

**EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN (ADICIÓN DE NUTRIENTES)
EN LA BIODEGRADACION DE TPHs EN UN SUELO CONTAMINADO
CON PETRÓLEO**

VICTORIA EUGENIA VALLEJO QUINTERO

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
2004

**EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN (ADICIÓN DE NUTRIENTES)
EN LA BIODEGRADACION DE TPHs EN UN SUELO CONTAMINADO
CON PETRÓLEO**

VICTORIA EUGENIA VALLEJO QUINTERO

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al titulo de

MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

PROGRAMA DE POSGRADOS

MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA

Bogotá, D.C.

2004

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución No. 13 de julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN (ADICIÓN DE NUTRIENTES)
EN LA BIODEGRADACIÓN DE TPHs EN UN SUELO CONTAMINADO
CON PETRÓLEO**

VICTORIA EUGENIA VALLEJO QUINTERO

APROBADO

Fabio Roldán, Ph.D.
Microbiólogo
Director

Ziv Arbeli, Candidato a Ph.D.
Biólogo
Jurado

Balkis Quevedo, MSc.
Ingeniera Química
Jurado

Lucía Ana Díaz, MSc.
Microbióloga
Jurado

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGIA
Bogotá, D.C.
2004

**EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN (ADICIÓN DE NUTRIENTES)
EN LA BIODEGRADACIÓN DE TPHs EN UN SUELO CONTAMINADO
CON PETRÓLEO**

VICTORIA EUGENIA VALLEJO QUINTERO

APROBADO

Dr. Carlos Corredor Pereira
Director de Posgrados
Facultad de Ciencias

Dra. Angela Umaña
Decana Académica
Facultad de Ciencias

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE POSGRADOS
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA
Bogotá, D.C.
2004

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ), por su apoyo logístico y su colaboración en la realización de esta investigación. A mi director de tesis Fabio Roldán, por su constante orientación científica en el manejo de este proyecto, por toda su paciencia y por contribuir en mi formación profesional. A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en el desarrollo de esta investigación y en especial a Laura Salgado; a mis compañeros y amigos que estuvieron siempre a mi lado dándome ánimo para no decaer.

A Dios por darme su fortaleza y sabiduría; a mis padres, gracias por la vida,
por su apoyo único e incondicional, gracias por ayudarme a culminar una
etapa más de mi vida; a Carolina mi hermana por compartir conmigo todas
mis alegrías y adversidades, los amo.

A toda mi familia, y en especial a mis abuelos, por confiar una vez más en
mí y brindarme todo el amor y la ternura.

Victoria Eugenia.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS	V
DEDICATORIA	VI
TABLA DE CONTENIDO	VII
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ANEXOS	XVI
RESUMEN	XVIII
ABSTRACT	XIX
1 INTRODUCCIÓN	1
2 MARCO TEORICO Y REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	5
2.1 Petróleo	5
2.1.1 Composición química	5
2.1.2 Impacto del proceso de intemperización (<i>wheathering</i>) sobre la composición química de los TPHs	7
2.2 Procesos de atenuación natural (AN)	8
2.3 Biodegradación de TPHs	9
2.4 Contaminación de ambientes por TPHs	11
2.4.1 Contaminacion de suelos por TPHs	13
2.4.2 Estadísticas de atentados contra la infraestructura petrolera en Colombia	15
2.5 Remediación de suelos contaminados con TPHs	18
2.5.1 Tratamientos físicos	18
2.5.2 Tratamientos químicos	19
2.5.3 Tratamientos biológicos	19
2.6 Biorremediación de ambientes contaminados por TPHs	20
2.6.1 Factores que afectan el proceso de biorremediación	20

2.6.1.1	Temperatura	21
2.6.1.2	pH	22
2.6.1.3	Aceptores de electrones	23
2.6.1.4	Nutrientes	24
2.6.1.5	Humedad	29
2.6.1.6	Estructura y tipo de suelo	30
2.6.1.7	Presencia de microorganismos	31
2.7	Técnicas de biorremediación de suelos contaminados con HCs	32
2.7.1	Bioaumentación	33
2.7.2	Bioestimulación	33
2.7.3	Bioventilación	34
2.7.4	Biolabranza	35
2.8	Métodos empleados para el monitoreo de los procesos de biorremediación de TPHs	36
2.8.1	Recuento en placa de microorganismos	36
2.8.2	Técnica del número más probable (NMP)	37
2.8.3	Cuantificación de TPHs en suelos	39
2.8.3.1	Determinación de TPHs	39
3	JUSTIFICACIÓN	45
4	OBJETIVOS	49
4.1	Objetivo General	49
4.2	Objetivos específicos	49
5	MATERIALES Y MÉTODOS	50
5.1	Localización del área de estudio	50
5.2	Descripción y recolección del suelo	51
5.2.1	Preparación de la mezcla suelo: petróleo	53
5.2.2	Montaje de los mesocosmos	54
5.3	Evaluación de las condiciones iniciales del estudio	55
5.4	Diseño experimental	56
5.5	Descripción de los tratamientos	57
5.5.1	Control absoluto (abiótico)	58
5.5.2	Control relativo	58
5.5.3	Adición del FIC	58
5.5.4	Adición de SIS	59
5.6	Aireación de los mesocosmos	60

5.7	Seguimiento fisicoquímico y microbiológico de los tratamientos	61
5.7.1	Recolección y manipulación de muestras	61
5.8	Métodos empleados para el análisis y determinación de TPHs en suelos	63
5.8.1	Método D-5831(ASTM, 1995) para la determinación de combustibles en suelos	64
5.8.2	Método EAMG (Schawab <i>et al.</i> , 1999; EPA, 1994) para la determinación de TPHs en suelos	67
5.9	Análisis de nutrientes	70
5.9.1	Análisis de nitratos (N-NO ₃ ⁻)	70
5.9.2	Determinación de amonio (N-NH ₄ ⁺)	73
5.9.3	Determinación de fósforo (P)	74
5.10	Análisis microbiológicos	75
5.10.1	Preparación y homogenización de las diluciones	75
5.10.2	Recuento en superficie de microorganismos heterótrofos en placa	76
5.10.3	Determinación de microorganismos degradadores de HCs en placas de 96 pozos por la técnica de NMP	77
5.10.4	Aislamiento e identificación de microorganismos degradadores	78
5.10.4.1	Preservación de las cepas degradadoras de HCs	80
5.11	Análisis estadístico	80
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
6.1	Análisis preliminares del suelo	82
6.2	Análisis preliminares a la mezcla suelo:petróleo	83
6.3	Evaluación de los controles de calidad de los 2 métodos analíticos empleados para el análisis de TPHs	84
6.3.1	Método D-5831 para determinación de combustibles en suelos (ASTM, 1995)	85
6.3.2	Método de EAGM (Schawab <i>et al.</i> , 1999; EPA, 1994)	90
6.3.3	Comparación de los 2 métodos analíticos para determinación de TPHs	95
6.4	Biodegradación de TPHs	97
6.4.1	Evaluación de TPHs por los 2 métodos analíticos	97
6.5	Análisis de pH	108
6.5.1	Análisis de Humedad	114
6.5.2	Análisis de nitratos y amonio	116

6.5.3	Análisis de Fósforo (P)	123
6.6	Seguimiento microbiológico del proceso de biorremediación	126
6.6.1	Recuentos preliminares de heterótrofos totales en el suelo sin contaminar	126
6.6.2	Recuento de microorganismos heterótrofos totales en el estudio	126
6.6.3	Recuento de microorganismos degradadores de HCs en placas de 96 pozos por la técnica del NMP	131
6.6.3.1	Caracterización de microorganismos degradadores de HCs por medio de paneles bioquímicos	137
6.7	Análisis de correlaciones	140
7	CONCLUSIONES	143
8	RECOMENDACIONES	144
9	BIBLIOGRAFÍA	145

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Límites permisibles de TPHs en algunas entidades de U.S	13
Tabla 2. Estadísticas de los atentados contra los oleoductos en Colombia entre 1986-1998	17
Tabla 3. Estadísticas por atentados al oleoducto Caño Limón–Coveñas Periodo 1989-2001	17
Tabla 4. Relaciones empleadas de C:N:P durante los procesos de biorremediación de HCs	26
Tabla 5. Composición porcentual media de fertilizantes químicos nitrogenados	27
Tabla 6. Ventajas y desventajas de la biolabranza.	36
Tabla 7. Ventajas y desventajas del proceso de extracción por Soxhlet y determinación gravimétrica, método 9071 (EPA, 1994).	42
Tabla 8. Ventajas y desventajas del proceso de extracción por AM (<i>shaking</i> y <i>vortex</i>).....	43
Tabla 9. Caracterización inicial del suelo sin HC utilizado durante el estudio.	52
Tabla 10. Eventos y días de muestreo durante el estudio.....	57
Tabla 11. Composición de los tratamientos utilizados durante la bioestimulación.....	60
Tabla 12. Métodos de análisis físico-químicos realizados durante el estudio	63
Tabla 13. Análisis microbiológicos en suelo determinados durante el estudio	63
Tabla 14. Caracterización físico-química y granulométrica del suelo empleado en el estudio y comparación estadística IGAC-USBA (n=3).	83
Tabla 15. Caracterización de la mezcla suelo: petróleo empleados para los cálculos de C:N:P.(n=3).....	84
Tabla 16. Comparación estadística de los %CV y %P entre los métodos analíticos para determinación de TPHs.....	96

Tabla 17. Concentraciones de TPHs obtenidas en la mezcla suelo.petróleo por los 2 laboratorios, métodos (IR, ASTM, EAMG) (n=3).....	97
Tabla 18. Tasas de degradación (mg/Kg _{ps} /día) obtenidas por los 2 métodos analíticos durante los primeros 28 días	98
Tabla 19. Porcentajes de remoción de TPHs obtenidos por la tecnica D-5831 (ASTM, 1995) durante el estudio.....	102
Tabla 20. Porcentajes de remoción de TPHs obtenidos por la tecnica de EAGM (Schawab <i>et al.</i> , 1999; EPA, 1994) durante el estudio.	103
Tabla 21. Caracterización macro y microscópica de las cepas seleccionadas degradadoras de HCs.....	137
Tabla 23. Análisis de correlación de variables evaluadas durante los días de estudio	142

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Proceso de tamizaje del suelo por medio de costales de fique, para el ensamblaje de los mesocosmos.....	54
Figura 2. Distribución de los mesocosmos en el invernadero. Facultad de Ciencias-PUJ.....	55
Figura 3. Proceso de volteo manual realizado en los mesocosmos.....	61
Figura 4. Cuadrícula de muestreo utilizada en los mesocosmos.....	62
Figura 5. Muestreo de los mesocosmos.....	62
Figura 6. Proceso de extracción de TPHs del suelo contaminado, por el método de EAMG (Schawab <i>et al.</i> , 1999; EPA, 1994).....	69
Figura 7. Proceso de extracción en suelos para determinación de nitratos y amonio (HACH, 1994).	71
Figura 8. Determinación de nitrato en muestras de suelo empleando el método No 366 ($\lambda=500\text{nm}$) (HACH, 1994).	72
Figura 9. Colonias de microorganismos heterótrofos en AIS.	76
Figura 10. Método de NMP para la determinación de microorganismos degradadores de HCs en placas de 96 pozos.....	78
Figura 11. Crecimiento de bacterias degradadoras de HCs en agar nutritivo; antes de su identificación bioquímica.	80
Figura 12. Curvas de calibración realizadas para el método D-5831 (ASTM, 1995).	86
Figura 13. % de recuperación obtenidos por la técnica D-5831 (ASTM, 1995) durante el estudio. Se observa los % de P entre el rango del 80-120%.	89
Figura 14. Porcentajes de recuperación (%P) obtenidos por la técnica de EAMG (Schawab <i>et al.</i> , 1999; EPA, 1994) durante el estudio. Se observa los % de P entre el rango del 75-115%.....	94
Figura 15. Concentraciones de TPHs durante el estudio por la técnica D-5831 (ASTM, 1995). Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y la DS=1.	99

