidas no acuosas (FLNAs), o a la formación de uniones covalentes con la materia orgánica e inorgánica del suelo

(ALEXANDER, 1999). Con la finalidad de aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes existen numerosos ejemplos en la bibliografía de la utilización de tensioactivos sintéticos y biotensioactivos en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

2.6.4. Presencia de aceptores de electrones

La mayor parte de hidrocarburos presentes en los productos petrolíferos son degradados con mayor extensión y rapidez de forma aeróbica (O_2 como aceptor final de electrones), ya que en ausencia de O_2 , y en presencia de aceptores de electrones alternativos (NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Mn^{4+} y Fe^{3+}) los hidrocarburos pueden ser degradados, pero con unas tasas de biodegradación muy inferiores a las aeróbicas.

2.6.5. Nutrientes inorgánicos

Las concentraciones de nitrógeno y fósforo asimilables presentes en el suelo, suelen ser limitantes para un incremento y activación de la población microbiana, mientras que otros nutrientes esenciales como el Ca^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} y SO_4^{2-} ya están presentes en cantidades suficientes en el suelo (MENN *et al.*, 2000).

La adición de fuentes de N y P inorgánicas, generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas y las tasas de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados (CHANEAU *et al.*, 2003). Las proporciones molares de C:N:P, descritas en la bibliografía, respecto al

contenido de carbono a degradar son muy distintas. La EPA recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:10 para la biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos (U.S. EPA, 1995), y dentro de este intervalo se han descrito proporciones C:N de 600:10 (DIBBLE y BARTHA, 1979), 500:10 y de 100:10:1 a 300:10:1 respecto al COT a degradar. Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de N y P al suelo es beneficiosa para los procesos de biodegradación, existen estudios que han descrito efectos inhibitorios en la adición de nutrientes inorgánicos. MORGAN y WATKINSON (1992) describieron una inhibición de la mineralización de fenantreno al añadir nitrógeno inorgánico. Asimismo, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación. Para evitar el exceso de nutrientes, así como la pérdida de los mismos por lixiviación, también se han utilizado fertilizantes inorgánicos oleofílicos de liberación lenta (Inipol EPA® 22) para la biorremediación de suelos contaminados. Además es importante destacar que la acción de los nutrientes inorgánicos puede estar limitada debido a la interacción química con los minerales del suelo (el amonio se puede unir a las arcillas por intercambio catiónico y el fosfato puede unirse y precipitar con iones calcio, hierro y aluminio) (MORGAN y WATKINSON ,1992).

2.7 Encalado.

El encalado consiste en la aplicación de materiales básicos al suelo (enmiendas calcáreas) que neutralizan la acidez. Los materiales que se utilizan son principalmente carbonatos, óxidos, hidróxidos, y silicatos de calcio y/o

magnesio. Debido a su diferente naturaleza química los productos encalantes presentan una capacidad variable de neutralización

2.7.1 Cal agrícola o calcita

Es el material más utilizado para la neutralización de la acidez de los suelos. Contiene preferentemente carbonato de calcio (CaCO_3). Se obtiene a partir de la piedra caliza que se muele y matiza. Como se trata de un mineral, contiene impurezas que reducen el contenido de carbonato. La calcita pura contiene un 40% de cal.

2.7.2 Reacciones de la cal en el suelo

Por lo general, las enmiendas calcáreas tienen muy baja solubilidad y deben ser finamente molidas para facilitar su hidrólisis. El uso eficiente de la cal requiere la observación de algunas normas o tecnologías de aplicación, dentro de los cuales el más importante es el tiempo de incubación.

El tiempo de incubación es el tiempo que debe transcurrir para que la enmienda reaccione con las partículas de suelo y ejerza su acción neutralizante. La velocidad de reacción, por tanto, depende del tamaño de las partículas de la enmienda, de la temperatura del suelo y de su humedad.

2.7.3 Cálculo de la dosis de cal según el pH.

Dependiendo principalmente de su contenido de materia orgánica, los suelos difieren en su capacidad tampón. El poder tampón se refiere a la “resistencia” que pone el suelo a cambiar su nivel de pH. A mayor contenido de

materia orgánica, el suelo presenta un mayor poder tampón. Es decir requerirá una mayor cantidad de enmienda para producir un determinado cambio en el pH de un suelo que contenga menos materia orgánica.

Para calcular la dosis de cal necesaria para producir un determinado cambio en el pH del suelo se puede recurrir a la siguiente fórmula:

$$\text{Dosis de CaCO}_3 \text{ (Kg/Ha)} = \frac{(\text{pH a alcanzar} - \text{pH actual})}{\text{Poder tampón}} \times 100$$

Cuadro 9: Poder tampón para diferentes tipos de suelos

	Poder tampón	kg/ha (20 cm)	kg/ha (10 cm)
Trumao	0,11	909	518
Rojo - arcilloso	0,15	667	380
Transición	0,12	833	475
Ñadi	0,096	1042	594

Fuente: Manual de edafología , Ricardo (2000).

Para incrementar el valor de pH en un suelo rojo – arcilloso en 0,1 unidades en el estrato de 0 a 10 cm se requiere aplicar 380 Kg de carbonato de calcio puro.

2.7.4 Efectos de la aplicación de la cal

El encalado de los suelos produce efectos beneficiosos tanto en aspectos químicos como físicos.

2.7.4.1 Desarrollo microbiano

Por lo general, la acidez restringe la actividad de la mayoría de los microorganismos del suelo. Por el encalado se mejoran las condiciones para un adecuado desarrollo de la actividad microbiana. En forma paralela, al mejorar las condiciones de acidez del suelo se favorece toda actividad de las bacterias responsables de la mineralización de la materia orgánica favoreciendo la nitrificación de N orgánico y la mineralización de formas orgánicas de azufre, a formas minerales capaces de ser absorbidas por las raíces de las plantas. RICARDO (2000).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del lugar de estudio.

3.1.1 Ubicación política.

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicada políticamente en el distrito de Rupa Rupa, Provincia de Leoncio Prado, región Huánuco del 01 de Diciembre del 2012 hasta el 01 de Julio del 2013.

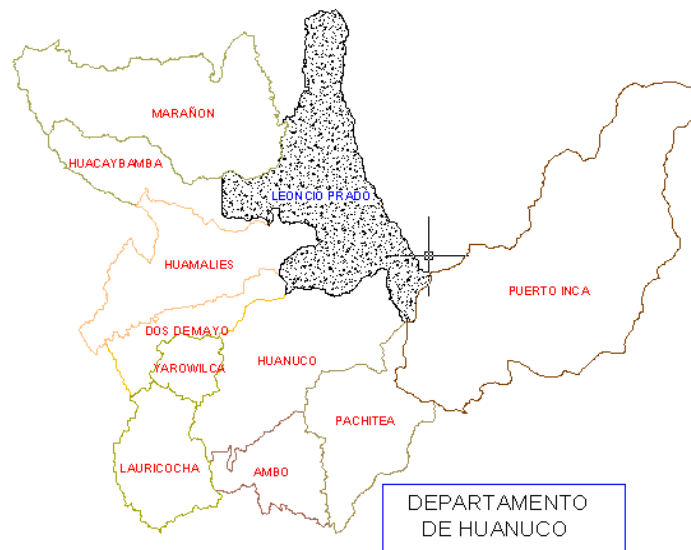


Grafico 5: Plano de ubicación del lugar de ejecución

3.1.2 Características ambientales de la zona de estudio

La zona de investigación de acuerdo al mapa ecológico y el sistema de Holdridge, corresponde a la formación de bosque muy húmedo pre -montano tropical (Bmh – PT), donde se desarrollan y cultivan especies de gran valor alimenticio, medicinales y comerciales, caracterizados por presentar las siguientes características climáticas.

Humedad relativa : 80%

Temperatura media anual : 24 °C.

Precipitación anual : 3300 mm

3.1.3 Clima

El distrito de Rupa Rupa se encuentra a una altura aproximada de 663 msnm, perteneciendo de esta manera a la majestuosa Selva Alta. El clima de la ciudad es cálido y excesivamente lluvioso, con una temperatura promedio anual de 25° C, siendo la temperatura máxima 30.5° C y la mínima 18.5° C; tiene una humedad relativa de 78.5%, siendo la máxima 80% y la mínima 77.5%.

3.2 Materiales y equipos

3.2.1 De campo

- Libreta de campo y lapicero
- Una pala
- Tres bolsas de polietileno grandes.

- Guantes de hule

3.2.2 De laboratorio

3.2.2.1 Materiales

- Cintas masking tape
- Etiquetas
- Mascarillas
- Mandil
- Mecheros
- Varillas agitadoras
- Tijeras
- Guantes
- Papel filtro
- Gradillas
- Soporte universal
- Termómetro
- Matraz de bola
- Mortero.
- Frascos de vidrio de 30 mL.
- Placas Petri
- Probetas de 250 mL
- Tubos de ensayo de 18 a 180 mm
- Asa de colle
- Matraz de 250 mL
- Pinzas
- Cartuchos de celulosa o fibra de vidrio.
- Pipetas de 1 a 10 mL
- Embudos
- Cintas y pitas
- Biorreactor
- Vaso de precipitación
- Espátula
- Papel aluminio.
- Otros

3.2.2.2 Equipos

- Estufas
- pH – metro
- Balanza analítica
- Incubadora

- Cámara fotográfica
- Cuenta colonias
- Cocina eléctrica
- Equipo de reflujo Soxhlet de 250 mL.
- Autoclave
- Centrifuga
- Bombas de aire
- Refrigeradora
- Batidora eléctrica
- Baño maría

3.2.2.3 Insumos

- Caldo peptano
- Medio B.H.I
- Medio M77
- Medio Muller Hinton
- Prueba indol
- Prueba SIM
- Prueba Rojo de Metilo
- Prueba TSI
- Prueba LIA
- Prueba A. Citrato
- Prueba Malonato
- Prueba Urea

3.2.2.4 Reactivos

- Hexametáfosfato de sodio
- Carbonato de sodio
- Alcohol amílico
- Sulfato de sodio anhidro
- Diclorometano

3.3 Metodología

3.3.1. Unidades de estudio

La unidad estudiada fue el suelo contaminado con hidrocarburo (crudo), dicho suelo se obtuvo de un almacén de suelos contaminado de la empresa “MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L.”, la muestra que se obtuvo fue de aproximadamente 20 kg de los cuales después de mezclarlos y

obtener una muestra homogénea se usaron 8 Kg, los que se distribuyeron en 4 baldes de pinturas vacías y lavadas, poniéndoles 2 kg de suelo contaminado a cada balde, a estos baldes se aplicaron las dosis de encalados (tres) teniendo un balde como prueba control o testigo; después de agregados las dosis se sacaron 10 gramos de suelos para cada biorreactor, teniendo dos biorreactores para cada dosis y cada dosis con sus dos repeticiones. Y dos biorreactores para la muestra control o testigo.

3.3.2. Determinación de la concentración de hidrocarburos en el suelo.

Para la determinación de las diferentes fracciones de hidrocarburos se realizaron los siguientes procedimientos:

3.3.2.1. Preparación de muestras de suelo para extracción

Aunque el análisis de hidrocarburos puede hacerse con muestras húmedas, se recomienda secarlas y molerlas para obtener muestras más homogéneas. El secado de suelo para extracción se lleva a cabo de la siguiente forma (WEISMAN, 1998).

Procedimiento

- Se puso a secar la muestra (8-15 g de suelo) extendida en un papel aluminio a 30°C, durante 48 horas, en un cuarto de temperatura controlada o a la sombra.
- Moler la muestra en un mortero hasta obtener partículas finas.
- Colocar la muestra seca en un frasco seco y limpio.

3.3.2.2. Extracción de hidrocarburos

Existen diferentes técnicas de extracción de hidrocarburos, en esta investigación usaremos el método de extracción por reflujo (Soxhlet):

3.3.2.2.1. Extracción por reflujo (Soxhlet)

Para extraer los hidrocarburos de suelos contaminados se utiliza el método de reflujo con equipo Soxhlet, tomando como referencia los métodos D5369-93 de la ASTM (2003) y 3540C y 3541 de la US EPA (1996, 1994).

Procedimiento

- Colocar de 5 a 10 g de suelo seco y finamente molido en un cartucho de celulosa o fibra de vidrio.
- Adicionar sulfato de sodio anhidro en una relación suelo:sulfato 1:1 y mezclar.
- Colocar cada cartucho conteniendo las muestras dentro de la camisa o columna extractora del equipo Soxhlet.
- Adicionar 125 mL de diclorometano en el matraz de bola.
- Ensamblar el equipo Soxhlet e iniciar calentamiento hasta alcanzar una temperatura adecuada y constante que evapore al disolvente.
- Mantener el reflujo en estas condiciones durante 8 horas, de tal manera que el disolvente ya no tenga un color oscuro si no sea transparente.
- Después de 8 horas, el extracto orgánico contendrá todos los hidrocarburos solubles en diclorometano. Pasar el matraz bola a una estufa para que se

evapore el disolvente que pueda contener y el extracto orgánico se mantenga seco.