Figura 16. Concentraciones de TPHs durante el estudio por el método de EAMG (Schawab <i>et al.</i> , 1999; EPA, 1994). Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y la DS=1.....	99
Figura 17. Concentración de TPHs en los primeros 28 días por el método D-5831 (ASTM; 1995). Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6).....	100
Figura 18. Concentración de TPHs en los primeros 28 días por el método EAMG (Schawab <i>et al.</i> , 1999; EPA, 1994). Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6).	100
Figura 19. Valores de pH durante el estudio. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error =1 DS.	110
Figura 20. Valores de porcentajes de humedad. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error =1 DS.	116
Figura 21. Concentración de nitrato durante el estudio. Se muestra el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error =1 DS. Las flechas indican la adición de nutrientes.	118
Figura 22. Concentración de amonio durante el estudio. Se muestra el valor promedio de 6 datos (n=6), y las barras de error =1 DS. Las flechas indican la adición de nutrientes.	119
Figura 23. Comportamiento de los nutrientes y pH en el tratamiento con SIS durante el estudio. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error=1DS.	120
Figura 24. Comportamiento de los nutrientes y pH en el tratamiento con FIC durante el estudio. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error=1DS.	121
Figura 25. Valores de fósforo (P) durante el estudio. Se presenta el valor promedio de 6 datos por tratamiento (n=6), barras de error = 1DS.	125
Figura 26. Recuento de microorganismos heterótrofos durante el estudio. Se muestra el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error=1DS.	128

Figura 27. Relación de heterótrofos y degradadores de HCs durante el estudio. Se muestra el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error=1DS..... 130

Figura 28. Recuento de microorganismos degradadores de HCs en placas de 96 pozos por la técnica del NMP. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error=1DS. 133

LISTA DE ANEXOS

- ANEXO A.** Cálculos para realizar la contaminación del suelo a una concentración de 20,000 mg/Kg_{ps}
- ANEXO B.** Cálculos realizados para determinar la humedad requerida por mesocosmo
- ANEXO C.** Esterilización de suelos utilizando BASAMID® Granular (Hoja de seguridad)
- ANEXO D.** Cálculos realizados para la adición del Basamid®
- ANEXO E.** Composición del FIC (NPK) (15:15:15).
- ANEXO F.** Cálculos realizados para la adición de las FIC (C:N:P, 100:10:1)
- ANEXO G.** Cálculos realizados para la adición de las SIS (C:N:P, 100:10:1)
- ANEXO H.** Técnicas para la determinación de las concentraciones de nutrientes en suelos (HACH, 1994).
- ANEXO I.** Preparación de las soluciones estándar de nutrientes (nitratos, amonio y fósforo) (Standard Methods, 1995)
- ANEXO J.** Agar infusión suelo (American Society for Microbiology) (ASM, 1986)
- ANEXO K.** Agua Bufferada (Standard Methods, 1995)
- ANEXO L.** Caldo Bushnell- Hass (BH) (Wrenn y Venosa, 1995; Brown y Braddock, 1990).
- ANEXO M.** Solución de violeta Iodonitrotetrazolium (INT).
- ANEXO N.** Recuento de NMP con MPN calculator, versión 4.04, EPA, 1996
- ANEXO O.** BD Sistemas BBL CRYSTAL de identificación para microorganismos gram negativos
- ANEXO P.** Niveles de detección para el método D-5831 (ASTM, 1995).
- ANEXO Q.** Niveles de detección para el método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994).
- ANEXO R.** Tablas de Resultados
- ANEXO S.** Análisis estadístico
- ANEXO T.** Determinación de humedad (IGAC, 1994)
- ANEXO U.** Determinación de pH (EPA 9045c).

ANEXO V. Datos crudos de todas las variables evaluadas durante los 5 EM

RESUMEN

El presente estudio se evaluó el efecto del proceso de bioestimulación en forma de sales inorgánicas simples (SIS) y fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC) en la remediación de un suelo contaminado con petróleo. Se utilizaron mesocosmos como unidades experimentales (UEs) para simular la técnica de biolabranza en laboratorio. El suelo fue contaminado con crudo a una concentración $\sim 20,000$ mgTPH/Kg_{ps}. Se evaluaron 2 tratamientos (SIS y FIC) y 2 controles (control relativo y control abiótico); cada tratamiento se hizo por triplicado (n=3). Se realizaron 5 eventos de muestreo durante 127 d. Se realizó un seguimiento de parámetros fisicoquímicos: pH, porcentaje de humedad, nutrientes y microbiológicos: recuento en placa de heterótrofos y degradadores de HCs por la técnica del número más probable (NMP-INT) y caracterización bioquímica de los degradadores de HCs. Se evaluaron y compararon 2 métodos analíticos para la cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs). Aunque no hubo diferencias significativas en las concentraciones de TPHs a través del tiempo entre los tratamientos y el control relativo; las SIS mostraron un mayor porcentaje de remoción de TPHs: 41% por el método de EAMG, y 39% por el método D-5831 (ASTM 1995). El bajo número de degradadores ($\sim 1 \times 10^3$ NMP/g_{ps}) y el bajo pH (~ 4.1) que se presentó en los tratamientos fueron los factores limitantes durante el proceso de biodegradación. Los bajos recuentos de degradadores ($\sim 1 \times 10^3$ NMP/g_{ps}) y los bajos valores de pH (~ 4.1) que se presentaron en los tratamientos pudieron ser los factores limitantes durante el proceso de biodegradación. Los 2 métodos evaluados para la determinación de TPHs resultaron ser efectivos para llevar a cabo el seguimiento del proceso de biodegradación de HCs en suelos.

ABSTRACT

The present study evaluated the effect of bioestimulation process by using the amendment of inorganic simple fertilizer (SIS) and inorganic compound fertilizers (FIC) during the bioremediation of a contaminated soil. They were in use mesocosmos as experimental units (UEs) for simulating the technology of landfarming. The soil was contaminated to a concentration 20,000 mgTPH/Kg_{ps}. There were evaluated 2 treatments (SIS and FIC) and 2 controls (relative control and control abiotic); every treatment was done by triplicate (n=3). 5 events of sampling were realized during 127 d. There was realized a follow-up of physicochemical parameters: pH, % of dampness, nutrients and microbiological: recount in plate of heterotrophs and number of hydrocarbon-utilizing microorganisms for the technique of the most probable number (NMP-INT) and biochemical characterization of oil utilizing bacteria. Two analytical methods were evaluated and compared for the quantification of total hydrocarbons of oil (TPHs). Though there were no significant differences in TPHs concentrations across the time between the treatments and the relative control; the SIS showed a major percentage of TPHs' removal: 41 % for EAMG method, and 39 % for the method D-5831 (ASTM 1995). The low number of hydrocarbon-utilizing microorganisms ($\sim 1 \times 10^3$ NMP/g_{ps}) and under pH (~ 4.1) that appeared in the treatments was the factors limit during the process of biodegradation. Both methods for TPHs determination turned out to be effective to carry out the follow-up of the process of biodegradation of HCs in soils.

1 INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas de contaminación ambiental más importante a nivel mundial es el vertido de hidrocarburos totales de petróleo (TPHs) en ecosistemas acuáticos y terrestres. La mayor contaminación por TPHs, es ocasionada durante los procesos de embarque y desembarque de crudo en los puertos, operaciones de prospección, actividades de extracción, transporte, almacenamiento y refinamiento de petróleo.

En Colombia, además de las fuentes accidentales de contaminación mencionadas anteriormente; existe la contaminación causada por los derrames intencionales de tuberías de conducción de petróleo, a raíz de la voladura de estas por acción de grupos al margen de la ley. De la misma forma, la explotación petrolera y los procesos involucrados a esta actividad, han generado un incremento en la contaminación por el vertimiento de petróleo y la disposición de residuos en los ecosistemas. Por esta razón, en la actualidad se hace necesaria la búsqueda y aplicación de tratamientos químicos, físicos y biológicos que permitan eliminar o reducir las concentraciones de TPHs de de una manera controlada, económica, y eficiente.

Actualmente, los procesos físicos y químicos más empleados en el tratamiento y limpieza de suelos contaminados con TPHs son: el lavado del suelo, la excavación y la desorción térmica; seguidos de la transferencia del agua o del suelo a lugares adecuados para su almacenamiento (p.e., rellenos sanitarios) o bien para su incineración. Estas tecnologías aunque

permiten el tratamiento de los suelos durante un corto periodo de tiempo, transfieren el contaminante de un sitio a otro y resultan además, muy costosas e ineficientes para tratar mezclas complejas de contaminantes.

El uso progresivo e interés de la biorremediación en condiciones de laboratorio y campo están enfocados a la necesidad de remediar áreas contaminadas con TPHs, con el fin de remover tales compuestos de una manera controlada y eficiente. La efectividad de este proceso para eliminar TPHs de diferentes ecosistemas ha sido ampliamente demostrada en los últimos años, después de considerables derrames de crudo en suelos y mares (Lindstrom *et al.*, 1991; Bragg *et al.*, 1994; Townsend *et al.*, 2000; Marguessin *et al.*, 2003).

Después de un derrame de TPHs se observa una elevada concentración de carbono; por tal motivo los microorganismos presentan carencias de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) y requieren la adición de estos macroelementos en el ambiente contaminado; con el fin de lograr una degradación rápida y eficaz del contaminante por medio de la técnica de biolabranza. La biolabranza, ofrece una solución a bajo costo y alta efectividad para la biorremediación de suelos contaminados con TPHs. Adicionalmente, estimula y mantiene una población microbiana aeróbica, la cual se encarga de metabolizar estos compuestos utilizándolos como su fuente de energía y carbono. Así mismo, estos procesos de bioestimulación, permiten acelerar las tasas de biodegradación, al suministrar factores limitantes (p.e., nutrientes y aceptores de electrones: AE) que afectan la velocidad de crecimiento microbiano y su metabolismo.

La adición de fertilizantes para suplir las necesidades de N y P en diferentes ecosistemas contaminados con TPHs, ha sido ampliamente usada desde los años 70s demostrando altos rendimientos en la remoción del material contaminado (Reynolds *et al.*, 1997; Marguessin y Shinner, 1997, a, b, c; Marguessin *et al.*, 2000; Cleves y Sandoval, 2001; Yerushalmi *et al.*, 2003). Entre los fertilizantes más empleados en procesos de biorremediación de suelos contaminados con TPHs se encuentran: la urea, fosfatos, sales inorgánicas simples (SIS) y fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC) tipo NPK (triple quince) (Dibble y Bartha, 1979; Marguesin *et al.*, 2000; Cunningham y Philp, 2000; Brook *et al.*, 2001).

La determinación de las concentraciones de TPHs en suelos es una de las herramientas más importantes para realizar un seguimiento adecuado del proceso de biorremediación. Actualmente existen numerosos métodos para su extracción (p.e., Soxhlet, agitación mecánica: AM, sonicación, extracción con vapor) y determinación (p.e., gravimetría, espectrofotometría, cromatografía de gases, inmunoensayos); la mayoría de ellos requieren de largos procesos de extracción, grandes volúmenes de solventes, equipos especializados y materiales sumamente costosos. Por este motivo, resulta de gran importancia evaluar y estandarizar métodos económicos, rápidos y confiables (precisión y exactitud) para la determinación de TPHs. Durante este estudio se evaluó y comparó la técnica de extracción por agitación mecánica y determinación gravimétrica (EAMG) (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) y el método D-5831 (ASTM)

para la determinación de combustibles en suelos como una herramienta para el seguimiento de procesos de biorremediación de HC's en suelos.

La Unidad de Biotecnología y Saneamiento Ambiental (USBA) de la Pontificia Universidad Javeriana (PUJ) ha realizado estudios sobre la biodegradación de lodos contaminados provenientes de la industria del petróleo en Campo Dina, (Huila, Colombia), así como la evaluación de la AN de HC's en suelos contaminados con lodos aceitosos (Cleves y Sandoval, 2001; Maldonado, 2004). Estos trabajos mostraron la importancia de diversos factores ambientales (p.e., humedad, pH, temperatura, nutrientes y número de microorganismos presentes, los cuales tienen un efecto significativo sobre los procesos de remediación en suelos contaminados con TPHs.

Esta propuesta de investigación se realizó bajo condiciones controladas de laboratorio, utilizando mesocosmos como unidades experimentales (UEs) localizadas en el invernadero de la PUJ para simular la técnica de biolabranza. El estudio fue desarrollado en el laboratorio de USBA, Departamento de Biología de la PUJ, con la financiación de la Vicerrectoría Académica de la Universidad (No proyecto 1824).

2 MARCO TEORICO Y REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Petróleo

El petróleo es un producto natural originado por la transformación anaeróbica de la biomasa en condiciones de temperatura y presión elevadas (Atlas y Bartha, 2001). El petróleo es un compuesto que varía mucho en su composición, pues ésta depende del tipo de yacimiento de donde provenga y su situación geográfica (Eweis *et al.*, 1999). Pero en general se considera que contiene ~85% de carbono y ~15% de hidrógeno, además de tener pequeñas cantidades de azufre, oxígeno, nitrógeno, y trazas de metales como hierro, cromo, níquel y vanadio (Speight, 1991; Ramírez y Viña, 1998; Serrano, 1999).

Los Hidrocarburos (HCs) de petróleo son esencialmente compuestos que contienen átomos de carbono e hidrógeno, los cuales tienen variadas estructuras y configuraciones, según la manera como se encuentren unidos sus átomos, y el número y ubicación de estos en la molécula (Potter y Simmons, 1998). Al petróleo se le atribuye un gran valor mineral, siendo susceptible de generar a través de procesos de transformación industrial una gran variedad de productos de alto valor comercial tales como combustibles (p.e., diesel, gasolina, ACPM, kerosene), lubricantes, ceras, solventes y derivados petroquímicos (Weisman, 1998; Serrano, 1999).

2.1.1 Composición química

Los HCs de petróleo conforman una gran familia conocida como TPHs, la cual corresponde a la mezcla de todas las fracciones del crudo (grasas o aceites). El término de TPHs se utiliza para describir el conjunto

de compuestos químicos que provienen del crudo del petróleo, ya que este tiene una composición heterogénea y muchas veces puede no ser práctico realizar mediciones de cada compuesto por separado (Weisman, 1998; Zhu *et al.*, 2001; ASTDR, 2003).

De manera general los TPHs pueden clasificarse en 2 grandes familias: alifáticos y aromáticos (Potter y Simmons, 1998). Los HCs alifáticos presentan cadenas lineales o ramificadas y se diferencian en el tipo de enlace que presentan entre carbonos: alcanos o saturados (enlaces sencillos), alquenos y alquinos o no saturados (enlaces dobles y triples, respectivamente). Dentro de los alifáticos encontramos los cicloalcanos los cuales tienen estructuras ramificadas o cíclicas, como los naftenos o las cicloparafinas (Baird, 2001). Los HCs aromáticos son aquellos que tienen uno o múltiples anillos de benceno, estos últimos conocidos como poliaromáticos, HCs policíclicos aromáticos o PAHs. Los PAHs están presentes en todos los ambientes y son considerados por la EPA como de toxicidad crónica y aguda, mutagénicos y cancerígenos (EPA, 2002). Debido a su solubilidad estos compuestos son recalcitrantes y bioacumulables en aguas subterráneas y columna de suelo (Potter y Simons, 1998; Gary y Duffi, 2000).

Cada uno de los grupos de HCs presentan propiedades físicas (p.e., densidad, viscosidad, punto de ebullición y solubilidad en agua) y químicas diferentes (p.e., reacciones de isomerización, reacciones de hidrogenación, halogenación, hidrohalogenación e hidratación) (Baird, 2001; Zhu *et al.*, 2001). Al calentarse el petróleo, los compuestos ligeros (de estructura

sencilla y bajo peso molecular) se evaporan, de tal manera que a medida que aumenta la temperatura, los componentes más pesados van incorporándose a la fase de vapor (PEMEX, 2000). La evaporación es un proceso en el cual, las corrientes de aire volatilizan los HC's de peso molecular más bajo reduciendo su concentración y aumentando la degradación de los HCs, incrementando el contacto con el microorganismo (EPA, 1999a); ~ el 50% de los HCs más tóxicos se pierden en el ambiente por medio de este proceso (Townsend *et al.*, 2000). El Instituto Americano de petróleo (API) clasifica el petróleo de acuerdo a su densidad API, parámetro que define que tan pesado es un HC: mientras más liviano, mayor es el porcentaje de HCs livianos que contiene, y mayor es su valor comercial (Serrano, 1999; Enger y Smith, 2000).

2.1.2 Impacto del proceso de intemperización (*weathering*) sobre la composición química de los TPHs

Una vez que el petróleo se encuentra en el medio ambiente ocurren una gran variedad de cambios físicos, químicos y biológicos, los cuales son conocidos como procesos de intemperización o *weathering* (Atlas, 1978). Generalmente, la intemperización es definida como el efecto que tiene el medio ambiente sobre la concentración de los HCs (p.e., volatilización de los HCs de bajo peso molecular y altamente tóxicos) en las primeras 72 horas (Speight, 1991; Weisman, 1998).

El proceso de intemperización afecta a diferentes familias de HCs (Zhu *et al.*, 2001). Por ejemplo, los HCs aromáticos tienden a ser más

solubles que los alifáticos, mientras que los alifáticos tienden a ser más volátiles (Weisman, 1998). La solubilidad y la volatilidad de todos los componentes presentes en el petróleo generalmente decrecen al incrementar su peso molecular. En general, la mayoría de compuestos solubles y volátiles se pierden más rápidamente del suelo contaminado. Los alcanos tienden a ser mas volátiles que los aromáticos y esta tendencia varía de la siguiente forma alcanos>alquenos>aromaticos=cicloalacanos (Potter y Simmons, 1998).

2.2 Procesos de atenuación natural (AN)

La atenuación natural (AN) comprende una gran variedad de procesos físicos, químicos y biológicos que bajo las condiciones necesarias, reducen la masa, toxicidad, movilidad, volumen y concentración de un contaminante en el ambiente. Estos procesos incluyen la lixiviación, dispersión, dilución, volatilización, absorción, adsorción, degradación por UV, estabilización química o biológica, y la biodegradación (Atlas, 1981; Atlas y Bartha, 1988, Ritmman y Mac Carty, 2001). En la naturaleza los contaminantes a menudo desaparecen o disminuyen sus concentraciones debido a algunos de estos procesos, que en ocasiones, pueden resultar difíciles de caracterizar. La AN bajo ciertos parámetros contribuye significativamente a la remediación de TPHs, a un bajo costo, pero durante un periodo mayor de tiempo (Hamme *et al.*, 2003).

La evaluación o monitoreo de los procesos de AN (MAN) requieren un conocimiento detallado del área de estudio, las condiciones que están

asociadas con la actividad microbiana (p.e., presencia de AE, donadores de electrones (DE), nutrientes, pH, humedad y temperatura), y el efecto de cualquier otro proceso que pueda estar reduciendo las concentraciones de los TPHs del medio ambiente (EPA, 1998 1999a; Ritmman y Mc Carty, 2001). El MAN se entiende como la evaluación de los procesos naturales que actúan sobre áreas contaminadas (EPA, 1998, 1999a;b; WDNR, 1999).

2.3 Biodegradación de TPHs

Los microorganismos degradadores de HCs están presentes en casi todos los ambientes; dada la amplia distribución de estos microorganismos, generalmente se evita la necesidad de adicionar microorganismos para obtener una biodegradación (EPA, 1999a; Marguesin *et al.*, 2003a). La biodegradación es el resultado de la utilización biológica de los HCs, debido a la acción de los microorganismos en el uso como fuente de energía y carbono de algunas fracciones de los HCs para su metabolismo, obteniendo compuestos menos complejos y menos tóxicos (Leahy y Colwell, 1990; Ramírez y Viña, 1998; Ercoli *et al.*, 2001; Kao y Wang, 2001). El objetivo final de la biodegradación es llegar a la completa mineralización del HC (agua y dióxido de carbono o metano, de acuerdo a las condiciones aerobias o anaerobias) (EPA, 1999a; WDNR, 1999).

La susceptibilidad de los HCs a la degradación varía de acuerdo al tipo y tamaño de la molécula, p.e., los n- alcanos y n-alquilaromáticos, entre C₁₀ y C₂₂ son generalmente considerados los menos tóxicos y los más biodegradables. Los compuestos en el intervalo de C₅ y C₉ pueden

presentar toxicidad de tipo solvente a la membrana de los microorganismos; sin embargo, a bajas concentraciones son biodegradables. Los alcanos, alquilaromáticos y aromáticos por encima de C₂₂ presentan baja toxicidad, pero sus características físicas, incluyendo su baja solubilidad en agua, desfavorecen su biodegradación (Ordoñez, 1998). En general las ramificaciones en las moléculas de los HCs presentan una menor biodegradación, así como los compuestos aromáticos y los alicíclicos aromáticos (PAHs) (Gaudy y Gaudy, 1980; Atlas y Bartha, 1987; Potter y Simmons, 1998; Weisman, 1998).

Los principales componentes del petróleo como los alifáticos y aromáticos pueden llegar a ser completamente degradados si las condiciones ambientales necesarias están presentes. Algunos compuestos aromáticos como los PAHs, son considerados por la EPA como de toxicidad crónica y aguda, mutagénicos y cancerígenos. Debido a su elevada solubilidad, estos compuestos son recalcitrantes y se acumulan en aguas subterráneas y en la matriz del suelo (Gustafson, 1998; Potter y Simmons, 1998). Los PAHs son biodegradables en condiciones aerobias y anaerobias; los compuestos de 2 a 4 anillos son fácilmente degradados por los microorganismos, y aquellos que contienen mayor cantidad de anillos (>4) y que posean un gran número de sustituyentes alquilo son resistentes a la biodegradación, debido a su complejidad y baja solubilidad (p.e., benzopireno y benzoantraceno) (Levin y Gealt, 1997; Ordoñez, 1998).

2.4 Contaminación de ambientes por TPHs

Aproximadamente 2 millones/ m³ de petróleo son producidos por año en todo el mundo (Atlas y Bartha, 2001); y una gran cantidad de sus productos finales contaminan ambientes marinos y terrestres (EPA, 2002). Las pequeñas descargas de bajo nivel (escorrentias urbanas, efluentes, recambio de aceites, etc) contabilizan ~90 % de los TPHs que se descargan en el ambiente; algunos accidentales tales como: derrame de tanques, ruptura de tuberías y extracción de pozos contabilizan ~10% de estas descargas (Levin y Gealt, 1997, Atlas y Bartha, 2001; Hamme *et al.*, 2003). La mayor parte de TPHs que contaminan el medio ambiente ingresan a través de operaciones industriales, como las emisiones, fugas y derrames accidentales, descargas de efluentes y residuos (Sánchez *et al.*, 1998); otra parte de los HCs se vierten a los ecosistemas como consecuencia de diversas actividades de rutina como la extracción, transporte, almacenamiento, refinamiento y distribución de crudo en los puertos (Eweis *et al.*, 1999; Rittman y Mc Carty, 2001).

Actualmente en nuestro país no existe una legislación ambiental en materia de HCs, en donde se establezcan los límites permisibles de TPHs en el ambiente (suelo, agua y aire), por lo que se ha recurrido a referencias de organismos internacionales (Canadá, países bajos y Estados Unidos (US). En US cada estado ha desarrollado sus propios límites permisibles, los cuales han sido definidos de acuerdo a una evaluación de riesgo (Saval, 1995; EPA, 2000) (Tabla 1).