3.3.2.3. Cuantificación de hidrocarburos

Después de realizar la extracción y/o fraccionamiento de los hidrocarburos contenidos en una muestra de suelo, estos se pueden cuantificar por:

Métodos gravimétricos:

➤ Hidrocarburos totales del petróleo (HTPs).

El método gravimétrico es recomendado para la medición de HTPs provenientes de muestras muy aceitosas, por ejemplo que contienen hidrocarburos pesados o para muestras acuosas cuando el diclorometano es preferido como solvente (US EPA 821-B94-004, 1995).

Procedimiento

- Poner a peso constante el recipiente donde se colocará el extracto orgánico obtenido (matraz de bola para la extracción). Colocar el recipiente en la estufa a 120°C durante 4 horas. Sacar este material y colocarlo en un desecador para que se enfríe. Pesar el recipiente, después colocarlo otra vez dentro de la estufa y volver a realizar el procedimiento hasta que el peso no cambie. Anotar el peso del recipiente (RA).

- Una vez que el extracto orgánico obtenido esté en un matraz de bola a peso constante, se procede a la evaporación total del solvente (diclorometano) en una estufa a 45°C hasta sequedad.
- Pesar nuevamente el matraz, vial o tubo con el extracto libre de solvente. Anotar el peso (RB).

Cálculos

La diferencia en peso corresponde al contenido total de HTPs. Para hacer el cálculo de concentración de hidrocarburos totales del petróleo provenientes de la muestra, se debe considerar la cantidad de suelo que se pesó para la extracción, así como la humedad de la muestra. El resultado debe expresarse en mg de HTP/kg de suelo seco, y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{HTPs (mg kg}^{-1} \text{ de s.s.)} = (\text{RB} - \text{RA}) * (\text{FC}) / (\text{P} * \text{FH}).$$

Donde:

HTPs (mg kg⁻¹ de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg/ kg de suelo seco.

RA= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

FC = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

3.3.3. Determinación de la textura del suelo

La metodología aplicada es la de Bouyoucus: (CHAPMAN, 1979).

Procedimiento

- pesar 50 g. de suelo y colocarlo en el vaso del dispersador eléctrico.
- Agregar aproximadamente 15 m. De hexametáfosfato de sodio al 10 % y 100 mL de agua destilada.
- Agitar por 5 minutos.
- Después de agitar, se trasvasa toda la solución a una probeta de bouyoucus.
- En la probeta de bouyoucus completar con agua destilada hasta la marca 1130 con el hidrómetro introducido.
- Agitar vigorosamente con un agitador manual y dejar en reposo por 10 segundos y luego realizar la primera lectura de temperatura con el termómetro y la densidad con el hidrómetro.
- A las dos horas realizar la segunda lectura de temperatura y densidad.

Calculo

$$\% \text{ de limo y arcilla} = ((H1 + (T1 - H1) \times 0.36) / 50) \times 100$$

$$\% \text{ arcilla} = ((H2 + (T2 - H2) \times 0.36) / 50) \times 100$$

Dónde:

H1: primera lectura del hidrómetro

T1: primera lectura del termómetro

H2: segunda lectura del hidrómetro

T2: segunda lectura del termómetro

3.3.4 Determinación del pH del suelo

La forma más rápida de poder determinar el pH del suelo es con el uso del pH-metro (CHAPMAN, 1979).

Procedimiento

Pesar 10 gramos de suelo, mezclarlo con 10 mL de agua destilada, agitar por dos minutos, dejar reposar y medir pH con el pH-metro.

3.3.5 Determinación del porcentaje de humedad del suelo

El porcentaje de humedad del suelo es necesario para poder determinar la capacidad del suelo para retener el agua y a la vez poder usar este dato en el cálculo de cantidad de hidrocarburos presentes en el suelo (CHAPMAN, 1979):

Procedimiento

- Pesar 100 gramos de suelo húmedo en una balanza analítica.

- Poner ese suelo en la estufa a una temperatura de 45°C por dos días.
- Después pesar ese suelo seco en una balanza analítica.

Calculo

$$\% \text{ humedad} = ((\text{PSH} - \text{PSS}) / \text{PSS}) \times 100$$

Donde

PSH: peso del suelo húmedo

PSS: peso del suelo seco

3.3.6. Aislamiento de microorganismos depredadores de hidrocarburo.

El aislamiento de los microorganismos del mismo suelo nos permitirá tener la población microbiana presente en este para su posterior selección (ALTAMIRANO y POZZO, 2000).

Procedimiento

- Se pesó 10 gramos de suelo en la balanza analítica.
- Después se le agregó en un matraz con agua destilada y Peptona al 0.1 % (90 mL en total).
- De esta muestra se filtró, y del filtrado se saca 1 mL de muestra y se agrega al primer diluyente que contiene 9 mL de agua destilada y peptona al 0.1 %.
- De esta dilución se vuelve a sacar 1 mL para agregar a otro diluyente y se repite esta acción dos veces más.
- Del último diluyente se saca una alícuota de 0.25 mL en cual se deposita en una placa Petri con medio M77 adicionado con manitol 1 %.

- Esto se llevó a incubación en temperatura ambiente por 48 horas, estas colonias desarrolladas se verificaran y se les repicará en medio de BHI (caldo cerebro corazón) adicionado de manitol 1 % y esto se almacenó.

3.3.7. Selección de microorganismos degradadores de hidrocarburos

La selección de los microorganismos degradadores de hidrocarburos nos permitirá identificar a aquellos microorganismos que son capaces de degradar el hidrocarburo y serán utilizados en esta investigación (ALTAMIRANO y POZZO, 2000).

Procedimiento

- Los microorganismos que se desarrollaron en el medio BHI (caldo cerebro corazón) se los repicará en caldos peptona manitol 1 %,
- Después se incubaron por 48 horas a temperatura ambiente
- luego se sembraron sobre medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM) conteniendo el suelo contaminado con hidrocarburo en varias concentraciones (50 g, 100 g, 150 g, 200 g, 250 g y 300 g); estos se incubaran a temperatura ambiente por 48 horas
- los microorganismos desarrollados serán los que se acondicionaron a los tratamientos de degradación del hidrocarburo en el suelo muestreado.
- Estos se mantuvieron en cepas individualmente en medio Muller Hinton hasta su uso.

3.3.8 Identificación de los microorganismos seleccionados

Esta acción nos permitirá saber con qué microorganismos estamos trabajando (PRESCOTT *et. al*, 1999).

Procedimiento

- Se sacaron muestras de los microorganismos seleccionados y se activaron en medio BHI por 48 horas, individualmente.
- Después se sacaron muestras con la asa de colle y cada muestra individualmente se sembraron en los caldos Peptona, MRVP, MRVP y en los medios Citrato, T.S.I, L.I.A, Malonato y Urea.
- Estos se llevaron a incubar a 37°C por 24 horas.
- Después se leyeron los resultados, se agregaron reactivos de confirmación a los tubos que corresponda (Peptona, MRVP) y se observaron el cambio de color en otros.

3.3.9 determinación de las dosis de cal a utilizarse en la investigación

Las dosis de cal a utilizarse estuvieron sujetas al pH que deseamos alcanzar para el suelo, teniendo como pH alcanzables 6, 7, 8.

Para poder determinar estas dosis se usó la fórmula (RICARDO, 2000).

$$\text{Dosis de CaCO}_3 \text{ (kg/ha)} = \frac{(\text{pH a alcanzar} - \text{pH actual})}{\text{Poder tampón}} \times 100$$

3.3.10 Instalación de los biorreactores para la investigación.

Es necesario crear condiciones para que el microorganismo cumpla su función de biodegradador y ver su comportamiento con respecto a las dosis de calcita aplicados.

Procedimiento

- En recipientes apropiados (Biorreactores) de 1 litro de volumen, se agregaron 700 mL de medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM).
- Además se agregaron el suelo con las dosis y control, 10 gr a cada recipiente.
- También se agregó 1 % de glucosa como iniciador para la reacción de los microorganismos.
- Se agregaron también a estos recipientes 80 mL de microorganismos seleccionados activados.
- A estos recipientes se les acondicionaron bombas de aire pequeñas para crear condiciones aeróbicas para el normal desarrollo de los microorganismos usados.
- Posteriormente se los cerro herméticamente para evitar que el biorreactor se contamine con otros microorganismos del ambiente.

3.3.11 Determinación del pH de los biorreactores

Se determina el pH para ver las alteraciones de este

Procedimiento

- De cada biorreactor se muestrea al inicio, a los 7 días y 14 días 50 mL del medio para su lectura con el pH-metro.

3.3.12 Recuento de microorganismos

Se hace un recuento de microorganismos para ver su dinámica y el desarrollo (CUBITO y CABEZALI, 2000).

Procedimiento

- Se muestrea 0.1 mL del medio existente en cada reactor y se los agrega a placas petris con medio Play count, este muestreo se hace al inicio, a los 7 días y a los 14 días.

Después de haber realizado estas evaluaciones el suelo obtenido de los biorreactores se llevan a la centrifuga y se secan para su posterior análisis para determinar la cantidad de hidrocarburos sobrantes.

3.3.13 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se ajustaran para su significancia estadística con el diseño completamente al azar (DCR), considerándose el análisis de varianza, la relación de regresión y correlación de Tukey

Se tuvieron 3 tratamientos y 2 repeticiones por cada concentración además de un testigo.

IV. RESULTADOS

4.1. Textura, pH y porcentaje de humedad del suelo contaminado con hidrocarburo.

La textura que presenta el suelo contaminado con hidrocarburo es de suelo franco arcillo arenoso, presentando 7.12 % de limo, 26.56 % de arcilla y 66.32 % de arena, el pH de este suelo contaminado es de 4, y su humedad 25 %

4.2. Cantidad de hidrocarburos totales de petróleo presentes en el suelo al iniciar, a los 7 días y a los 14 días de la biorremediación.

Se determinaron las siguientes cantidades de hidrocarburos totales de petróleo no volátiles los cuales son los siguientes:

En la prueba control o testigo el suelo al iniciar la biorremediación contenía 51.2 mg/kg de suelo, a los siete días de la biorremediación el suelo contenía 46.13 mg/kg de suelo y 45.93 mg/kg de suelo, y a los 14 días de la biorremediación el suelo contenía 43.71 mg/kg de suelo y 43.79 mg/kg. (Grafico 6).

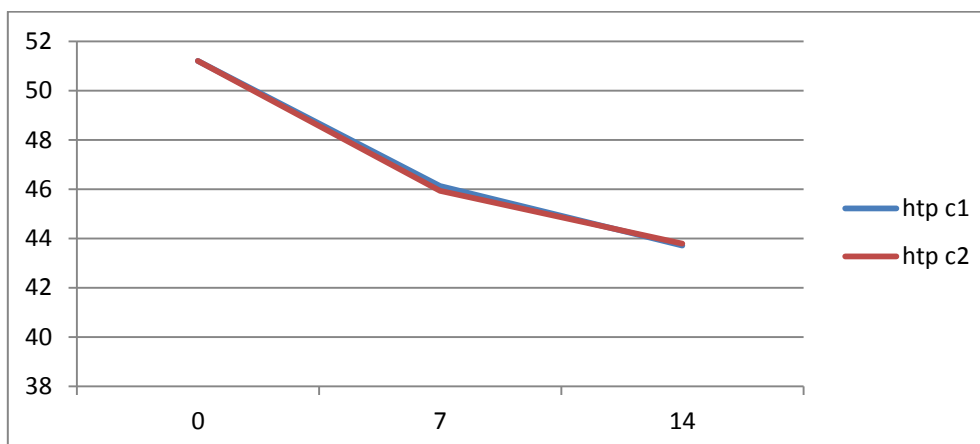


Grafico 6: Hidrocarburos presentes en el suelo a diferentes días de iniciado la biorremediación en la prueba control.

En la prueba tratamiento 1 el suelo al iniciar la biorremediación contenía 49.15 mg/kg de suelo, a los siete días de la biorremediación el suelo contenía 47.01 mg/kg de suelo y 47.49 mg/kg de suelo, y a los 14 días de la biorremediación el suelo contenía 44.16 mg/kg de suelo y 43.97 mg/kg de suelo. (Grafico 7).