En Colombia se han manejado criterios de remediación desarrollados por el Ministerio del Medio Ambiente, con el objeto de proteger el ambiente, preservar y restaurar los ecosistemas, con el fin de evitar o reducir al mínimo el efecto negativo que ocasionan los diferentes contaminantes (p.e., TPHs, residuos de petróleo) sobre el ecosistema (<http://www.ideam.gov.co/legal/decretos/1990/d1753-1994.htm>). Así mismo, se han desarrollado investigaciones en el área de biorremediación de TPHs en suelos, con la colaboración de multinacionales petroleras como Occidental de Colombia (OXY) y Nacionales: Instituto Colombiano de Petróleo (IPC) (Vives, 1994; Quijano y Quiza, 2000; Cleves y sandoval, 2001; Espitia, 2002; Roldán, 2002, Maldonado, 2004). Adicionalmente, la documentación existente hace referencia al manejo de residuos petroleros y guías ambientales en el área de exploración, transporte de ductos, obras hidráulicas, estaciones de bombeo, guías de campo y demás actividades petroleras y no hay una legislación específica para estas industrias y sus residuos.

Tabla 1. Límites permisibles de TPHs en algunas entidades de U.S

Estado	Tipo de contaminante	Parámetro e indicador	Límite permisible	Metodo
Alabama	Gasolina Diesel Aceite gastado	TPH	Suelo: 100 mg/Kg.	EPA 9071, EPA 418.1
Arizona	Gasolina	TPH	Agua subterránea: 1µg/L	EPA 418.1
Arkansas	Gasolina Diesel Aceite gastado	TPH	Suelo: 100-1000 mg/Kg	EPA 418.1 EPA 8015M
Delaware	Gasolina Diesel	TPH	Suelo: 100 mg/Kg	EPA 9071 EPA 8015M
Florida	Diesel	Naftalenos	Agua subterránea: 100µg/L	EPA 610
Georgia	Gasolina Diesel Aceite gastado	TPH	Suelo: 100-500 mg/Kg	EPA 9015
	Diesel	Benzo(a)pireno	Agua subterránea: 0.03-0.2 µg/L	EPA 550
Missouri	Gasolina	TPH	Suelo: 50-100 mg/Kg	EPA 9071
Nevada	Gasolina Diesel	TPH	Suelo: 100 mg/Kg	EPA 8015

Fuente: EPA, 1983; PEMEX, 2002.

2.4.1 Contaminación de suelos por TPHs

El suelo y el subsuelo constituyen un recurso natural difícilmente renovable que desempeña diversas funciones; actuando como un medio filtrante durante la recarga del manto acuífero y la protección de los mismos. El suelo constituye un lugar en donde se llevan a cabo los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos y las redes tróficas (Gary y Duffy, 2000). Adicionalmente, en el suelo se realizan diversas actividades agrícolas, ganaderas, sirviendo de soporte a la vegetación; convirtiéndose de esta

manera en un ecosistema altamente vulnerable a la contaminación por TPHs, por lo cual resulta de suma importancia su conservación y remediación de suelos contaminados (EPA, 2003).

La actividad petrolera y derrames accidentales de crudo generan impactos potencialmente negativos en el suelo, además de una pérdida de la biodiversidad y posible contaminación de aguas subterráneas por lixiviación (ECOPETROL, 2001). Así mismo, algunas de las propiedades químicas del suelo que más se afectan después de un derrame de HCs son: aumento del carbono orgánico, ya que el 75% del carbono del petróleo crudo es oxidable, disminución del pH, debido a la acumulación de carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos, aumento del manganeso y del hierro intercambiable y aumento del fósforo disponible (Levin y Gealt, 1997; Ercoli *et al.*, 2001). Probablemente, el componente más importante del suelo en relación con la persistencia de sustancias tóxicas es la arcilla. Debido básicamente a que la persistencia del contaminante aumenta cuanto más pequeñas son las partículas, ya que aportan una mayor área superficial para la absorción del compuesto (PEMEX, 2000).

En Colombia las zonas más afectadas por el derrame de TPHs son los Departamentos de Arauca, Casanare y Santander (ECOPETROL, 1998,1999, 2003). Los suelos afectados por contaminaciones de TPHs en la región de Arauca se caracterizan por ser de una textura gruesa (en la montaña, piedemonte, bancos y mendaños) y fina (en zonas depresionales de la llanura aluvial) donde ocurren migraciones de arcilla. La densidad se encuentra comprendida entre: 1.3 g/cc para los de textura fina y de 1.6 g/cc

para los de textura gruesa. El pH de estos suelos es ácido (4.0-5.5) y generalmente están constituidos por un 38-58% de arena, con un porcentaje de carbono orgánico entre el 0-1.5% (IGAC, 1995).

En la región del Casanaré específicamente en Yopal los suelos son ligeramente ácidos (5.5-6.5), las bajas condiciones de pH reflejan los bajos contenidos de bases intercambiables, son suelos de texturas gruesas y de un bajo a mediano contenido de carbono orgánico (0.27-2.63%), en cuanto a su clasificación granulométrica se encuentran suelos arenosos y arcillosos, con una densidad aparente relativamente alta (IGAC, 1976). Finalmente los suelos de la región de Santander se caracterizan por ser suelos ligeramente ácidos (5.5-7.0), clasificados como franco arenosos (70% arena, 22% de limo y 8% de arcilla) y franco arcillo arenosos (40-56% de arena, 20% de limo y 24% de arcilla), tienen un bajo porcentaje de materia orgánica y un alto contenido de nitrógeno en la superficie (IGAC, 1995).

2.4.2 Estadísticas de atentados contra la infraestructura petrolera en Colombia

Colombia viene sufriendo desde hace 18 años una permanente actividad terrorista contra los oleoductos e instalaciones petroleras (ECOPETROL, 2003). Esto ha ocasionado el derrame de cerca de 2 millones de m³ de petróleo sobre: ciénagas, pantanos, ríos, quebradas y suelos en su gran mayoría de uso agrícola, pecuario y pesquero, originando graves impactos a nivel económico, social y ambiental (ECOPETROL,

1998-1999; Serrano, 1999). La gran cantidad de atentados contra las tuberías de conducción de petróleo debido a la situación sociopolítica, ha ocasionado el derrame ~90.000 m³ en aguas continentales, los cuales se convierten en los más grandes del mundo en estos ecosistemas (Ramírez y Viña, 1998).

La cifra de crudo vertida por los atentados es de 7.6 veces el petróleo que se derramó en el desastre del buque Exxon Valdéz entre Alaska y Canadá en marzo 24 de 1989 (Atlas y Bartha, 1998). De 1986-1998 el país contó con un registro de 920 ataques contra la infraestructura petrolera (Tabla 2). De 1989-2001, 844 de ellos solo en el oleoducto Caño Limón Coveñas, debido a ataques por grupos al margen de la ley (Tabla 3), perjudicando a los ecosistemas y las fuentes de producción y abastecimiento de las comunidades aledañas al oleoducto y regiones por donde este transita (ECOPETROL, 2001).

Como consecuencia de los atentados contra los oleoductos, se ha visto en la necesidad de adelantar trabajos de remediación en los sitios afectados por los derrames, debido a la contaminación crónica sostenida de las áreas afectadas, al control inadecuado de los derrames y a la poca atención de los problemas causados por el acceso, orden público, costos, etc (ECOPETROL, 1998-1999). Actualmente, estos atentados le han costado al país ~ 149 mil millones de dólares, mientras que se han dejado de producir 121 mil millones de dólares; y se han derramado 2.8 millones de barriles, teniendo en cuenta que la producción diaria Nacional es de ~600 mil barriles (ECOPETROL, 2001; 2003).

Tabla 2. Estadísticas de los atentados contra los oleoductos en Colombia entre 1986-1998

Infraestructura afectada	No. de atentados
Oleoducto Caño Limón-Coveñas	575
Oleoducto Colombia	73
Oleoducto Trasandino	151
Oleoducto Central	4
Otra infraestructura	117
TOTAL	920

Fuente: ECOPETROL (1998-1999).

Tabla 3. Estadísticas por atentados al oleoducto Caño Limón–Coveñas Periodo 1989-2001

Año	No atentados	Causa Natural	Crudo derramado (KBLs)
1989	28		74.6
1990	23		100.0
1991	60		176.2
1992	62		156.8
1993	38	1	107.8
1994	45		142.4
1995	46		134.3
1996	47	1	105.6
1997	64	1	200.9
1998	77	1	251.0
1999	79	0	211.4
2000	96	2	284.4
2001	170	3	400.1
Subtotal	835	9	2345.5
Total	844	9	2345.5

Fuente: ECOPETROL, 2001, KBLs: Kilo barriles.

2.5 Remediación de suelos contaminados con TPHs

Existen diferentes tratamientos para la recuperación de suelos contaminados con HCs, dentro de los cuales encontramos los físicos, químicos y los biológicos (Ewies *et al.*, 1999). Cada uno de los cuales presenta ventajas y desventajas, y en ocasiones, lo más rápido y rentable consiste en una combinación de los sistemas o tratamientos (Leahy y Colwell, 1990).

En el momento de seleccionar el sistema adecuado para un proceso de remediación de suelos; es necesario llevar a cabo, una evaluación completa del lugar, en donde se registren datos físicos y biológicos, incluyendo su hidrogeología, composición del suelo, conocimiento de la densidad microbiana, y consideraciones de tipo climatológico (Levin y Gealt, 1997).

2.5.1 Tratamientos físicos

Los tratamientos físicos se caracterizan principalmente por emplear operaciones unitarias como el drenado, secado, filtración, separación petróleo-agua y extracción con solventes para recuperar algún subproducto que tenga un valor comercial (Gaudy y Gaudy, 1980; Vidali, 2001). Estas técnicas, pueden presentar algunas desventajas ya que transfieren el contaminante de un lugar a otro, generando un mayor problema ambiental, y en algunos casos se pueden crear subproductos más tóxicos que el mismo contaminante (Ordoñez, 1998).

2.5.2 Tratamientos químicos

Estos tratamientos, se basan en reacciones de oxido-reducción de compuestos orgánicos, que se llevan a cabo por medio de la adición de un agente químico (p.e., hidróxido de sodio, cal, cenizas, surfactantes, etc) que permitan fijar, estabilizar y/o solidificar componentes tóxicos (Levin y Gealt, 1997). Estos métodos logran reducir y neutralizar los componentes para que puedan manejarse y disponerse con mayor facilidad (Ritman y Mc Carty, 2001).

Los surfactantes, son productos a base de detergentes que han sido empleados con el objeto de hacer un lavado del suelo y así separar los HCs de la matriz (suelo, sedimento o agua) a un costo considerable. Los surfactantes sintéticos frecuentemente aplicados en el lavado de suelos, debido a su alta solubilidad, movilizan contaminantes orgánicos adsorbidos o absorbidos al suelo. Sin embargo, algunos tipos de surfactantes pueden llegar a inhibir la actividad microbiológica sobre las moléculas del contaminante (Hamme *et al.*, 2003).

2.5.3 Tratamientos biológicos

Los tratamientos biológicos consisten en la estimulación de los microorganismos con capacidad degradadora, con el objeto de recuperar ambientes contaminados (Ávila, 1999). Se puede favorecer la actividad de los microorganismos nativos o introducir nuevas especies; mejorando las condiciones edáficas, añadiendo nutrientes (N y P), agua, AE (O₂) o modificando algunas veces el pH. En la biodegradación, estos

microorganismos transforman los contaminantes (orgánicos e inorgánicos) mediante diversas reacciones metabólicas (Ewies *et al.*, 1999, Hurst *et al.*, 1997).

2.6 Biorremediación de ambientes contaminados por TPHs

El objetivo principal de los procesos de biorremediación es el de acelerar la degradación total o parcial del contaminante orgánico, logrando así disminuir su toxicidad, movilidad e impacto ambiental terrestre y acuático (Bragg *et al.*, 1994). La biorremediación se aplica a cualquier sistema (suelo o aguas) o proceso en el que se empleen métodos biológicos para transformar o fijar contaminantes (Eweis *et al.*, 1999). La biorremediación utiliza los microorganismos (bacterias, protozoos y hongos), plantas o enzimas vegetales y/o microbianas para eliminar contaminantes (Atlas y Bartha, 1987).