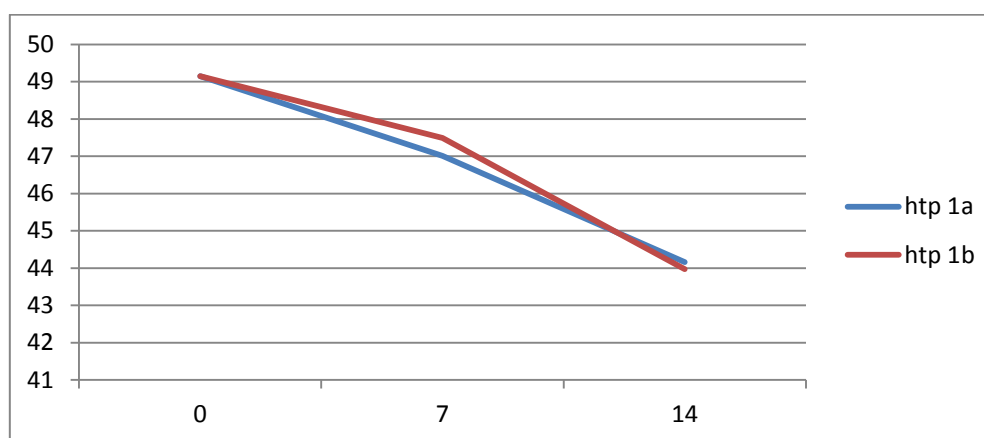


Grafico 7: Hidrocarburos presentes en el suelo a diferentes días de iniciado la biorremediación en el tratamiento 1.

En la prueba tratamiento 2 el suelo al iniciar la biorremediación contenía 66.72 mg/kg de suelo, a los siete días de la biorremediación el suelo contenía 63.79 mg/kg de suelo y 64.00 mg/kg de suelo, a los 14 días de la biorremediación el suelo contenía 61.44 mg/kg de suelo y 61.54 mg/kg. (Grafico 8).

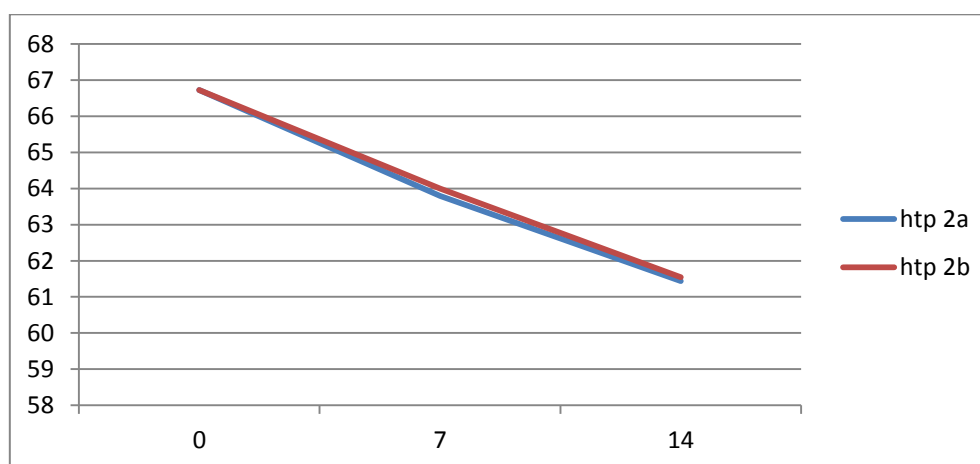


Grafico 8: Hidrocarburos presentes en el suelo a diferentes días de iniciado la biorremediación en el tratamiento 2.

En la prueba tratamiento 3 el suelo al iniciar la biorremediación contenía 48.93 mg/kg de suelo, a los siete días de la biorremediación el suelo contenía 44.21 mg/kg de suelo y 44.11 mg/kg de suelo, a los 14 días de la biorremediación el suelo contenía 40.71 mg/kg de suelo y 40.96 mg/kg. (Grafico 9).

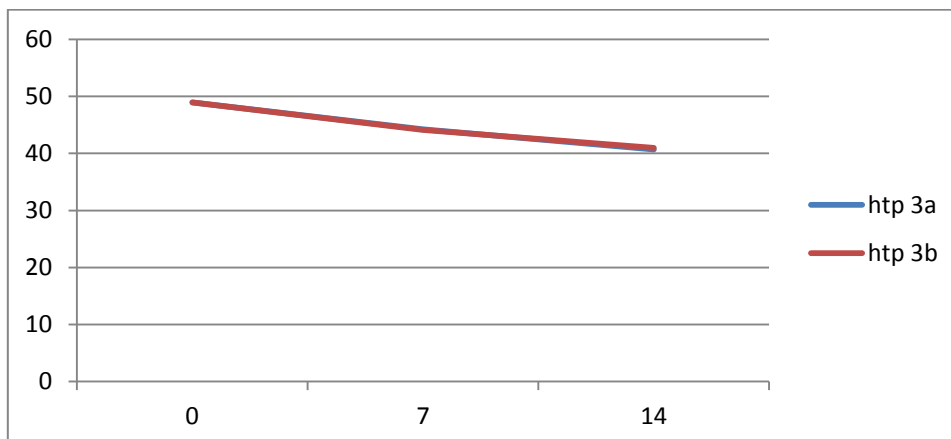


Grafico 9: Hidrocarburos presentes en el suelo a diferentes días de iniciado la biorremediación en el tratamiento 3.

Se puede observar mediante el grafico 10, como fue la degradación en los tres tratamientos y en la prueba control a los siete días de la biorremediación,

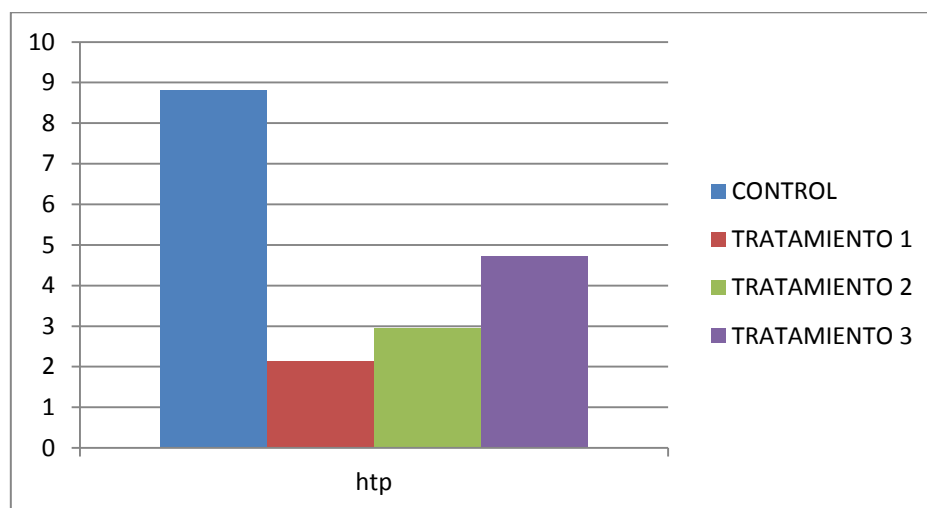


Grafico 10: Degradación de hidrocarburos totales de petróleo a los 7 días de empezado la biorremediación.

Se puede observar mediante el grafico 11, como fue la degradación en los tres tratamientos y en la prueba control a los 14 de la biorremediación,

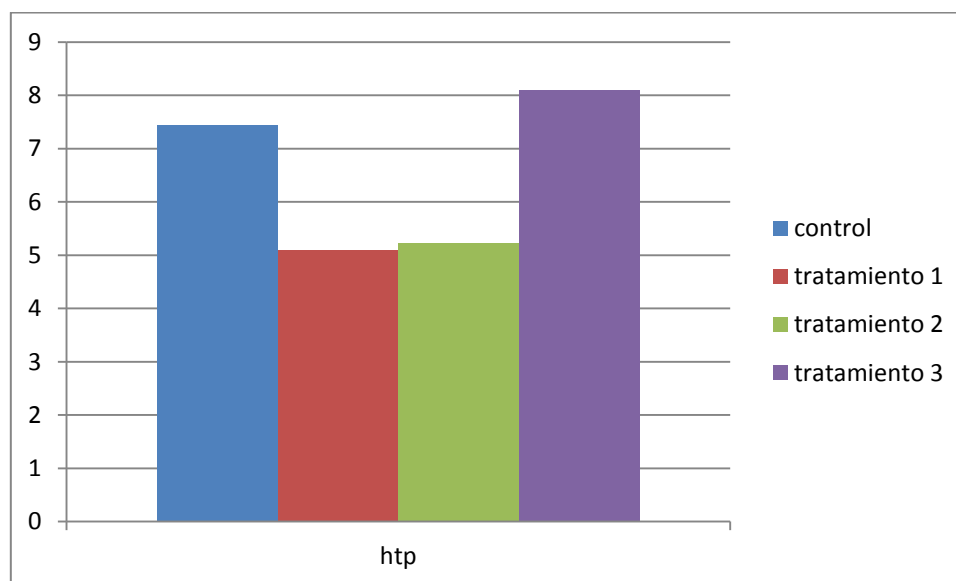


Grafico 11: Degradación de hidrocarburos totales de petróleo a los 14 días de empezado la biorremediación.

El análisis de varianza indica que existe diferencia significativa entre los tratamientos, en los 7 días y 14 días después de haber empezado la biorremediación, con respecto a la degradación de hidrocarburos en el suelo.

4.3. Identificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado con hidrocarburo.

Los microorganismos aislados, seleccionados y usados en esta investigación se identificaron y son *Bacillus cereos*, *Bacillus sp*, *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona fluorecens*.

4.4. Determinación de las dosis para el encalado del suelo.

Siendo los rangos óptimos para la biodegradación: pH entre 6- 8 y temperaturas entre 20-30°C (ALEXANDER, 1999), se han considerado elevar el pH del suelo de 4 a 6, 7 y 8.

4.4.1 Para alcanzar un pH 6

$$\text{CaCO kg/ha} = ((6 - 4)/0.15) \times 100$$

$$1333.3 \text{ CaCO kg/ha}$$

Tenemos 0.0314 m² que es el área del balde donde se colocaron 2.5 kg de suelos.

Para determinar la cantidad de cal a agregar para el tratamiento 1 se realizó la siguiente operación

$$1333.3 \text{ CaCO kg/ha} \times (1\text{ha}/10000 \text{ m}^2) \times 0.0042 \text{ m}^2$$

$$0.0042 \text{ CaCO kg}$$

$$\text{Tratamiento 1} = 4.2 \text{ g de CaCO}$$

4.4.2. Para alcanzar un pH 7

$$\text{CaCO kg/ha} = ((7 - 4)/0.15) \times 100$$

$$2000 \text{ CaCO kg/ha}$$

Tenemos 0.0314 m² que es el área del balde donde se colocaron 2.5 kg de suelos.

Para determinar la cantidad de cal a agregar para el tratamiento 2 se realizó la siguiente operación

$$2000 \text{ CaCO kg/Ha} \times (1\text{ha}/10000 \text{ m}^2) \times 0.0314 \text{ m}^2$$

$$0.0063 \text{ CaCo kg}$$

$$\text{Tratamiento 2} = 6.3 \text{ g de CaCO}$$

4.4.3. Para alcanzar un pH 8

$$\text{CaCO kg/ha} = ((8 - 4)/0.15) \times 100$$

$$2666.7 \text{ CaCO kg/ha}$$

Tenemos 0.0314 m^2 que es el área del balde donde se colocaron 2.5 kg de suelos.

Para determinar la cantidad de cal a agregar para el tratamiento 3 se realizó la siguiente operación

$$2666.7 \text{ CaCO kg/ha} \times (1\text{ha}/10000 \text{ m}^2) \times 0.0314 \text{ m}^2$$

$$0.0084 \text{ CaCo kg}$$

$$\text{Tratamiento 3} = 8.4 \text{ g de CaCO}$$

4.5. Evaluación del pH, recuento de microorganismo y la temperatura al inicio, a los 7 días y 14 días del proceso de biorremediación.

4.5.1. Lecturas del pH del medio de cultivo en los procesos de biorremediación.

En la prueba control o testigo al iniciar la biorremediación presentó un pH 6, a los siete días de la biorremediación presentó un pH 7.07 y a los 14 días de la biorremediación presentó un pH 8.4. (Grafico 12).

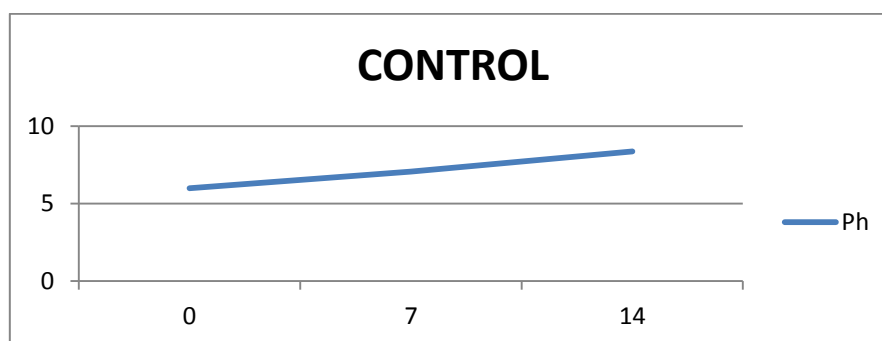


Grafico 12: Lecturas del pH del medio del cultivo en el proceso de biorremediación de la prueba control.