La tasa de biorremediación depende de la interacción entre los factores del medio ambiente (p.e., pH, actividad del agua, temperatura, AE, nutrientes y estructura del suelo), el número y tipo de microorganismos presentes, concentración del contaminante y la estructura química del contaminante a biodegradar (Atlas, 1988; Bitton, 2002).

2.6.1 Factores que afectan el proceso de biorremediación

La biodegradación de TPHs es afectada por las condiciones ambientales y por tal motivo es indispensable tenerlas en cuenta para que la actividad de los microorganismos degradadores sea la más eficiente

(Atlas y Bartha, 1987; Leahy y Colwell, 1990; Cleves y Sandoval, 2001). Dentro de los factores que más pueden llegar a limitar un proceso de biodegradación se encuentran: la temperatura, el pH, AE, humedad y nutrientes (Atlas y Bartha, 2001)

2.6.1.1 Temperatura

El metabolismo de los microorganismos, actividad enzimática y celular dependen directamente de la temperatura (Ordoñez, 1998; Hamme *et al.*, 2003); así mismo, esta influye en los cambios estructurales y químicos del petróleo. A bajas temperaturas, la viscosidad del petróleo incrementa, mientras que la volatilidad de los HCs tóxicos de bajo peso molecular se reduce retrasando los procesos de biodegradación (Atlas, 1988; Ávila, 1999).

Aunque la biodegradación de los TPHs puede ocurrir en un amplio rango de temperatura, la tasa de biodegradación generalmente decrece con un descenso de la temperatura (Levin y Gealt, 1999; Zhu *et al.*, 2001). La temperatura óptima para la biodegradación y mineralización de los HCs se encuentra en un rango aproximado de 30-40°C en suelos, de 20-30°C en ambientes de agua dulce, y de 15-20°C en ambientes marinos (Atlas, 1996). Aunque se han reportado estudios de biorremediación a bajas temperaturas en suelos alpinos y aguas subterráneas por debajo de los 10°C (Marguessin y Schinner, 1997a; 1997b; 2001; Coulon y Delille, 2003).

2.6.1.2 pH

El pH del suelo es importante para la actividad enzimática, nutrientes y desarrollo de los microorganismos degradadores de HCs, siendo los más adecuados para los microorganismos durante un proceso de biorremediación los comprendidos en un intervalo de pH entre 5.5-8.0 (Ritter y Scarborough, 1995; Ercoli *et al.*, 2001; Marguésin *et al.*, 2003). Condiciones altamente ácidas o alcalinas pueden llegar a inhibir la actividad microbiana, sin embargo, se han reportado numerosos estudios de biorremediación de HCs en condiciones extremas de T° y pH (Stapleton *et al.*, 1998; Eweis *et al.*, 1999; Marguésin y Schinner, 1997a, 2001).

El pH del suelo afecta la disponibilidad del fósforo (P) dependiendo de este parámetro, una parte del P disuelto reacciona con el Fe y Al (acidéz) o con Ca (básico) formando sales insolubles, por tal motivo solo una pequeña fracción de este elemento quedará disponible para los microorganismos. El P restante que se encuentra en forma sólida será solubilizado a medida que disminuya la concentración de P disuelto. A un pH entre 3-5 se presenta una mínima solubilidad de fósforo, a un pH de 5.5 mucho del P está químicamente unido al Fe y AL, a un pH de 6 empieza la precipitación como fosfato calcio, y a pH mayores de 6.5 se forman sales de calcio insolubles por lo que el P no es disponible para los microorganismos, incluso puede formarse apatita la cual es muy insoluble (Silvia *et al.*, 1998; PEMEX, 2000; Ercoli *et al.*, 2001).

Durante la degradación de HCs, la formación de compuestos intermediarios ácidos puede variar las condiciones del pH del sitio

generando consecuencias negativas sobre el metabolismo microbiano (Leahy y Colwell, 1997; Hamme *et al.*, 2003). Por este motivo, en algunas ocasiones es necesario realizar un control y ajuste de pH durante el proceso de biorremediación por medio de la aplicación de cal. Sin embargo, el ajuste de pH debe hacerse de acuerdo a las características del suelo tales como: textura, conductividad y contenido de arcillas. Cuando el pH es modificado algunos elementos pueden hacerse más tóxicos en un rango de pH diferente, así mismo, los microorganismos nativos pueden verse afectados ya que están adaptados a las condiciones del sitio, incluyendo los bajos valores de pH (Kastner *et al.*, 1998).

2.6.1.3 Aceptores de electrones.

El metabolismo microbiano se puede realizar en forma aeróbica o anaeróbica (Brock *et al.*, 2003). La presencia de AE como el oxígeno (O_2), nitrato (NO_3^-), hierro (Fe^{+3}) y sulfato (SO_4^{-2}) son indispensables para la oxidación de los HCs presentes en el ambiente contaminado (Leahy y Colwell, 1990). Las condiciones aeróbicas son generalmente consideradas como las más favorables para la degradación de HCs en el ambiente; puesto que las vías de degradación tanto para HCs saturados y aromáticos involucran muchas veces la acción de oxigenasas (Atlas y Bartha, 1987), estas enzimas catalizan la transferencia de O_2 a un determinado compuesto orgánico (Brock *et al.*, 2003). Los nitratos y sulfatos pueden servir como AE, pero el O_2 es el que se utiliza con mayor frecuencia debido a que este proporciona un mayor rendimiento energético y permite degradar un mayor

rango de compuestos (Eweis *et al.*, 1999; Atlas y Bartha, 1987; Vidali, 2001).

En el caso de suelos superficiales, se puede conseguir la oxigenación mediante un drenaje adecuado, por medio de compresores, volteos mecánicos o manuales en donde se suministra el oxígeno requerido en la zona vadosa. Los espacios porosos llenos de aire, facilitan la difusión del oxígeno, mientras que en un suelo saturado la difusión es extremadamente lenta (Silvia *et al.*, 1998). Concentraciones elevadas de residuos orgánicos en descomposición crean una demanda de oxígeno muy alta en los suelos, y la velocidad de difusión pueden llegar a ser un factor limitante, incluso en suelos bien drenados y de textura ligera (Atlas, 1981; Ávila, 1999).

2.6.1.4 Nutrientes

Los nutrientes son sustancias químicas necesarias para el desarrollo de los microorganismos, los cuales se dividen en 2 grupos: los macronutrientes (carbono, fósforo, nitrógeno) y los micronutrientes o elementos minoritarios (Zinc: Zn, Boro: Bo, Molibdeno: Mb, hierro: Fe, Cloro: Cl y Cobre: Cu) (Levin y Gealt, 1997; Vidali, 2001). Los macro y micronutrientes son necesarios para el metabolismo microbiano, incorporación en la biomasa y actividad metabólica (Brock *et al.*, 2003).

La fuente de carbono es requerida para producir compuestos celulares, productos metabólicos y biomasa (Rittman y McCarty, 2001) y la fuente de fósforo interviene en la formación de compuestos energéticos en

la célula (p.e., ATP y ADP). De otra parte, los oligoelementos constituyen un conjunto variado de elementos que se encuentran en muy bajas cantidades en el suelo (Ercoli *et al.*, 2001). Las formas preferidas de los microorganismos para asimilar el nitrógeno son el amonio (NH_4^+), seguido del nitrato (NO_3^-); y para el fósforo la forma preferida es el fosfato (PO_4^{-3}) (Marguessin *et al.*, 2000; Haines *et al.*, 2002).

Los nutrientes son regularmente asimilados desde un número limitado de estados elementales (orgánicos e inorgánicos) en el ambiente y por lo tanto, la cantidad de nutrientes presentes y el estado de los mismos son importantes para llevar a cabo un proceso de biodegradación (Eweis *et al.*, 1999). Dependiendo de las concentraciones de C, N y P en el ambiente contaminado las relaciones de los macronutrientes que son necesarias de adicionar, pueden variar significativamente durante el proceso de biorremediación (Marguessin y Schinner, 1997a; Marguessin *et al.*, 2000; 2003). A menos, que se lleven a cabo pruebas de laboratorio para encontrar las concentraciones óptimas de C:N:P necesaria para la degradación de HCs, se puede emplear una relación general (p.e., 100:10:1), la cual ha sido reportada como optima en algunos procesos de biorremediación; aunque han sido reportadas otro tipos de concentraciones por algunos autores (Tabla 4) (Song y Bartha, 1990; Margesin y Schinner, 1997a, 1997b; Avila, 1999; Cunningham y Philp, 2000). Sin embargo, el tipo de nutriente óptimo y sus concentraciones varían de acuerdo a las propiedades del suelo y las condiciones ambientales específicas de cada sitio (Atlas, 1981; Atlas y Bartha, 2001).

Tabla 4. Relaciones empleadas de C:N:P durante los procesos de biorremediación de HCs

Relación C:N:P	Tipo de nutriente	Referencia
100:2:0,4	NH ₄ H ₂ PO ₄	Genes y Consenti, 1993
100:10:2	NH ₄ NO ₃ - K ₂ HPO ₄ FIC (NPK)	Song y Bartha, 1990; Marguessin y Schinner, 1997a; Marguessin <i>et al.</i> , 2000
100:10:1	NH ₄ NO ₃ -KH ₂ PO ₄	Flathman, <i>et al.</i> , 1995. Calabrese, <i>et al.</i> , 1993. Margesin y Schinner, 1997b. Ávila, 1999.

Fuente: Eweis *et al.*, 1999.

Cuando ocurre un derrame de petróleo en el ambiente el carbono incrementa dramáticamente, y la disponibilidad de nitrógeno y fósforo generalmente empiezan a ser un factor limitante en la degradación de HCs (Atlas y Bartha, 1981; Atlas, 1988; Leahy y Colwell, 1990). Por esta razón, macronutrientes como el nitrógeno, fósforo y potasio son necesarios en el metabolismo microbiano para su incorporación en la biomasa y actividad metabólica (Ritman y Mc Carty, 2001). La adición de nutrientes en forma de fertilizantes orgánicos e inorgánicos, suplen las necesidades fisiológicas de los microorganismos nativos presentes en el área contaminada dando como resultado la degradación del contaminante (Reynolds *et al.*, 1997).

La mayor eficiencia de los procesos de biorremediación se consigue empleando diferentes tipos de nutrientes: solubles en agua, granulares y oleofílicos; los cuales traen ciertas ventajas y desventajas al ser aplicados en ambientes contaminados por HC; su efectividad depende de las características del ambiente contaminado (Zhu *et al.*, 2001).

El empleo de fertilizantes para estimular la biodegradación de HCs en ambientes naturales es una estrategia reciente (~1970). En muchos

proyectos se han empleado procesos de bioestimulación (adición de nutrientes, AE) en suelos y aguas contaminadas por TPH. La adición de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo pueden estimular la biodegradación de los HCs, si no existen otro tipo de limitantes en el ambiente, y si las condiciones ambientales son adecuadas para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos (p.e., pH, humedad, AE, etc). Las SIS (KNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3) y otro tipo de nutrientes orgánicos como la urea se caracterizan por poseer diferentes composiciones (Tabla 5). El nitrato de amonio es un abono nitrogenado, que ha sido empleado en diferentes procesos de remediación de suelos debido a su alto % de nitrógeno, fácil manipulación y alta efectividad (Wrenn *et al.*, 1994; Marguessin *et al.*, 2000; Broock *et al.*, 2001).

Tabla 5. Composición porcentual media de fertilizantes químicos nitrogenados.

Fertilizante químico	Formula	% N total	P_2O_5 asimilable	K_2O soluble en agua	CaO	MgO
Amoniaco anhídrido	NH_3	82	-	-	-	-
Soluciones amoniacales	NH_4OH	20-25	-	-	-	-
Nitrato amónico	NO_3NH_4	33.5-34.5	-	-	-	-
Sulfato amónico	$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	20.5-21	-	-	-	-
Nitrosulfato amónico	$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2 + \text{NO}_3\text{NH}_4$	26	-	-	-	-
Nitrato cálcico	$(\text{NO}_3)_2\text{Ca}$	15.5	-	-	28	-
Nitrato sódico	NO_3Na	16	-	-	-	-
Urea	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	46	-	-	-	-

Fuente: Suppo, 1996.

Los FIC contienen diferentes proporciones de los elementos primarios de N, P y K, y en muchas ocasiones llevan algunos tipos de microelementos requeridos para el metabolismo microbiano (Cleves y Sandoval, 2001). El contenido de cada elemento presente en el fertilizante se expresa mediante una serie de 3 números, dados en el orden N:P:K. Así 15:15:15 significa un contenido de 15 % de nitrógeno total (3.1% de nitrógeno amoniacal y 11.96% de nitrógeno orgánico): 15% de fósforo asimilable (P_2O_5): 15% de potasio soluble (K_2O) suplementados con un 6% de magnesio (MgO) y 6% de azufre (Suppo, 1996; Zhu *et al.*, 2000; Cleves y Sandoval, 2001).

Las concentraciones de N y P son limitantes en suelos, y la aceleración de la tasa de biodegradación de petróleo crudo o gasolina en suelos y aguas subterráneas por medio de la adición de urea, fertilizantes tipo NPK, nitrato de amonio y sales de fosfatos ha sido demostrada en diferentes estudios (Leahy y Colwell, 1990; Wrenn *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 2001; Timothy *et al.*, 2001). Sin embargo, en algunos estudios no se han observado diferencias significativas en las tasas de biodegradación entre los controles y los tratamientos, los cuales han recibido diferentes tipos de nutrientes, debido a la presencia de condiciones ambientales adversas tales como: bajas concentraciones de microorganismos degradadores, pH extremos, bajos porcentajes de humedad, entre otros (Hambrick *et al.*; 1980; Wrenn *et al.*., 1994; Marguessin y Schinner, 1997a; Marguessin *et al.*, 2000; Cleves y Sandoval, 2001).

2.6.1.5 Humedad

La humedad del suelo tiene un importante efecto en la actividad microbiana (Silvia *et al.*, 1998; Atlas y Bartha, 2001). La presencia de agua es necesaria ya que, los microorganismos toman el carbono orgánico, los nutrientes inorgánicos y los aceptores de electrones, necesarios para el crecimiento microbiano, de la fase líquida (Ewies *et al.*, 1999). Por lo tanto, el agua debe estar en contacto con el contaminante y estar presente en cantidades necesarias que permitan un óptimo desarrollo de las comunidades bacterianas (Ávila, 1999).

El agua es el principal componente del protoplasma bacteriano, y es además un medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células, y los productos metabolizados salen al exterior de la célula. El contenido agua-suelo influye en el transporte de AEs, en la solubilidad de los constituyentes del suelo y en el pH (Levin y Gealt, 1997). Poca humedad en el suelo da como resultado zonas secas y por tanto baja actividad de los microorganismos. Sin embargo, demasiada humedad inhibe el intercambio de gases y da como resultado el desarrollo de zonas anaerobias (Ordoñez, 1997).

La degradación de HCs en el ambiente puede verse limitado por la disponibilidad de agua (Hurst *et al.*, 1997). La aireación y la humedad están directamente relacionadas debido a que el espacio de poro no se llena con agua si no con gas. La atmósfera en el interior del suelo generalmente contiene mas dióxido de carbono y menos oxígeno que la atmósfera sobre el suelo como consecuencia de la respiración de los microorganismos y

raíces de las plantas, esto unido a la dificultad de movimiento del gas en el interior de los pequeños poros. Muchas bacterias aerobias trabajan u operan óptimamente a niveles de humedad entre el 50-75% de la capacidad de campo (Sanchez *et al.*, 1997; Hamme *et al.*, 2003).

El contenido óptimo de humedad se mide con relación a la capacidad de campo de suelo; la cual se refiere a la humedad de un suelo que se ha saturado con agua y dejado de drenar libremente durante 24 horas (Lopez y Lopez, 1990). Los suelos de texturas gruesas drenan fácilmente, generalmente tienen una capacidad de campo superior a los suelos de texturas más finas. La capacidad de campo de un suelo arenosos puede ser tan baja como un 5% peso seco, comparado con un 30% de un suelo arcillosos peso seco (EPA, 1993). Para mantener el nivel necesario de humedad, el agua se aplica mediante diferentes formas de riego, incluyendo sistemas de aspersión y de goteo (Eweis *et al.*, 1999).

2.6.1.6 Estructura y tipo de suelo.

Debido a que el proceso de biorremediación es dependiente del transporte de oxígeno y de los nutrientes a través del suelo contaminado, este debe ser en lo posible homogéneo y permeable (Ordoñez, 1997). La heterogeneidad puede dar lugar a tratamientos incompletos debido a que los nutrientes y el oxígeno fluirán preferencialmente a través de las áreas permeables. Los suelos de baja permeabilidad disminuyen el flujo de nutrientes y de oxígeno, incrementando el tiempo requerido para el tratamiento de biorremediación (Levin y Gealt, 1997).

Las propiedades que más influyen en un proceso de biorremediación son: el tamaño de la partícula, la porosidad, la humedad, estado de aireación, composición química, fracción de arcilla, capacidad de intercambio de cationes y materia orgánica (Gary y Duffi, 2000). En suelos arcillosos, donde el tamaño de la partícula es demasiado pequeño, predomina el tamaño de poro más reducido, a diferencia que en suelos arenosos en donde este es mayor. El agua se mueve más rápido a través de los poros de gran tamaño, reteniendo muy poca agua, por lo tanto, los suelos de grano grueso drenan rápidamente (Ewies *et al.*, 1999). El contenido de arcilla está correlacionado con la humedad, y puede dificultar el proceso de homogenización y aireación del terreno contaminado, área superficial específica, capacidad de intercambio catiónico influyendo en la adsorción de los iones (PEMEX, 2000).

2.6.1.7 Presencia de microorganismos

La concentración y composición de la comunidad microbiana y la tasa de degradación del contaminante está influenciada por factores ambientales, factores de sustratos y factores microbiológicos (Ritman y McCarty, 2001). Entre los factores microbiológicos se encuentra la presencia de microorganismos con rutas para biodegradación del compuesto de interés, la aclimatación de las poblaciones microbianas y factores ecológicos (Hohener *et al.*, 1998).

La densidad de los microorganismos en el suelo es un factor fundamental en el proceso de biorremediación (EPA, 2000). Para el caso

del tratamiento de suelos contaminados con HCs se requiere una concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de 10^3 - 10^4 UFC/gsuelo seco y de microorganismos degradadores de 10^4 - 10^5 UFC/gsuelo seco (Ercoli *et al.*, 2001; Marguessin 2003). La fracción de la comunidad total heterotrófica representada por bacterias y hongos degradadores de HCs es altamente variable y se han reportado rangos para hongos entre el 6 al 82% y para bacterias de 0.13 a 50% (Mishra *et al* 2001).

2.7 Técnicas de biorremediación de suelos contaminados con HCs.

Las técnicas de biorremediación son empleadas para incrementar la tasa de biodegradación microbiana (Hohener *et al.*, 1998; Atlas y Batha, 2001); y pueden ser aplicadas *in situ* (en el lugar), la cual involucra procesos de bioestimulación, como la adición de nutrientes y AE y la biorremediación *ex situ* (fuera del lugar), en donde se realiza una excavación del suelo contaminado e incluye técnicas como los biorreactores, la biolabranza, el compostaje y las biopilas, cuya diferencia fundamental radica en la forma de aireación (Hurst *et al.*, 1997; Rittman y Mc Carty, 2001). Ambos tratamientos constituyen una combinación de procesos y actividades biológicas y no biológicas y dependen de factores como la zona, tipo de contaminante y nivel de concentración del contaminante en el suelo (Levin y Gealt, 1997).

La biorremediación *ex-situ*, es una técnica aplicable para terrenos pequeños, cuando se desea una rápida limpieza del sitio contaminado, o

cuando existe una alta contaminación por compuestos orgánicos (Leavy y Cowell, 1999). Un tratamiento *in situ* se ve afectado por las restricciones locales, regulaciones del estado, densidad poblacional o por otras causas que impidan su aplicación. Cuando esto ocurre, el residuo peligroso y el suelo o agua contaminada son llevados a otra parte para su tratamiento *ex situ* (Aguilar *et al.*, 1998).

2.7.1 Bioaugmentación

La bioaugmentación es una técnica ampliamente usada a partir de los años 70 que consiste en la aplicación o inoculación de microorganismos nativos, comerciales o mejorados genéticamente capaces de degradar el contaminante presente (Wrenn *et al.*, 1994; Hurst *et al.*, 1997). Los microorganismos son cultivados y adaptados para reforzar su capacidad degradadora del contaminante (Mishra *et al.*, 2001).

Generalmente la bioaugmentación es implementada cuando la concentración del contaminante es tóxica para la microflora nativa, cuando la concentración de microorganismos nativos es relativamente baja, o cuando el ambiente inhibe a los microorganismos nativos encargados del proceso de biorremediación (Hurst *et al.*, 1997).

2.7.2 Bioestimulación.

La bioestimulación consiste en una modificación de las condiciones ambientales suministrando algún factor limitante que restringiendo la velocidad de crecimiento microbiano y el metabolismo de la sustancia

contaminante (Atlas, 1988). Estas modificaciones ambientales, permiten una rápida reproducción de los microorganismos y la incorporación de los nutrientes a los componentes de la célula para la asimilación y síntesis de nuevo material celular (Eweis *et al.*, 1999).

La adición de nutrientes (macroelementos o microelementos) en forma de fertilizantes orgánicos o inorgánicos suplen las necesidades fisiológicas de los microorganismos, dando como resultado la eliminación total o parcial del contaminante (Reynolds *et al.*, 1997). Para que la bioestimulación funcione es necesario que el compuesto no sea recalcitrante, y que los microorganismos tengan la capacidad genética y fisiológica suficiente como para su degradación (Ritman y McCarty, 2001).

En general, han sido muchos los estudios que han utilizado procesos de bioestimulación con el objeto de acelerar las tasas de biodegradación en suelos contaminados con HCs, en la mayoría de ellos se logró incrementar la actividad de biodegradación con el uso de los fertilizantes (Dibble y Bartha, 1979; Song y Bartha, 1990; Song *et al.*, 1990; Marguésin *et al.*, 2000; Marguésin y Schinner, 2001; Broock *et al.*, 2001; Coulon y Delille, 2003; Yerushalmi *et al.*, 2003).

2.7.3 Bioventilación

Es una técnica de bioestimulación, en la cual se inyecta aire (oxígeno) en una zona contaminada, bien sea por infiltración o inyección de aire (empleando bombas o distribuidores), estimulando así el incremento de

la actividad degradadora de la población microbiana del suelo (Eweis *et al.*, 1999). Adicionalmente, la salida del aire del suelo aprovecha la naturaleza volátil de algunos compuestos presentes en la mezcla para volatilizar los compuestos de bajo peso molecular. (Ritter y Scarborough, 1995).

2.7.4 Biolabranza

Dentro de los diferentes procesos existentes para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo se encuentra la técnica de biolabranza, siendo una de las alternativas que permite reducir altas concentraciones de TPHs en un lapso de tiempo razonable y a muy bajo costo (Tabla 6) (Eweis *et al.*, 1999; Ordoñez, 1998). Esta técnica consiste en incorporar suelos, sedimentos, lodos contaminados a la superficie del suelo en una delgada capa, estimulando los microorganismos nativos, mediante la aireación, adición de nutrientes y humedad (Reynolds *et al.* 1997; Rittman y McCarty, 2001). Durante la implementación de la biolabranza es necesario controlar parámetros como el requerimiento de nitrógeno, fósforo, presencia AE (p.e., O₂) mediante un volteo periódico, humedad, pH, tipo de suelo, solubilidad y concentración de HCs (Atlas y Bartha, 1987; Cleves y Sandoval, 2001; Roldan, 2001).

Tabla 6. Ventajas y desventajas de la biolabranza.