En la prueba tratamiento 1 al iniciar la biorremediación presentó un pH 6, a los siete días de la biorremediación presentó un pH 6.1 y a los 14 días de la biorremediación presentó un pH 8.8. (Grafico 13).

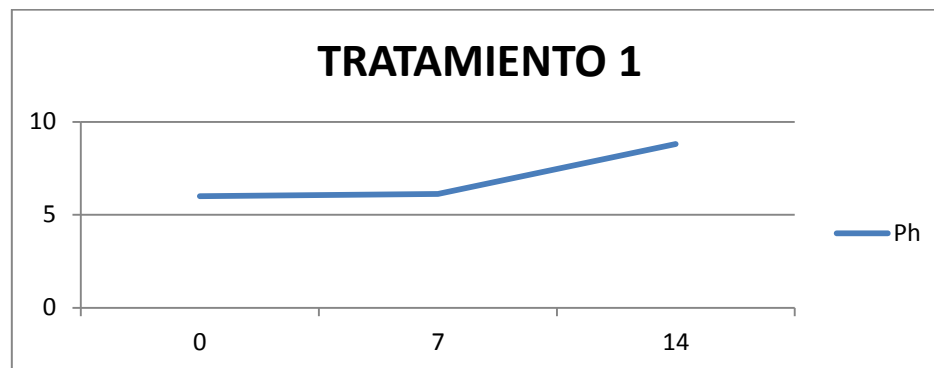


Grafico 13: lecturas del pH del medio del cultivo en el proceso de biorremediación del tratamiento 1.

En la prueba tratamiento 2 al iniciar la biorremediación presentó un pH 6, a los siete días de la biorremediación presentó un pH 7.8 y a los 14 días de la biorremediación presentó un pH 7.7. (Grafico 14).

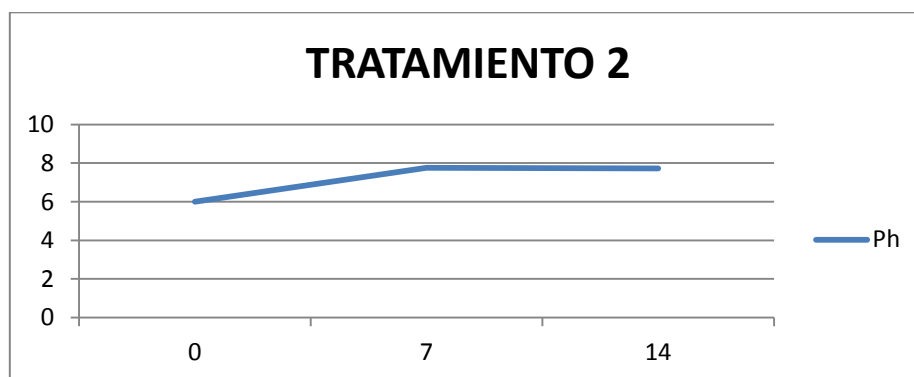


Grafico 14: Lecturas del pH del medio del cultivo en el proceso de biorremediación del tratamiento 2.

En la prueba tratamiento 3 al iniciar la biorremediación presentó un pH 6, a los siete días de la biorremediación presentó un pH 7.4 y a los 14 días de la biorremediación presentó un pH 7.8. (Grafico 15).

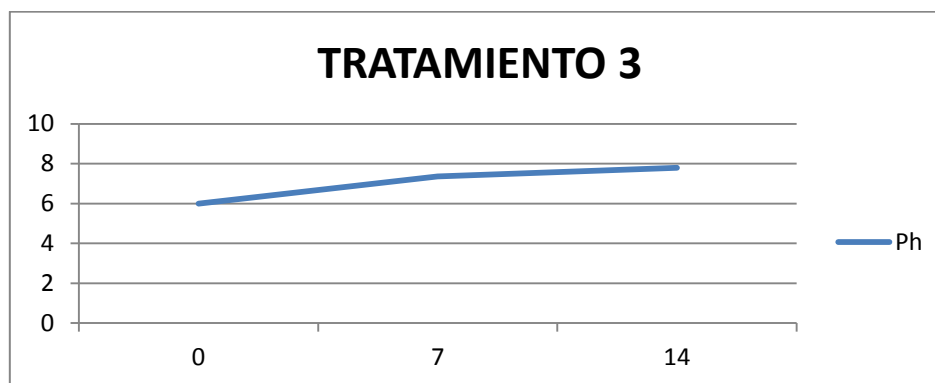


Grafico 15: Lecturas del pH del medio del cultivo en el proceso de biorremediación del tratamiento 3.

4.5.2. Recuento de microorganismos en los procesos de biorremediación.

En la prueba control o testigo al iniciar la biorremediación la cantidad de microorganismos seleccionados fueron 198×10^5 ufc/mL, a los siete días de la biorremediación presentó 472×10^3 ufc/mL y a los 14 días de la biorremediación presentó 5632×10^3 ufc/mL. (Grafico 16).

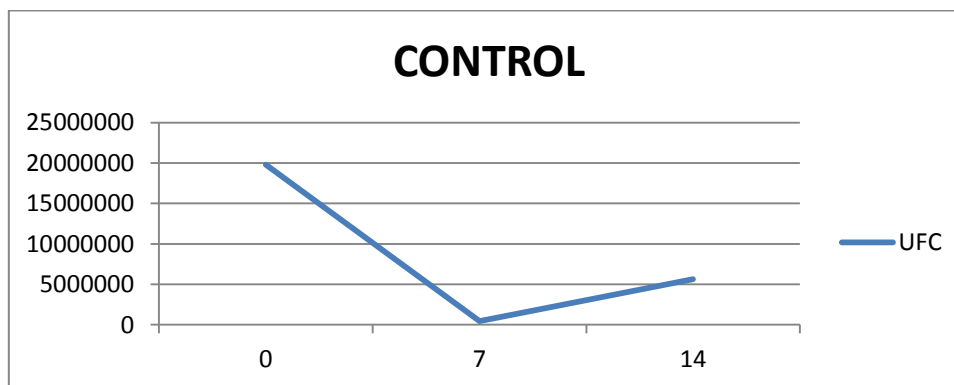


Grafico 16: Desarrollo de los microorganismos en el proceso de biorremediación de la prueba control.

En la prueba tratamiento 1 al iniciar la biorremediación la cantidad de microorganismos seleccionados fueron 198×10^5 ufc/mL, a los siete días de la biorremediación presentó 722×10^3 ufc/mL y a los 14 días de la biorremediación presentó 85×10^4 ufc/mL. (Grafico 17).

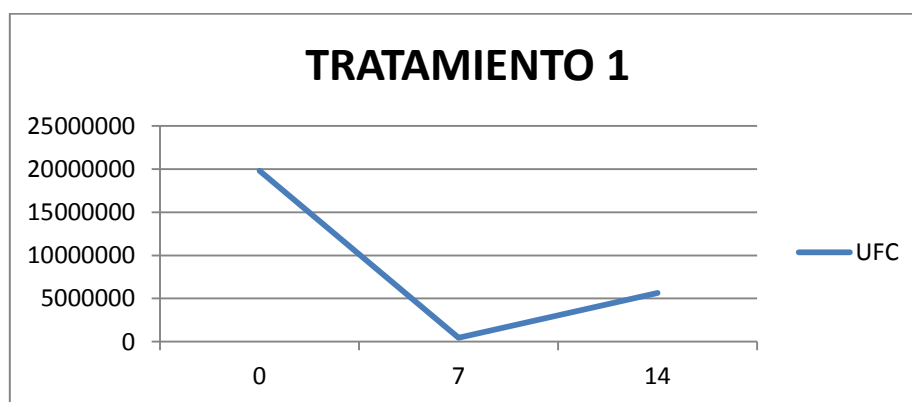


Grafico 17: Desarrollo de los microorganismos en el proceso de biorremediación del tratamiento 1.

En la prueba tratamiento 2 al iniciar la biorremediación la cantidad de microorganismos seleccionados fueron 198×10^5 ufc/mL, a los siete días de la biorremediación presentó 99×10^4 ufc/mL y a los 14 días de la biorremediación presentó 2768×10^3 ufc/mL. (Grafico 18).



Grafico 18: Desarrollo de los microorganismos en el proceso de biorremediación del tratamiento 2.

En la prueba tratamiento 3 al iniciar la biorremediación la cantidad de microorganismos seleccionados fueron 198×10^5 ufc/mL, a los siete días de la biorremediación presentó 235×10^4 ufc/mL y a los 14 días de la biorremediación presentó 2072×10^3 ufc/mL. (Grafico 19).

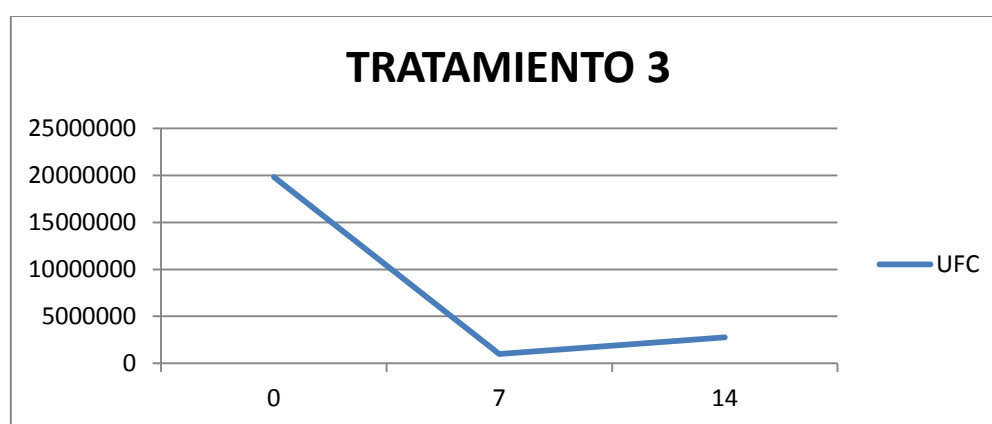


Grafico 19: Desarrollo de los microorganismos en el proceso de biorremediación del tratamiento 3.

Se puede observar mediante el grafico 20, como fue el desarrollo de los microorganismos en los tres tratamientos y en la prueba control a los siete días de la biorremediación, teniendo como resultado que en el tratamiento 3 hubo la mayor presencia de microorganismos.

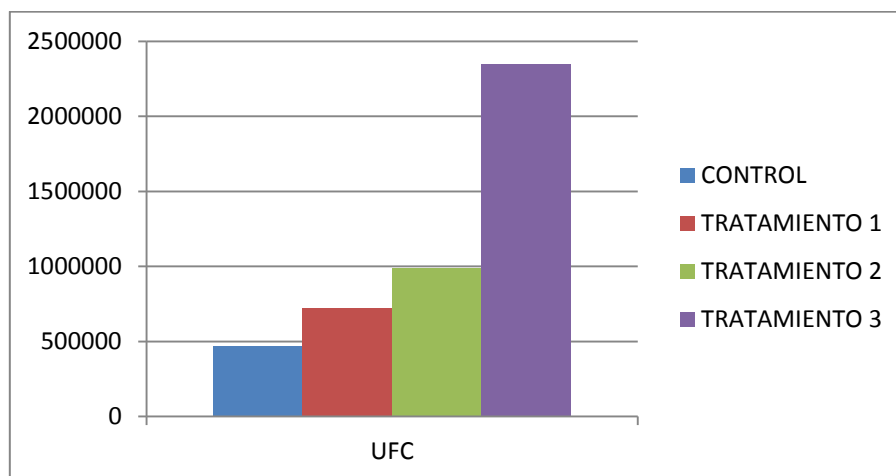


Grafico 20: Desarrollo de los microorganismos a los 7 días de empezado la biorremediación.

Se puede observar mediante el grafico 21 como fue el desarrollo de los microorganismos en los tres tratamientos y en la prueba control a los 14 días de la biorremediación, teniendo como resultado que en la prueba control hubo la mayor presencia de microorganismos.

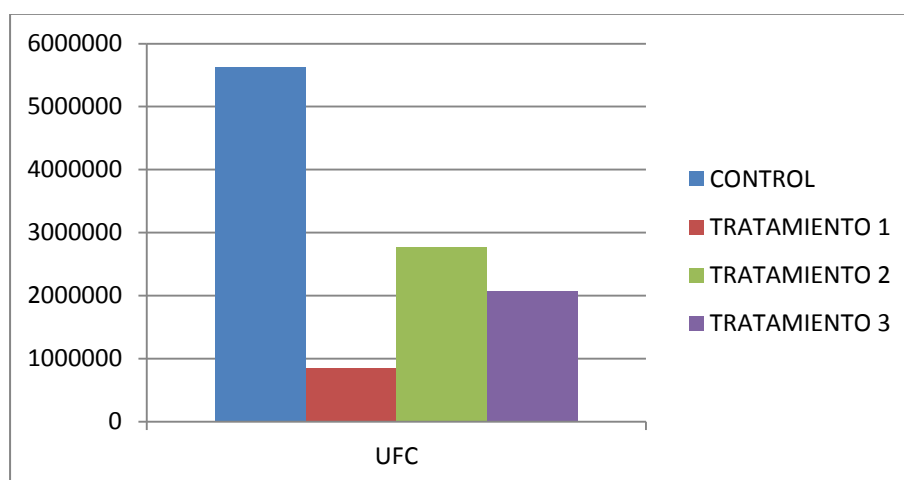


Grafico 21: Desarrollo de los microorganismos a los 14 días de empezado la biorremediación.

4.5.3. Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación.

En la prueba control o testigo al iniciar la biorremediación presentó una temperatura de 27.12°C, a los siete días de la biorremediación presentó una temperatura de 29°C, y a los 14 días de la biorremediación presentó una temperatura de 26.3°C. (Grafico 22).

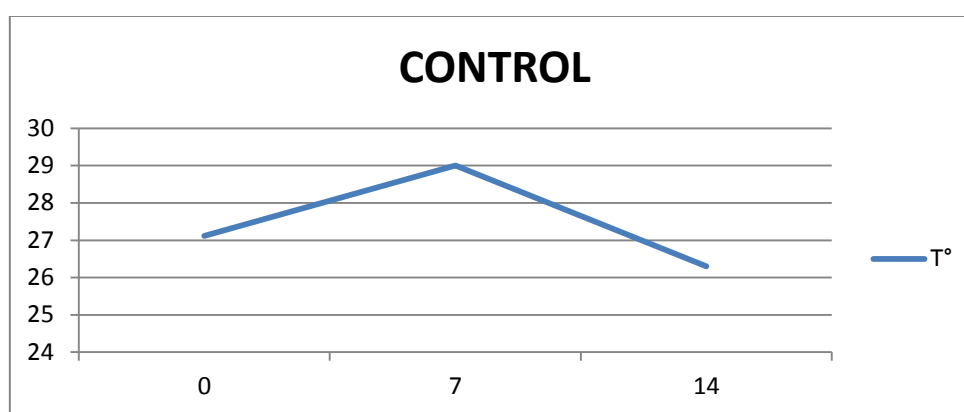


Grafico 22: Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación de la prueba control.

En la prueba tratamiento 1 al iniciar la biorremediación presentó una temperatura de 27.12°C, a los siete días de la biorremediación presentó una temperatura de 29.3°C, y a los 14 días de la biorremediación presentó una temperatura de 26.2°C. (Grafico 23).

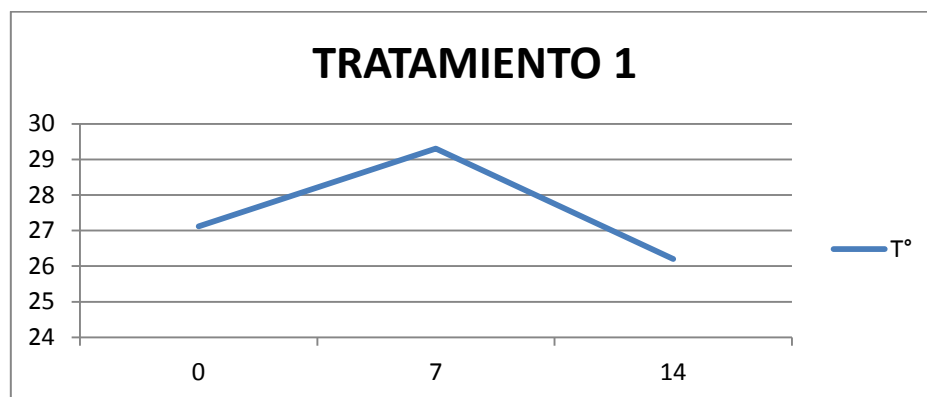


Grafico 23: Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación del tratamiento 1.

En la prueba tratamiento 2 al iniciar la biorremediación presentó una temperatura de 27.12°C, a los siete días de la biorremediación presentó una temperatura de 28.9°C, y a los 14 días de la biorremediación presentó una temperatura de 26.1°C. (Grafico 24).

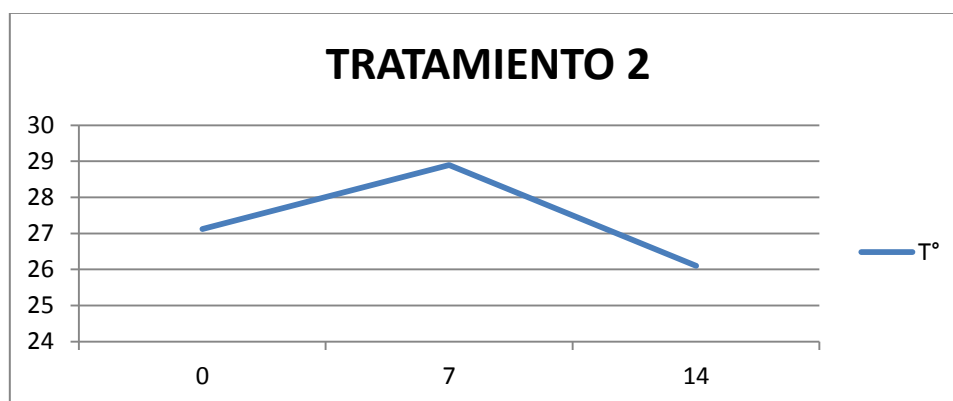


Grafico 24: Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación del tratamiento 2.

En la prueba tratamiento 3 al iniciar la biorremediación presentó una temperatura de 27.12°C, a los siete días de la biorremediación presentó una temperatura de 25.8°C, y a los 14 días de la biorremediación presentó una temperatura de 24.3°C. (Grafico 25).

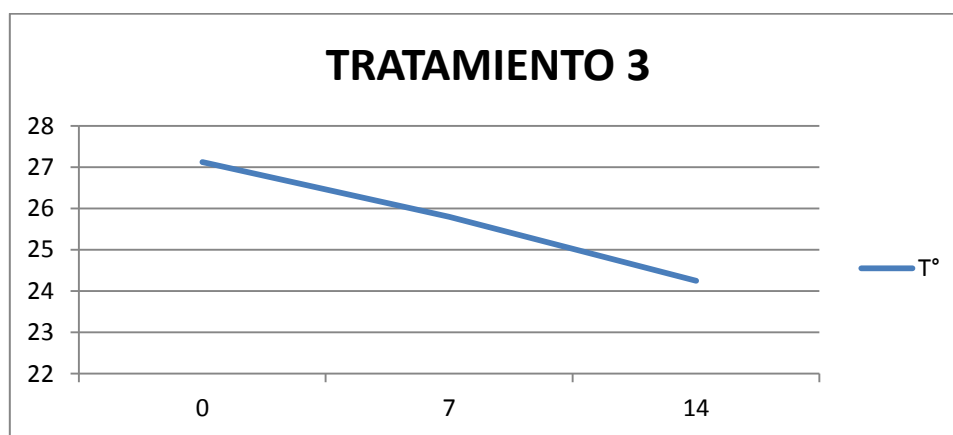


Grafico 25: Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación del tratamiento 3.

V. DISCUSION

La textura que presenta el suelo es franco arcillo arenoso, esto se debe a su mineralización y a los factores ambientales que intervinieron en el desarrollo de este suelo como lo menciona ALEXANDER (1999), teniendo un porcentaje de humedad de 25%, a este suelo se debería utilizar una humedad cercana al 60% de la capacidad de campo del suelo (MENN *et al.*, 2000).

El suelo contaminado utilizado presenta un pH de 4, y esta condición no es favorable para el desarrollo, para lo cual se elevó el pH con encalado (calcita) hasta alcanzar el rango óptimo para la biodegradación tal como indica ALEXANDER (1999), el cual menciona que el rango óptimo para la degradación con respecto al pH es de 6-8.

En el caso de los tratamientos 1 y 2 la degradación fue menor con respecto al tratamiento control y el tratamiento 3, contradiciendo lo mencionado por ALEXANDER (1999), y esto se debería a que existen otros factores más, aparte del pH que también intervienen en el normal desarrollo de los microorganismos, los cuales serían el tipo de sustrato, los nutrientes y concentraciones de oxígeno tal y como indica LADD *et. al*, (1996).

Los microorganismos fueron seleccionados para una mejor biodegradación del contaminante en el suelo, considerándose como un consorcio definido, tal y como nos menciona CASELLAS *et al*, (1998) y como también lo menciona SOLANAS, *et al*, (1984), esta acción de seleccionar nos permitió identificar los microorganismos con mayor eficiencia en la degradación de hidrocarburos totales de petróleo, en los cuales aparece en mayor cantidad la *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona fluorescens*, afirmando lo dicho por BAYONA, *et al*, (1986), SOLANAS *et al*, (1984), quienes indican que las cepas de las Pseudomonas degrada la mayor cantidad del crudo de petróleo, también de la selección de microorganismos se obtuvieron la presencia de dos especies de Bacillus, los cuales son *Bacillus cereos*, *Bacillus sp*, considerándose también a estos como degradadores de hidrocarburos de petróleo, estando dentro de la clasificación de microorganismos degradadores de crudo de petróleo mencionados por CASELLAS *et al*, (1998).

El uso del encalado (calcita) causó diferencia favorables en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, con respecto a acelerarlo o duplicar la degradación del crudo de petróleo, en este caso no se consideraría como un bioestimulador como lo menciona ALEXANDER, (1999), si no como un aditivo que mejorara básicamente las condiciones físicas del suelo con respecto al pH y de cierta forma ayude a favorecer la actividad microbiana como nos lo menciona MENN *et al*, (2000).

En base a lo mencionado por WRENN Y VENOSA, (1996), antes de iniciar la biorremediación, se procedió a aislar microorganismos degradadores del crudo de petróleo del mismo suelo, para seleccionarlos y evitar ingresar microorganismos exógenos, que podrían afectar en la parte microbiológica del suelo

VI. CONCLUSIONES

1. La calcita causó un efecto en la biorremediación de suelos, ya que a la mayor dosis la biorremediación fue igual a como si no se le agregara calcita, mejorando no solo la biorremediación si no también las condiciones de suelo, en este caso su pH.
2. El suelo contaminado proporcionado por la empresa MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L., es un suelo franco arcillo arenoso, con un pH 4, y un porcentaje de humedad de 25 %.
3. La prueba control o testigo presentó la mayor degradación de hidrocarburos, teniendo como pH del suelo 4; de los tratamientos el 3 presentó la mayor degradación de hidrocarburos, teniendo como pH del suelo 8 debido a la aplicación de calcita. Existe diferencia significativa entre los tratamientos en las dos veces que se evaluó la degradación de hidrocarburos en el suelo. La prueba control y el tratamiento tres son mejor e iguales a un nivel de significancia de 0.05.
4. Los microorganismos degradadores de hidrocarburos utilizados fueron *Bacillus cereos*, *Bacillus sp*, *Pseudomona aeruginosa* y *Pseudomona*

fluorecens, Los cuales mostraron mediante los datos que degradaron hidrocarburos en la prueba control y en los tratamientos.

5. El desarrollo de los microorganismos con respecto al tiempo, se observa un mayor desarrollo en la prueba control, esto explica por qué se dio mayor degradación en esta prueba, en los tratamientos a los 7 días hubo disminución de microorganismos con respecto al inicio, sin embargo en el tratamiento 3 hay mayor presencia de microorganismos lo cual también indica que este tratamiento presentó la mayor degradación con respecto a los demás tratamientos.