Ventajas	Desventajas
Diseño e implementación sencillos	Requiere grandes áreas de terreno para su implementación
El tiempo del tratamiento es relativamente corto bajo condiciones óptimas	Se puede generar polvo y vapores durante el proceso de implementación
Bajo consumo de energía, asegura un completo proceso de aireación de la mezcla	Reducción de concentraciones mayores del 95% y menores de 0.1 ppm son difíciles de lograr
Permite la reutilización del suelo para el cultivo de plantas.	La presencia de concentraciones significativas de metales pesados puede llegar a inhibir el crecimiento microbiano.

Fuente: ECOPETROL, 1999.

La biolabranza ha sido empleada de manera exitosa desde hace varios años para el control y disposición de lodos aceitosos y otros residuos provenientes de la refinación y extracción de petróleo. Adicionalmente, se han realizado estudios en donde se ha utilizado esta técnica evaluándose diferentes factores limitantes que pueden llegar a afectar el rendimiento de un proceso de biorremediación (Dible y Bartha, 1979; Reynolds *et al.*, 1997; Cunningham y Philp, 2000; Cleves y Sandoval, 2001)

2.8 Métodos empleados para el monitoreo de los procesos de biorremediación de TPHs

2.8.1 Recuento en placa de microorganismos

El recuento en placa es una técnica tradicional que cuantifica el número de bacterias presentes (microorganismos totales, bacterias, hongos) capaces de crecer sobre un medio sólido que posee un determinado tipo de nutrientes y sustratos (Elsas y Smalla, 1997). El método se fundamenta en el desarrollo de colonias visibles, las cuales son

contadas para dar una estimación de la concentración de microorganismos presentes en la muestra (Hurst. *et al.*, 1997; ASM, 1996; Standard Methods, 1995). Varios factores determinan la eficacia del método: uso de un medio y sustrato adecuado, temperatura, tiempo de incubación adecuados y correcta preparación de las diluciones (Hurst *et al.*, 1997; Zhu *et al.*, 2001).

El recuento en placa de microorganismos es usado frecuentemente para cuantificar el número de heterotrofos totales y provee una medida sobre la viabilidad microbiana total, adicionalmente esta técnica puede ser empleada para proporcionar una determinación más precisa sobre la concentración de microorganismos que presentan la capacidad metabólica para degradar diferentes HCs (alifáticos y aromáticos) (Hurst. *et al.*, 1997; Haines *et al.*, 1996). La distribución, el tipo y el número de microorganismos presentes en el área contaminada ayuda a realizar una caracterización del ambiente contaminado con respecto a la edad y concentración del contaminante (Cerniglia *et al.*, 1980). El empleo de medios adicionados con diferentes tipos de HCs como fuente de carbono y energía han sido empleados en diferentes estudios para determinar el crecimiento y actividad microbiana en muestras contaminadas con TPHs (Song y Bartha, 1990; Marguassin, 1997a, b; Marquez *et al.*, 2000; Marguassin *et al.* 2000).

2.8.2 Técnica del número más probable (NMP).

La técnica del NMP ha sido empleada para determinar la concentración de bacterias que presentan la capacidad metabólica para degradar HCs (Brown y Braddock, 1990). El método está basado en la

hipótesis de que una célula puede producir un cambio detectable en el medio (p.e., cambio de color, presencia de turbidez). De igual forma se asume que los microorganismos son distribuidos homogéneamente en la muestra y el NMP sigue una distribución de Poisson (Long *et al.*, 1995).

El crecimiento se da en un medio líquido mineral (caldo Bushnell Haas BH) (Anexo L) enriquecido con HCs que suministra la fuente de carbono y energía para el crecimiento de la población microbiana (Haines *et al.*, 1996). Para confirmar la presencia o ausencia de microorganismos metabólicamente activos se emplea un indicador violeta lodonitrotetrazolium (INT); este compuesto compite con el oxígeno por los electrones de la cadena respiratoria, reduciéndose a un compuesto insoluble de color rojo (Haines *et al.*, 1996).

Numerosos estudios han utilizado el método de NMP para estimar la densidad de microorganismos degradadores de HCs en soluciones acuosas y muestras de suelo, comparando diferentes fuentes de HCs (p.e., Kerosene, ACPM y crudo), utilizando placas de 24, 60 y 96 pozos (Brown y Braddock, 1995; Cunningham y Philp, 2000; Cleves y Sandoval, 2001; Roldan, 2002). De esta manera, se ha demostrado que la técnica de NMP es una herramienta válida y confiable para la determinación de la concentración de bacterias degradadoras de HCs y para el monitoreo de los procesos de biorremediación.

2.8.3 Cuantificación de TPHs en suelos

La cuantificación de los TPHs presentes en el suelo permite verificar la disminución de estos en el tiempo durante el proceso de biorremediación (Zhu *et al.*, 2001). Para la selección del método analítico se debe tener en cuenta el tipo de contaminante y tipo de suelo. Adicionalmente se tiene en cuenta su costo, la facilidad de ejecución del método y la rapidez en la obtención de los resultados (Simonton, 1998). En muchos casos estos HCs se encuentran en una mezcla de compuestos, los cuales pueden ser analizados en conjunto como TPH, grasas o aceites o por métodos que indiquen compuestos individuales: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) y PAH (Huesemann, 1995).

El análisis de los TPHs contaminantes en suelos, generalmente comprenden una extracción de la matriz, separación de los componentes, limpieza (para remoción de interferencias) y finalmente se realiza una detección (p.e., gravimetría, espectrofometría, cromatografía de gases) (Weisman, 1998). La extracción puede llevarse a cabo por fase de vapor, desorción térmica o a través de diferentes tipos solventes orgánicos, teniendo en cuenta la naturaleza del contaminante y la polaridad del solvente seleccionado (p.e., Soxhlet, sonicación, agitación mecánica) (Madsen, 1997).

2.8.3.1 Determinación de TPHs

La cuantificación de TPHs se realiza con el fin de determinar la cantidad total de HCs presentes en el medio ambiente (suelo y agua) (Gustafson, 1998). El análisis de TPH por si solo no es un indicador directo

de toxicidad, debido a que solo indican la presencia de contaminación sin determinar el compuesto específico que cause mayor riesgo tóxico y ambiental. Por esta razón no son empleados para estimar riesgos asociados con la salud humana, para lo cual se podrían determinar los compuestos de manera individual (p.e., PAH o BTEX) (Douglas *et al.*, 1991). Sin embargo, por muchos años, los TPH han sido empleados como un indicador de toxicidad por agencias regulatorias (p.e., EPA, ASTDR) (Weisman, 1998).

La concentración de TPHs no puede ser utilizado para identificar la toxicidad para los organismos vivos (Weisman, 1998). La medida de TPH se usa para determinar si existe algún riesgo potencial, estudiar la severidad del problema (concentración de HCs), determinar y evaluar la efectividad de un proceso de biorremediación (Weisman, 1998; Zhu *et al.*, 2001). Los métodos utilizados para la cuantificación incluyen espectrometría infrarroja (IR) método 418.1 (EPA, 1992), cromatografía de gases (GC) método 8015B (EPA, 1986), gravimetría: método 9071 (EPA, 1994), sonicación: método 3550/3550B (EPA, 1998), método D-5831 (ASTM, 1995) e inmunoensayos método 4030 (EPA, 1994) (Weisman, 1998; Trussell *et al.*, 1992).

La selección de los métodos de *screening* para la determinación y cuantificación de TPHs, tiene en cuenta diferentes aspectos: costo, facilidad de ejecución, rapidez en la obtención de los resultados y confiabilidad en cuanto a la precisión y exactitud del análisis. El método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) y el método D-5831 (ASTM, 1995), son

métodos ampliamente aprobados para cuantificar TPHs, debido a la simplicidad y bajo costo de las técnicas, adicionalmente permiten el análisis de grandes volúmenes de muestras y permiten una alta eficiencia en los procesos de extracción de las muestras (Sorini *et al.*, 1997; Weisman, 1998; Schawab *et al.*, 1999).

El método 418.1 (EPA, 1992) es uno de los métodos analíticos más empleados en el monitoreo de diferentes procesos de biorremediación, y es además exigido por algunas agencias regulatorias (p.e., EPA, ASTDR). Este método provee información acerca de la concentración de TPHs en el medio ambiente (p.e., arena contaminada, suelos, sedimentos), pero no proporciona información acerca de la composición de la mezcla de HC. La cantidad de TPHs determinado por este método, depende de la capacidad del solvente para extraer el HC del medio ambiente y de la absorción hacia la luz infrarroja (IR) presente en el extracto. Este método puede detectar compuestos orgánicos tales como ácidos húmicos, los cuales podrían interferir en la lectura.

El método gravimétrico 9071 (EPA, 1994), es un método simple, rápido y confiable, ampliamente utilizado, que cuantifica bajas concentraciones de TPHs por medio de un proceso de extracción por Soxhlet (u otro tipo de extracción) empleando diferentes tipos de solventes (p.e., hexano, DCM, acetona) y un subsecuente análisis gravimétrico que permite determinar la concentración de TPHs (mgTPH/Kg_{ps}). Este método presenta algunas ventajas y desventajas, las cuales radican básicamente en el proceso de extracción por Soxhlet (Tabla 7).

Por tal motivo, existen en la actualidad 2 grupos principales de métodos de extracción de TPH en muestras de suelos y aguas, y que en algunos casos sirven como una alternativa para otro tipo de procedimientos de extracción (p.e., Soxhlet) que se caracterizan por tener diversas desventajas (Tabla 7). Para su selección se debe tener en cuenta el tipo de muestra a analizar y el presupuesto que se tenga para realizar el proceso de extracción. El primero de ellos es para compuestos volátiles (p.e., Purga y retención, *headspace*) y el segundo es para compuestos semivolátiles (agitación mecánica: AM, el cual puede ser usado también para compuestos volátiles, sonicación, fluido supercrítico y fluidos subcríticos) (Weisman, 1998; Schawab *et al*, 1999)

Tabla 7. Ventajas y desventajas del proceso de extracción por Soxhlet y determinación gravimétrica, método 9071 (EPA, 1994).

Ventajas	Desventajas
Es un método sencillo y económico	Requiere de largos periodos de extracción (más de 24 h)
Permite la extracción de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles de diferentes matrices de suelos	La muestra de suelo permanece estática, limitando el contacto entre la matriz del suelo y el solvente
Cuantifica bajas concentraciones de TPHs. Los límites de detección son de 5-10 mg/L en agua y de 50 mg/Kg en suelos	No es recomendado para cuantificar TPHs que se volatilizan a temperaturas por debajo de 70-85°C
Es un método recomendado para cuantificar TPHs de muestras de suelos, lodos y muestras que contengan componentes de alto PM	Los altos contenidos de humedad en las muestras de suelo, aumentan la variabilidad de las submuestras
	Puede ocasionar la pérdida de compuestos volátiles y requiere de grandes volúmenes de solventes

Fuente: Weisman, 1998; Zhu *et al.*, 2001

El método de AM o *shaking y vortex*, es un método simple y eficiente de extracción, empleado para la separación de compuestos volátiles (HCs) de muestras de suelo (Weisman, 1998). Aunque puede presentar algunas interferencias y variar su eficiencia dependiendo del tipo de suelo (Tabla 8) (Weisman, 1998., Huesemann, 1995).

Tabla 8. Ventajas y desventajas del proceso de extracción por AM (*shaking y vortex*).

Ventajas	Desventajas
Asegura un total contacto del solvente con la fase sólida, incrementando su eficiencia de extracción (empleando varios ciclos de extracción).	Alta variabilidad en la eficiencia de la extracción dependiendo del tipo de suelo
Requiere una baja cantidad de solventes orgánicos en comparación con otros tipos de extracción.	Puede resultar costoso dependiendo del número de ciclos de extracción que se empleen
Requiere equipos e instrumentos relativamente simples.	
Permite la extracción de varias muestras al mismo tiempo y su periodo de extracción es de ~ 4 horas	

Fuente: Weisman, 1998; Schawab *et al.*, 1999.