VII. RECOMENDACIONES

1. Sugerir a las autoridades de la empresa MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L. tener más cuidado en lo que respecta a la extracción del hidrocarburo de petróleo y que esta actividad tenga un mejor control para contaminar menos suelo.
2. Sugerir también a las autoridades de la empresa MAPLE GAS CORPORATION DEL PERU S.R.L. que no mezclen todos los suelos contaminados ya que cada suelo presenta sus propias características físicas, químicas y biológicas y esto ayudara a realizar una biorremediación más eficiente de suelos contaminados con hidrocarburos.
3. sugerir a las empresas explotadoras de hidrocarburos a no solo cumplir con recuperar estos suelos contaminados por ellos, si no también dejarlos en condiciones aptas para poder sembrar cultivos o plantas forestales, según las características físicas, químicas y biológicas que presentan estos suelos.
4. Determinar en otras investigaciones la biorremediación de cada fracción del hidrocarburo, sobre todo aquellos que son más tóxicos y utilizar aditivos que pueden mejorar la actividad microbiana y las condiciones del suelo.

5. Sugerir que en los lugares donde se realice la explotación de hidrocarburos y se contamine el suelo, se aíslen y seleccionen microorganismos del mismo suelo contaminado capaces de degradar hidrocarburos, para una clasificación de estos relacionándolos según el tipo de suelo.
6. Sugerir a las máximas autoridades que están inmersas en el tema sobre el medio ambiente (Ministerio del Ambiente y Ministerio de Energía y Minas), a ser drásticos y detallar con exactitud cada ley ambiental para que las empresas dedicadas a las explotaciones de hidrocarburos investiguen y apliquen tecnologías más eficientes en la recuperación de suelos, y se contamine menos suelo.

VIII. ABSTRACT

The present work of investigation had as aim determine the effect of the whitewashed one (calcite) in the bioremediation of soils contaminated by hydrocarbons, in this investigation we used a contaminated soil in Pucallpa facilitated by the company MAPLE GAS CORPORATION OF THE PERU S.R.L. The methodology used to obtain the quantity of total hydrocarbons of oils that was containing this contaminated soil for his selection as organisms degraders of total hydrocarbons of oil, followed of this, to the contaminated soil three types of dose of calcite were joined (4.2, 6.3 and 8.4 grams/2kg of soil), later from this action 10 grams of contaminated soil were extracted to which the doses of calcite were joined, every doses with two repetitions and placed in the bioreactors which contained half minimal of salts, glucose, the selected and activated microorganisms; to these bioreactors we took information to 7 and 14 days of having being installed, with a repetition to every treatment, of the obtained information and applying the analysis of variance and HDS test of turkey, there was obtained that the control treatment and the treatment 3 (8.4 grams/2kg of soil) significantly they are equal and better than the treatment 1 (4.2grams/2kg of soil)

and treatment 2 (6.3 grams/2kg of soil), simultaneously of the information obtained that in the treatment 3 developed more microorganisms that in other treatments to 7 days of having initiated the bioremediation and to 14 days of initiated the bioremediation the control treatment presented major presence of microorganisms.

Concluding, that it is possible to improve the conditions of the soil with regard to its pH and simultaneously to be possible to obtain a better bioremediation, with a soil with pH adapted to sow some plants.

IX. BIBLIOGRAFIA

- ABALOS, A., M. VIÑAS, J. SABATÉ, M. A. MANRESA Y A. M. SOLANAS. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhamnolipid produced by *Pseudomonas Aeruginosa* AT10. *Biodegradation*. 15:249-260.
- ALEXANDER, M. 1999. *Biodegradation and Bioremediation*. Segunda edición. Academic Press, Inc., San Diego
- AMANN, R. I, W. LUDWIG Y K. H. SCHLEIFER. 1995. Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microb. Rev.* 59: 143-169.
- ASTM D5369-93. 2003. Standard practice for extraction of solid waste samples for chemical analysis using soxhlet extraction. *Environmental Assessment, Book of Standards, Vol. 11.04, September 2004.*
- ATAGANA, H. I., R. J. HAYNES Y F. M. WALLIS. 2003. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation* 14: 297– 307.

- ATAGANA, H. I. 2004. Bioremediation of creosote-contaminated soil in South Africa by landfarming. *Journal of Applied Microbiology*. 96:510-520.
- ATLAS, R. M. Y R. BARTHA. 1997. *Microbial Ecology, fundamentals and applications*. The Benjamin/Cummings Publishing Company. Redwood City, CA.
- ALTAMIRANO, M. y POZZO, M. 2000. Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburoclíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVII Congreso interamericano de Ingeniería ambiental y sanitaria. Buenos Aires, Argentina. 6 p. Disponible en www.ingenieroambiental.com, Consultado el 03 jun. 2004.
- BAYONA, J. M., J. ALBAIGÉS, A. M. SOLANAS, R. PARÉS, P. GARRIGUES Y M. EWALD. 1986. Selective aerobic degradation of methyl-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by pure microbial cultures. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 23:289-303.
- BORNEFF, J., F. SELENCA, H. KNUTE Y A. MAXIMOS. 1968. Experimental studies on the formation of polycyclic aromatic hydrocarbons in plants. *Environ. Res.* 2:22-24.
- BUMPUS, J. A. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:154-158.

- CASELLAS, M., P. FERNÁNDEZ, J. M. BAYONA Y A. M. SOLANAS. 1995. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in urban airborne particulate matter from Barcelona (Spain). *Chemosphere* 30:725-740.
- CASELLAS, M., M. GRIFOLL, J. M. BAYONA Y A. M. SOLANAS. 1997. New metabolites in the degradation of fluorene by *Arthrobacter* sp. strain F101. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:819-826.
- CASELLAS, M., M. GRIFOLL, J. SABATE Y A. M. SOLANAS. 1998. Isolation and characterization of a 9-fluorenone-degrading bacterial strain and its role in synergistic degradation of fluorene by a consortium. *Can. J. Microbiol.* 44:734-742.
- CERNIGLIA, C. E., G. L. WHITE Y R. H. HEFLICH. 1985. Fungal metabolism and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Arch. Microbiol.* 143:105-110.
- CERNIGLIA, C. E. Y M. A. HEITKAMP. 1989. Microbial of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. En U. Varanasi (Ed.) *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. CRC Press, Inc, Boca Raton, Florida. pp. 1-45.
- CERNIGLIA, C. E., J. B. SUTHERLAND Y S. A. CROW. 1992. Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons. En : G. Winkelmann (Ed.) *Microbial degradation of natural products.* VCH. Weinheim. pp. 193-217.

- CHAINEAU, C. H.; C. YEPREMIAN, J. F. VIDALIE, J. DUCREUX Y D. BALLERINI. 2003. Bioremediation of a Crude Oil-Polluted Soil: Biodegradation, Leaching and Toxicity Assessments. *Water, Air, and Soil Pollution*. 144:419-440.
- CHAPMAN D. H., Y PRATT P. F. 1979. "Método de análisis para suelos, plantas y agua". 5ta., edición. Editorial Trillas, México.
- CUBITO M. y CABEZALI C. 2000. Tipificación y evolución de la actividad degradadora de hidrocarburos de una cepa bacteriana aislada del estuario de Bahía Blanca, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 33 (3): 141– 148.
- DAGLEY, S. 1981. New perspectives in aromatic catabolism. In T. Leisinger, A. M. Cook, R. Hütter y J. Nüesch, editors, *Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds*. Academic Press. New York. pp. 181-186
- DAVIS, J. B. Y R. L. RAYMOND. 1961. Oxidation of alkyl substituted cyclic hydrocarbons by a *Nocardia* during growth on n-alkanes. *Appl. Microbiol.* 9:383-388.
- DIBBLE, J. R. Y R. BARTHA. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Env. Microbiol.* 37:729-739.
- EL FANTROUSSI, S., L. VERSCHUERE, W. VERSTRAETE Y E. M. TOP. 1999. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by

analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:982- 988.

EPA. 1996. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4225 Seedling Emergence, Tier II. EPA 712-C-96-363

EPA. 1994. How to Evaluate Alternative Cleanup Technologies for Underground Storage Tank Sites: A Guide for Corrective Action Plan Reviewers. (EPA 510-B-94-003; EPA 510-B- 95-007; and EPA 510-R-04-002). EPA documents.

FOGHT, J. M., P. M. FEDORAK Y D. W. S. WESTLAKE. 1990. Mineralization of [14C]hexadecane and [14C]phenanthrene in crude oil: specificity among bacterial isolates. *Can. J. Microbiol.* 36:169-175.

FOGHT, J. M., K. SEMPLE, C. GAUTHIER, D. W. S. WESTLAKE, S. BLENKINSOPP, G. SERGY, Z. WANG Y M. FINGAS. 1998. Development of a standard bacterial consortium for laboratory efficacy testing of commercial freshwater oil spill bioremediation agents. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 21:322-330.

FOGHT, J., K. SEMPLE, C. GAUTHIER, D. W. S. WESTLAKE, S. BLENKINSOPP, G. SERGY, Z. WANG Y M. FINGAS. 1999. Effect of nitrogen source on biodegradation of crude oil by a defined bacterial consortium incubated under cold, marine conditions. *Environ. Technol.* 20:839- 849.

- GENOUW, G., F. DE NAEYER, P. VAN MEENEN, H. VAN DEWERF, W. DE NIJS Y W. VERSTRAETE. 1994. Degradation of oil sludge by landfarming- a case study at the Ghent harbor. *Biodegradation*. 5:37-46.
- GRIFOLL, M, S. A. SELIFONOV, C. V. GATLIN Y P. J. CHAPMAN. 1995. Actions of a versatile fluorenedegrading bacterial isolate on polycyclic aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3711-3723.
- HICKS, R., R. I. AMANN Y D. A. STAHL. 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6- diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2158-2163.
- HOWE-GRANT, M. 1996. Petroleum. *Encyclopedia of chemical technology* 4th ed. Wiley Interscience Publication. New York. pp. 342-480.
- KANALY, R. A. Y S. HARAYAMA. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182:2059-2067.
- LADD, J. N., R. C. FOSTER, P. NANNIPIERI Y J. M. OADES. 1996. Soil structure and biological activity. *Soil Biochem.* 9:23-78.
- LAJOIE, C. A. Y P. F. STROM. 1994. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in coal tar oil contaminated soil. *En Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil*. Wise, D. L. y D. J. Trantolo (Eds). New York: Marcel Dekker. pp. 149-162.

- LINDSTROM, J. E., R. C. PRINCE, J. C. CLARK, M. J. GROSSMANN Y T. R. YEAGER. 1991. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potentials in fertilized shoreline sediments affected by the T/V Exxon Valdez oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2514-2522.
- MARC VIÑAS CANALS, 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis Doctor en Biología. Barcelona, España. Universidad de Barcelona. 342 p.
- MENN, F-M., J. P. EASTER Y G. S. SAYLER. 2000. Bacterial activity enhancement and soil decontamination. In H.J.Rehm, G.Reed, A.Pühler and P.Stadler, editors, *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination.* Wiley-VCH. Weinheim. pp. 425-439.
- MORGAN, P. Y R. J. WATKINSON. 1992. Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the in situ biotreatment of contaminated soil and groundwater. *Water Res.* 26:73-78
- MORGAN, P. Y R. J. WATKINSON. 1994. Biodegradation of compounds of petroleum. En: C. Ratledge (Ed), *Biochemistry of microbial degradation.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.
- PRAMER, D. Y R. BARTHA. 1972. Preparation and processing of soil samples for biodegradation studies. *Environ. Lett.* 2:217-224

- PRESCOTT, L.; HARLEY, J.; KLEIN, D. 1999. Microbiología. Cuarta edición. McGraw-Hill Interamericana.
- RICARDO HONORATO P. 2000, Manual de Edafología. Col. Del Valle, Mexico, 4ed. 267p.
- ROSINI, F. D. 1960 Hydrocarbons in petroleum. Journal of Chem.Educ. 39:554-561
- SOLANAS, A. M., R. PARÉS, J. M. BAYONA Y J. ALBAIGÉS. 1984. Degradation of aromatic petroleum hydrocarbons by pure microbial cultures. Chemosphere. 13:593-601.
- SPARROW, S. D. Y E. B. SPARROW. 1988. Microbial biomass and activity in a subarctic soil ten year after crude spills. J. Environ. Qual. 17:304-309
- SPEIGHT, J. G. 1991. The chemistry and technology of petroleum. John Wiley and Sons. New York.
- TORSVIK, V., F. L .DAAE, R. A. SANDAA Y L. OVREAS. 1990. Novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. J.Biotechnol. 64:53-62.
- TORSVIK, V., L. OVREAS Y T. F. THINGSTAD. 2003. Prokaryotic Diversity - Magnitude, Dynamics and Controlling Factors. Science. 296:1064-1066.
- US EPA 3540C. 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 3).

- US EPA 3541. 1994. Automated soxhlet extraction. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. (Revision 0).
- US EPA 821-B-94-004 (Method 1664). 1995. N-hexane extractable material (HEM) and silica gel treated N-hexane extractable material (SGTHEM) by extraction and gravimetry (oil and grease and total petroleum hydrocarbons).
- TRUPER, H. G. 1992. Prokaryotes- an overview with respect to biodiversity and environmental importance. *Biodiv.Cons.* 1:227-236.
- VAN HAMME, J. D., J. A. ODUMERU Y O. P. WARD. 2000. Community dynamics of mixedbacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. *Can. J. Microbiol.* 46:441-450.
- VAN HAMME, J. D., A. SINGH Y O. P. WARD. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:503-549.
- VERSTRAETE, W. R., R. VANLOOKE Y R. DE BORGER. 1976. Modeling of the breackdown and the molbilization of hydrocarbons in unsaturated soil layers. En: *Proc. 3rd Int. Biodegradation Symp.* (Sharpley, J. M. A. M. Kaplan (Eds)). Applied Science Publishers. London. pp. 98-112
- WEISMAN W. 1998. Analysis of petroleum hydrocarbons in environment media. Vol. 1. Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. Association

of American Railroads BP Oil Company. United States Air Force, Armstrong Laboratory, Occupational Medicine Division.

WHISE, D. L. 2000. Bioremediation of contaminated soils. Marcel Decker. New York.

WRENN, B. A. Y A. D. VENOSA. 1996. Selective enumeration of aromatic and aliphatic hydrocarbon-degrading bacteria by a most-probable-number procedure. *Can. J. Microbiol.* 42 :252-258.

U.S. EPA. 1995. How to evaluate alternative clean-up technologies for underground storage tank sites: a guide for corrective action plan. EPA 510-B-95-007

X. ANEXO

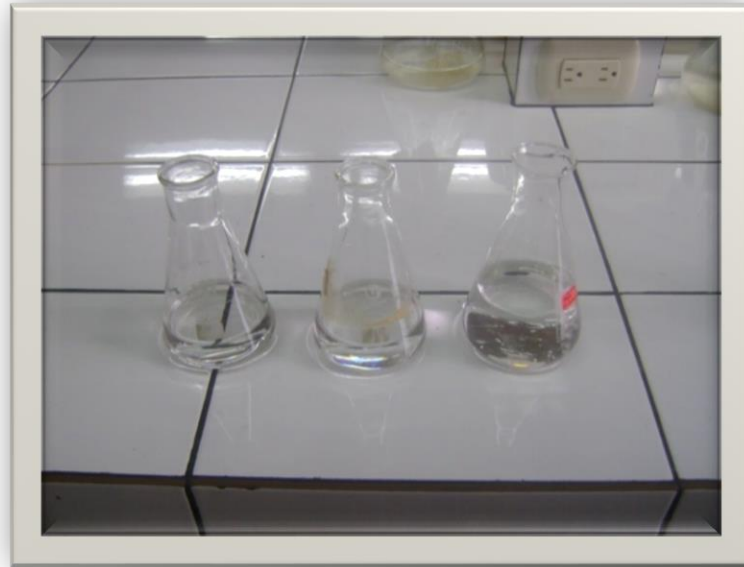
PANEL FOTOGRAFICO

Foto 1: Diluyentes para aislar microorganismos del suelo



Foto 2: Pipeteando los diluyentes para aislamiento de microorganismos del suelo



Foto 3: Preparación del medio BHI



Foto 4: Pesando el suelo para el aislamiento de microorganismos



Foto 5: Filtrando el suelo para poder hacer las diluciones

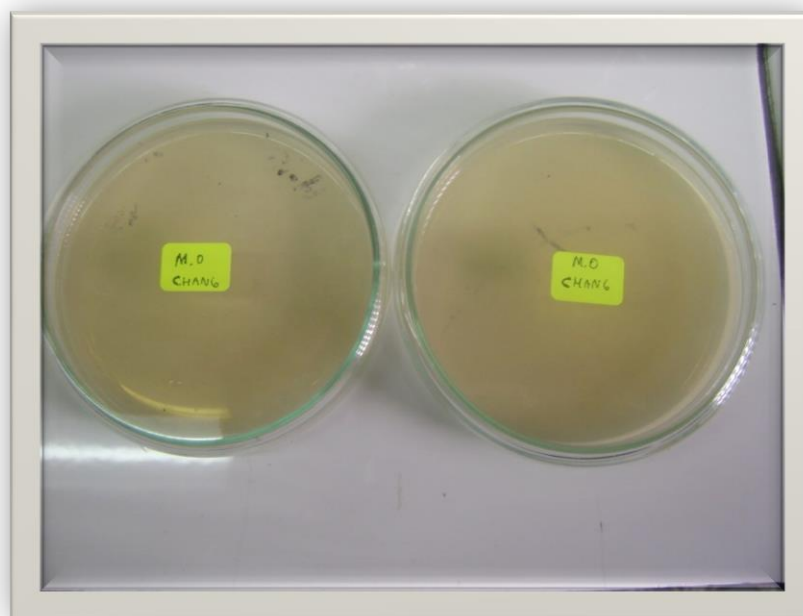


Foto 6: Aislamiento de microorganismos en placas

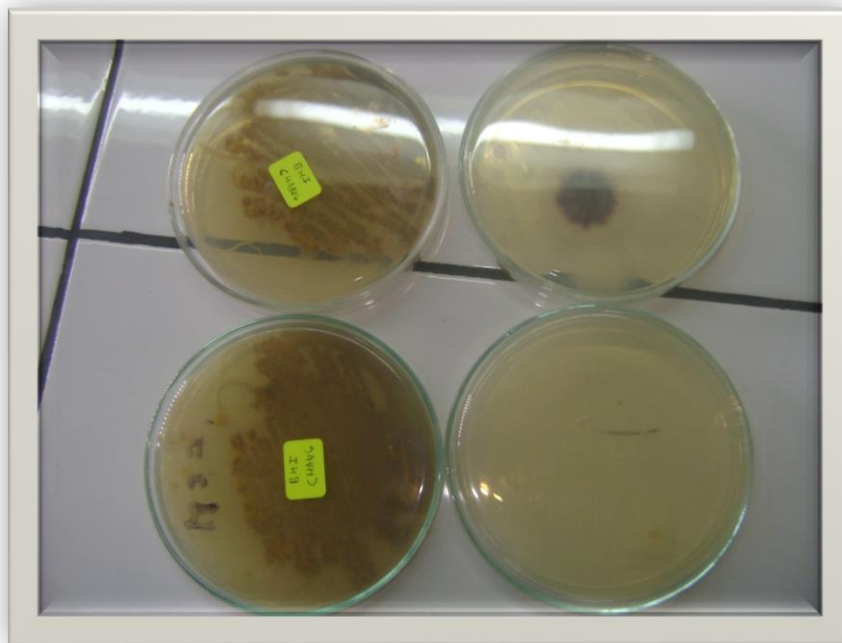


Foto 7: Crecimiento de microorganismos aislados del suelo contaminado



Foto 8: Preparación de medios para aislamiento individual de microorganismos

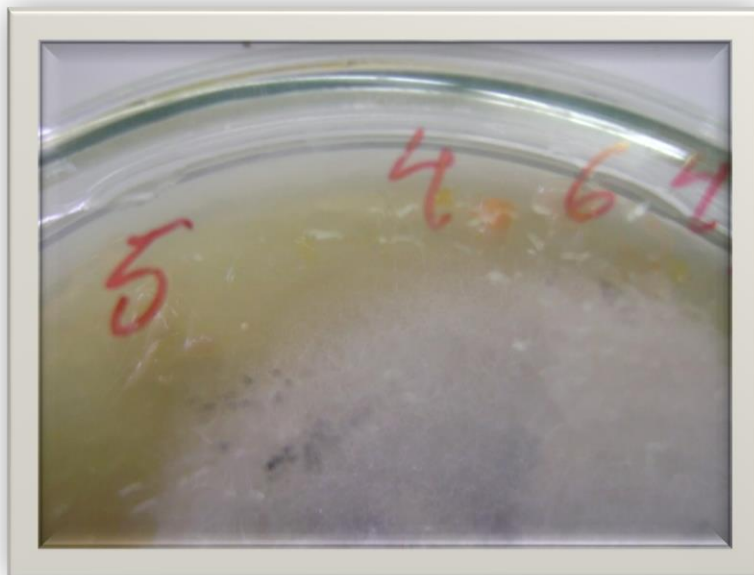


Foto 9: Microorganismos desarrollados en la placa



Foto 10: Sembrando los microorganismos individualmente en placas

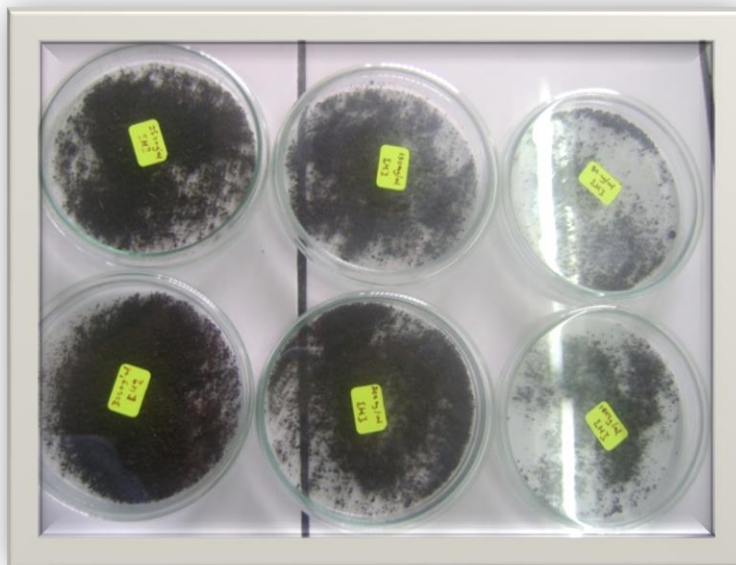


Foto 11: Preparación de medios con el suelo contaminado en diferentes concentraciones

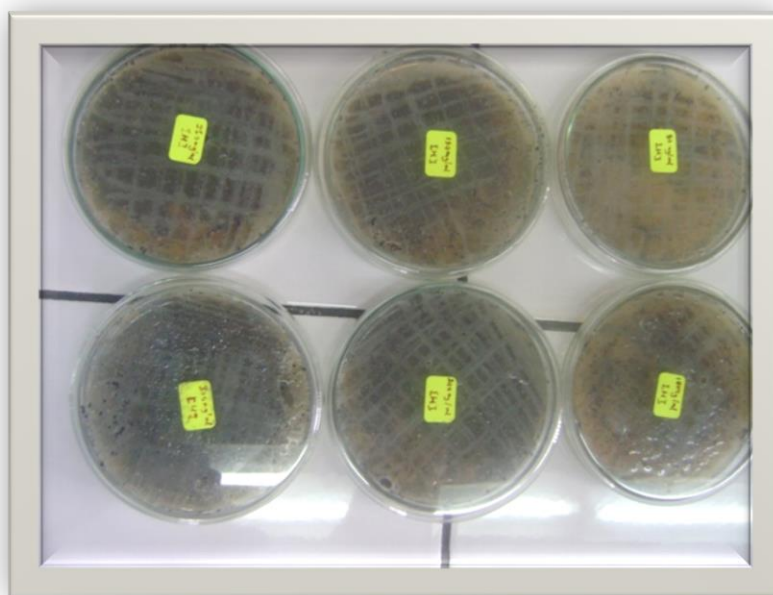


Foto 12: Desarrollo de microorganismos en diferentes concentraciones

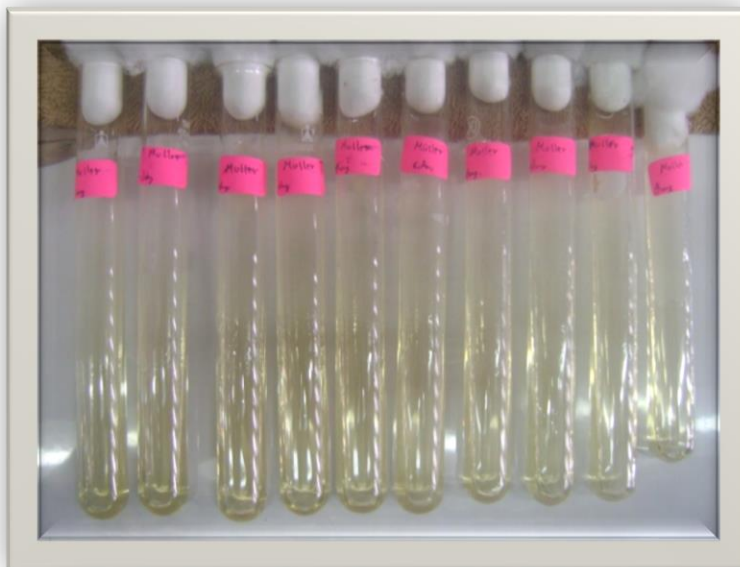


Foto 13: Preparación de medio Müller



Foto 14: Aplicando la metodología soxhlet



Foto 15: Resultado de la extracción por reflujo soxhlet



Foto 16: Pesando la calcita para los tratamientos



Foto 17: Tratamiento 1



Foto 18: Aplicación de calcita al primer tratamiento



Foto 19: Tratamiento 2



Foto 20: Aplicación de la calcita al tratamiento 2



Foto 21: Tratamiento 3



Foto 22: Aplicación de calcita al tercer tratamiento



Foto 23: Biorreactores instalados



Foto 24: Biorreactores para microorganismos aeróbicos



Foto 25: Iniciando la recopilación de datos



Foto 26: Lectura de pH y temperatura del medio de cultivo



Foto 27: Muestreando del biorreactor para recuento de microorganismos



Foto 28: Medio play cont para recuento de microorganismos de los biorreactores



Foto 29: Muestrando de los biorreactores



Foto 30: Vaciando los recipientes para poder sacar el suelo para determinar hidrocarburos sobrantes



Foto 31: Recipientes vacíos listos para sacar el suelo y determinar la cantidad de hidrocarburos por método soxhlet

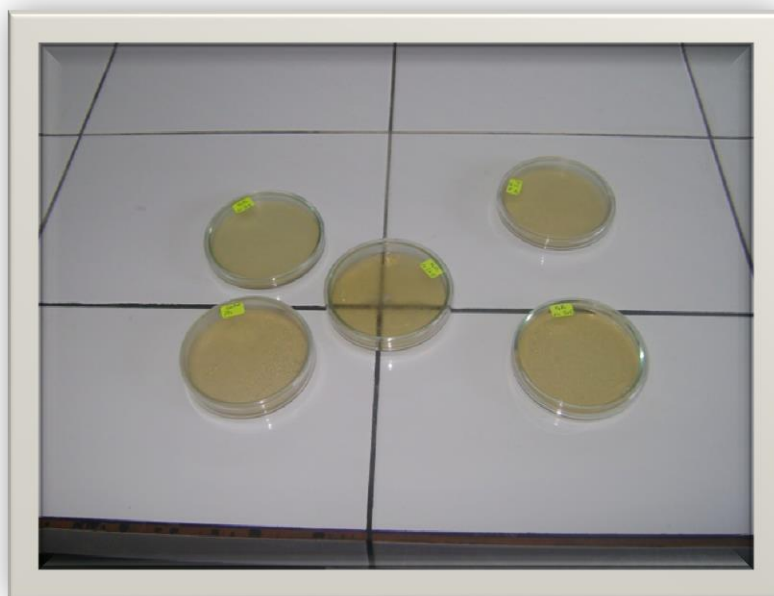


Foto 32: Placas con medios play cont e inóculos de medios de cultivo con microorganismos para su recuento



Foto 33: Suelos después del proceso de biorremediación



Foto 34: Enfriando muestras para su posterior pesaje

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCION.....	1
1.1. Objetivo general.....	3
1.2. Objetivos específicos.....	3
II. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Composición del crudo del petróleo.....	4
2.1.1. Composición general.....	4
2.1.2. Composición por familias de hidrocarburos.....	5
2.1.2.1. Parafinas volátiles (n - alcanos e isoprenoides volátiles).....	6
2.1.2.2. Parafinas no volátiles (<i>n – alcanos e isoprenoides</i>).....	6
2.1.2.3. Naftenos (cicloalcanos).	7
2.1.2.4. Oleofinas (alquenos).....	8
2.1.2.5. Hidrocarburos aromáticos.....	9
2.1.2.5.1. Hidrocarburos mono aromáticos.....	9

2.1.2.5.2. Hidrocarburos poli aromáticos.....	9
2.1.2.6. Resinas y asfáltenos.....	10
2.1.3. Composición del crudo según el origen.....	10
2.2. Antecedentes en el estudio de la degradación de crudos de petróleo.....	11
2.2.1. Biodegradación de crudo de petróleo mediante cepas aisladas.....	11
2.2.2. Biodegradación de crudo de petróleo por cultivos mixtos.....	12
2.2.2.1. Consorcios definidos.	12
2.2.2.2. Consorcios no definidos.	13
2.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	14
2.3.1. Estructura de los HAPs.....	14
2.3.2. Origen y distribución de los HAPs en el medio ambiente.	15
2.3.3. Biodegradación de HAPs.....	20
2.3.4. Microorganismo degradadores de HAPs.	23
2.3.5. Utilización de inóculos exógenos en experiencias de biorremediación.	24
2.3.6. Estudio de la diversidad de comunidades microbianas.	27
2.3.6.1. Metodologías dependientes de cultivo.....	28
2.4. El suelo.	30
2.4.1. Estructura y componentes del suelo.....	30
2.4.2. Las poblaciones microbianas.	31

2.4.3. Destino ambiental de los contaminantes orgánicos en el suelo.	33
2.5. Ventajas y limitaciones de los procesos de biorremediación de suelos contaminados.	34
2.6. Factores que condicionan la biorremediación de un suelo.	36
2.6.1. El pH, temperatura y la humedad	37
2.6.2. Estructura química.....	39
2.6.3. Biodisponibilidad.....	40
2.6.4. Presencia de aceptores de electrones.....	41
2.6.5. Nutrientes inorgánicos	41
2.7 Encalado.....	42
2.7.1 Cal agrícola o calcita	43
2.7.2 Reacciones de la cal en el suelo	43
2.7.3 Cálculo de la dosis de cal según el pH.	43
2.7.4 Efectos de la aplicación de la cal.....	45
2.7.4.1 Desarrollo microbiano.....	45
III. MATERIALES Y MÉTODOS	46
3.1 Descripción del lugar de estudio.....	46
3.1.1 Ubicación política.....	46
3.1.2 Características ambientales de la zona de estudio	47

3.1.3 Clima	47
3.2 Materiales y equipos	47
3.2.1 De campo	47
3.2.2 De laboratorio	48
3.2.2.1 Materiales	48
3.2.2.2 Equipos.....	48
3.2.2.3 Insumos	49
3.2.2.4 Reactivos	49
3.3 Metodología	49
3.3.1. Unidades de estudio	49
3.3.2. Determinación de la concentración de hidrocarburos en el suelo.	50
3.3.2.1. Preparación de muestras de suelo para extracción.....	50
3.3.2.2. Extracción de hidrocarburos	51
3.3.2.2.1. Extracción por reflujo (Soxhlet).....	51
3.3.2.3. Cuantificación de hidrocarburos	52
3.3.3. Determinación de la textura del suelo.....	54
3.3.4 Determinación del pH del suelo	55
3.3.6. Aislamiento de microorganismos depredadores de hidrocarburo.	56
3.3.7. Selección de microorganismos degradadores de hidrocarburos	57

3.3.8 Identificación de los microorganismos seleccionados	58
3.3.9 determinación de las dosis de cal a utilizarse en la investigación	58
3.3.10 Instalación de los biorreactores para la investigación.....	59
3.3.11 Determinación del pH de los biorreactores.....	59
3.3.12 Recuento de microorganismos	60
3.3.13 Análisis estadístico	60
IV. RESULTADOS.....	61
4.1. Textura, pH y porcentaje de humedad del suelo contaminado con hidrocarburo.....	61
4.2. Cantidad de hidrocarburos totales de petróleo presentes en el suelo al iniciar, a los 7 días y a los 14 días de la biorremediación.	61
4.3. Identificación de microorganismos degradadores de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado con hidrocarburo.....	65
4.4. Determinación de las dosis para el encalado del suelo.	66
4.4.1 Para alcanzar un pH 6	66
4.4.2. Para alcanzar un pH 7	66
4.4.3. Para alcanzar un pH 8	67
4.5. Evaluación del pH, recuento de microorganismo y la temperatura al inicio, a los 7 días y 14 días del proceso de biorremediación.	68

4.5.1. Lecturas del pH del medio de cultivo en los procesos de biorremediación.	68
4.5.2. Recuento de microorganismos en los procesos de biorremediación....	70
4.5.3. Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación.	74
V. DISCUSION.....	77
VI. CONCLUSIONES.....	80
VII. RECOMENDACIONES	82
VIII. ABSTRACT	84
IX. BIBLIOGRAFIA	86
X. ANEXO	96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
Composición de las fracciones químicas contenidas en un crudo de petróleo	5
Isoprenoides componentes del crudo de petróleo de interés geoquímico	7
Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAPs prioritarios de la EPA	17
Fuentes de HAPs	19
Estudios de biorremediación de aguas y suelos contaminados, con éxito en la utilización de inóculos exógenos.....	26
Proporción de organismos cultivables (%) en distintos ambientes.....	28
Ventajas y limitaciones de los métodos dependientes de cultivo	29
Costes económicos en la remediación de suelos contaminados	36
Poder tampón para diferentes tipos de suelos	44

ÍNDICE DE GRAFICOS

Grafico	Página
Estructura química de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo	8
Estructura química de hidrocarburos aromáticos poli cíclicos.....	15
Reacciones iniciales del metabolismo aeróbico de los HAPs	22
Esquema de la disposición en el espacio de los agregados constituyentes de un suelo	30
Plano de ubicación del lugar de ejecución	46
Hidrocarburos presentes en el suelo a diferentes días de iniciado la biorremediación en la prueba control.	62
Hidrocarburos presentes en el suelo a diferentes días de iniciado la biorremediación en el tratamiento 1.	62
Hidrocarburos presentes en el suelo a diferentes días de iniciado la biorremediación en el tratamiento 2.	63
Hidrocarburos presentes en el suelo a diferentes días de iniciado la biorremediación en el tratamiento 3.	64

Degradación de hidrocarburos totales de petróleo a los 7 días de empezado la biorremediación.....	64
Degradación de hidrocarburos totales de petróleo a los 14 días de empezado la biorremediación.....	65
Lecturas del pH del medio del cultivo en el proceso de biorremediación de la prueba control.	68
lecturas del pH del medio del cultivo en el proceso de biorremediación del tratamiento 1.	69
Lecturas del pH del medio del cultivo en el proceso de biorremediación del tratamiento 2.	69
Lecturas del pH del medio del cultivo en el proceso de biorremediación del tratamiento 3.	70
Desarrollo de los microorganismos en el proceso de biorremediación de la prueba control.	70
Desarrollo de los microorganismos en el proceso de biorremediación del tratamiento 1.	71
Desarrollo de los microorganismos en el proceso de biorremediación del tratamiento 2.	72
Desarrollo de los microorganismos en el proceso de biorremediación del tratamiento 3.	72
Desarrollo de los microorganismos a los 7 días de empezado la biorremediación.	73

Desarrollo de los microorganismos a los 14 días de empezado la biorremediación.	73
Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación de la prueba control.	74
Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación del tratamiento 1. .	75
Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación del tratamiento 2. .	75
Lecturas de la temperatura en el proceso de biorremediación del tratamiento 3. .	76

ÍNDICE DE FOTOS

Foto	Página
Diluyentes para aislar microorganismos del suelo	97
Pipeteando los diluyentes para aislamiento de microorganismos del suelo	97
Preparación del medio BHI	98
Pesando el suelo para el aislamiento de microorganismos	98
Filtrando el suelo para poder hacer las diluciones	99
Aislamiento de microorganismos en placas	99
Crecimiento de microorganismos aislados del suelo contaminado	100
Preparación de medios para aislamiento individual de microorganismos	100
Microorganismos desarrollados en la placa	101
Sembrando los microorganismos individualmente en placas.....	101
Preparación de medios con el suelo contaminado en diferentes concentraciones	102
Desarrollo de microorganismos en diferentes concentraciones	102
Preparación de medio Müller	103

Aplicando la metodología soxhlet.....	103
Resultado de la extracción por reflujo soxhlet.....	104
Pesando la calcita para los tratamientos.....	104
Tratamiento 1	105
Aplicación de calcita al primer tratamiento	105
Tratamiento 2.....	106
Aplicación de la calcita al tratamiento 2	106
Tratamiento 3.....	107
Aplicación de calcita al tercer tratamiento	107
Biorreactores instalados.....	108
Biorreactores para microorganismos aeróbicos	108
Iniciando la recopilación de datos	109
Lectura de pH y temperatura del medio de cultivo	109
Muestreando del biorreactor para recuento de microorganismos	110
Medio play cont para recuento de microorganismos de los biorreactores	110
Muestreando de los biorreactores.....	111
Vaciando los recipientes para poder sacar el suelo para determinar hidrocarburos sobrantes	111
Recipientes vacíos listos para sacar el suelo y determinar la cantidad de hidrocarburos por método soxhlet.....	112
Placas con medios play cont e inóculos de medios de cultivo con microorganismos para su recuento	112
Suelos despues del proceso de biorremediación.....	113

Enfriando muestras para su posterior pesaje..... 113