El método D-5831 (ASTM, 1995), se caracteriza por ser un método que permite el análisis de varias muestras por día (30 muestras x día; 10min/muestra), es un método económico y de fácil ejecución (Sorini *et al.*, 1997). Adicionalmente, esta técnica ha sido empleado en otros estudios de biorremediación, en donde se ha demostrado que es una herramienta útil y confiable para el monitoreo de ambientes contaminados con TPHs (Sorini *et al.*, 1997; Cleves y Sandoval, 2001; Roldán 2002). En este método se

utiliza isopropanol como solvente, el cual permite la extracción en un corto periodo de tiempo (3min/muestra). Este método ha sido empleado en suelos ricos en materia orgánica, los cuales frecuentemente presentan algunos tipos de interferencias (Sorini *et al.*, 1997; ASTM, 1995).

3 JUSTIFICACIÓN

A pesar de los recientes avances tecnológicos, muchos derrames accidentales de TPHs y de diferentes productos de refinería ocurren durante los procesos de embarque y desembarque. Adicionalmente cierta cantidad de petróleo es vertido a los ecosistemas terrestres como consecuencia de diversas actividades de rutina como la extracción, transporte, almacenamiento, refinamiento y distribución (Eweis *et al.*, 1999).

Colombia es el cuarto país productor de crudo en América Latina. Sin embargo, en lo corrido del año 2004, el país ha llegado a perder su autosuficiencia, a causa de la ausencia de nuevos hallazgos de pozos petroleros debido a las condiciones adversas de seguridad que operan en las diferentes multinacionales encargadas de llevar a cabo estos procedimientos (ECOPETROL, 2004). A esto se le suma la pérdida de ~400 mil barriles anuales de petróleo (para el año 2003) a causa de las continuas voladuras de las tuberías de conducción de petróleo; generando serios problemas ambientales para los ecosistemas (terrestres y acuáticos), y económicos para las compañías.

A partir del aumento de áreas contaminadas con TPHs, es necesario buscar y aplicar tratamientos que proporcionen soluciones ambientalmente seguras, efectivas y económicas para la remediación de suelos afectados por derrames de petróleo. Dentro de estos tratamientos encontramos la biorremediación; la cual es considerada como una alternativa económica y efectiva que permite la degradación total o parcial del compuesto orgánico,

disminuyendo su toxicidad, movilidad e impacto ambiental (Bragg *et al.*, 1994; Bitton, 2002).

La biodegradación de TPHs por poblaciones nativas de microorganismos constituye uno de los principales mecanismos para la eliminación de TPHs del medio ambiente (Atlas y Bartha, 1998). Sin embargo, la tasa de degradación puede verse afectada por diferentes parámetros biológicos (número y especies de microorganismos presentes) y ambientales (p.e., pH, temperatura, humedad, presencia de nutrientes y AE) (Ordoñez, 1998; Marguesin y Shinner, 1997; Marguesin *et al.*, 2000). Por esta razón puede ser necesario incrementar la tasa de biodegradación por parte de los microorganismos nativos y reducir el tiempo requerido para llevar a cabo el proceso de biodegradación por medio del suministro de factores limitantes a través de la implementación de dos estrategias generales; la bioestimulación y bioaumentación (Walter *et al.*, 1997; Ercoli *et al.*, 2001).

Numerosos estudios han evaluado el efecto de la bioestimulación en suelos contaminados con TPHs por medio de la adición de nutrientes tales como: urea, fosfatos, SIS y FIC, con el objeto de lograr una degradación rápida y eficaz de los contaminantes (Dibble y Bartha, 1979., Reynolds *et al.* 1997., Marguesin *et al.*, 2000; Brook *et al.*, 2001). Sin embargo, la comparación entre el uso de SIS y FIC no ha sido evaluado en suelos Colombianos desconociéndose que tipos de fertilizantes presentan mayor disponibilidad por parte de los microorganismos encargados de llevar a cabo el proceso de biodegradación.

Las investigaciones realizadas en Colombia en este campo se han centrado principalmente en el tratamiento de residuos aceitosos y aguas residuales generadas por la industria de petróleo Instituto Colombiano de petróleos ICP, ECOPETROL, Universidad de los Andes: CIMIC; PUJ: USBA) (Vives, 1994; Quijano y Quiza, 2000; Cleves y Sandoval, 2001; Maldonado, 2004) y en el aislamiento de microorganismos degradadores de TPHs para su utilización en zonas contaminadas con HCs (Vives, 1994; Espitúa, 2002). Adicionalmente, existe poca información acerca de la ecología, aislamiento e identificación de microorganismos nativos encargados de llevar a cabo el proceso de biodegradación, la evaluación del efecto de la adición de nutrientes, AE, al igual que la implementación y estandarización de métodos analíticos sencillos, rápidos, económicos y confiables para la evaluación y cuantificación de TPHs.

Por lo tanto es necesario realizar investigaciones que permitan conocer el papel de los microorganismos nativos en la biodegradación de TPHs y evaluar el efecto de la bioestimulación sobre los procesos de remediación en suelos contaminados por derrames de petróleo, por medio de la técnica de biolabranza. Este tipo de estudios permitirá implementar a largo plazo este proceso con un mayor rigor científico; bajo condiciones económicamente factibles en diversas regiones de nuestro país afectadas por derrames de petróleo.

De igual manera, se tendrá un mejor conocimiento acerca de los diversos parámetros ambientales que influyen durante los procesos de biorremediación, y de la diversidad microbiana de organismos nativos con

capacidades degradadoras y su potencial uso biotecnológico en el tratamiento de suelos contaminados con TPHs. Los microorganismos aislados podrán ser empleados en un futuro mediante técnicas de bioaumentación en campo con el objeto de lograr un mayor rendimiento en el proceso de biolabranza.

Durante este estudio se evaluó el efecto de la adición de nutrientes en forma de SIS y FIC en el proceso de remediación de suelos contaminados por TPHs bajo condiciones de laboratorio utilizando mesocosmos mediante la técnica de biolabranza. El proceso de biorremediación fue evaluado a través de análisis microbiológicos (recuento total de microorganismos heterótrofos, NMP para degradadores de HCs y caracterización bioquímica de los degradadores) y fisicoquímicos (concentraciones de nutrientes, pH y porcentaje de humedad). Finalmente, se evaluaron y compararon 2 métodos analíticos para la cuantificación de TPHs.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del proceso de bioestimulación (adición de nutrientes) en la biodegradación de TPHs en un suelo contaminado con petróleo.

4.2 Objetivos específicos

- Evaluar y comparar el uso de FIC y SIS en suelos contaminados con petróleo durante el proceso de biodegradación de HCs.
- Poner a punto el método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) y compararla con el método D 5831 (ASTM, 1995) para la evaluación de TPHs durante el proceso de remediación de suelos contaminados con petróleo.
- Correlacionar los factores fisicoquímicos (pH, humedad, nitratos, amonio y fósforo) y microbiológicos (heterótrofos y degradadores de HCs), en los diferentes tratamientos evaluados.
- Cuantificar y caracterizar microorganismos nativos del suelo con capacidad degradadora de HCs durante el estudio.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el estudio se evaluó el efecto de la adición de nutrientes (nitrógeno y fósforo) en la biodegradación de TPHs, empleando la técnica de biolabranza (*Landfarming*) utilizando mesocosmos. El proceso se evaluó en un suelo que fué contaminado intencionalmente con crudo. Se compararon 2 tratamientos; la adición de SIS y FIC, y se utilizaron 2 controles durante el estudio; control relativo y control abiótico (n=3). Los tratamientos y los controles, fueron ubicados y dispuestos en doce mesocosmos, localizados en el invernadero de la PUJ, Facultad de Ciencias. Se realizaron 5 eventos de muestreo durante 127 días en los cuales se llevaron a cabo mediciones de parámetros fisicoquímicos (concentración de TPHs, análisis de nutrientes, pH, porcentaje de humedad). Para la determinación de TPHs se evaluaron y compararon 2 métodos analíticos durante el estudio. El método estándar para la evaluación de combustibles en suelos D 5831 (ASTM, 1995) y el método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994). Igualmente, se determinaron parámetros microbiológicos (recuento en placa de heterótrofos y degradadores de HCs por la técnica de número más probable) y se aislaron y caracterizaron los microorganismos degradadores de HCs.

5.1 Localización del área de estudio.

El estudio fué realizado en el invernadero de la Facultad de Ciencias de la PUJ (Bogotá). El invernadero ofreció características tanto físicas (fácil acceso y óptima infraestructura: mesones, presencia de piso, suministro de

agua, entre otros) y ambientales (temperatura: 20-27°C, disponibilidad de agua para los tratamientos y luz), adecuadas para el montaje de los mesocosmos. Los análisis fisicoquímicos y microbiológicos fueron realizados en el laboratorio de USBA de la PUJ.

5.2 Descripción y recolección del suelo.

Con el objeto de determinar algunas características físico-químicas y granulométricas se realizó un análisis preliminar al suelo empleado durante el estudio antes de la adición de los HCs. Los análisis fueron llevados a cabo en el laboratorio analítico de referencia del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC). El suelo fué obtenido de la estación experimental finca San Javier de la PUJ (Zipaquirá-Cundinamarca); adicionalmente el suelo se seleccionó ya que no había recibido ningún tipo de contaminación previa con HCs (Roldan, 2003).

Para la recolección del suelo se removió la capa vegetal (~15 cm), por medio de un descapote manual. Para realizar la caracterización inicial del suelo y determinación de su densidad, se tomaron 4 muestras aleatorias de suelo de ~ 500 g y 2 terrones de suelo empleando espátulas metálicas. Las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas resellables (Multinitta®), debidamente rotuladas y transportadas a los laboratorios de USBA e IGAC para el desarrollo de análisis fisicoquímicos y microbiológicos (Tabla 9). Los resultados obtenidos fueron usados para comparar y validar las técnicas fisicoquímicas realizadas en el laboratorio de USBA y conocer las características propias de este suelo. Los recuentos

microbiológicos fueron realizados con el objeto de cuantificar y evaluar la población microbiana inicial presente en el suelo sin adición de HCs.

Tabla 9. Caracterización inicial del suelo sin HC utilizado durante el estudio

PUJ	IGAC
Recuento de Heterótrofos totales (ASM, 1986).	Nitrógeno total: NTK Kjendal 4500 N _{org} (IGAC, 1979).
NMP para degradadores de HCs. (Wrein y Venosa, 1996; Haines, 1996).	Materia orgánica Walkley Black (IGAC, 1979) (Calcinación – 500°C).
% humedad y peso seco (Anexo T).	Densidad aparente (Terron y/o Cilindro) (IGAC, 1979).
Fósforo disponible (método No 521(HACH, 1994)	Fósforo asimilable (Bray II) y cuantificación colorimétrica (IGAC, 1979)
N-NO ₃ ⁻ método No 366 (HACH, 1994)	Nitratos extracción con KCl 1N, destilación Kjeldalh y titulación potenciométrica (IGAC, 1979)
N-NH ₄ ⁺ método 391(HACH, 1994)	Amonio extracción con KCl 1N, destilación Kjeldalh (IGAC, 1979).
pH método 9045c(EPA, 1995) (Anexo R).	Relación suelo:agua (1:1) (p/v) (IGAC, 1994).

El suelo fué transportado a la PUJ para el montaje de los mesocosmos, este se tomó empleando palas a una profundidad de \pm 20 cm. Se recolectaron ~ 13 bultos de suelo con una capacidad ~ 50 Kg, para un total ~ 650 Kg de suelo requeridos para el montaje del estudio. Cada mesocosmo considerado como unidad experimental (UE) requería ~ 52 Kg de suelo. El suelo fué colocado sobre una superficie cubierta con un plástico de calibre grueso (8 mm) en donde se realizó su acondicionamiento, previo a la adición del petróleo. El acondicionamiento consistió en el humedecimiento y volteo del suelo. El volteo se realizó ~ durante 2 horas, hasta lograr una consistencia relativamente uniforme y homogénea, debido a la heterogeneidad presente en el suelo. El suelo fue

tapado con el plástico hasta el día siguiente en el que se realizó la mezcla con el petróleo.

5.2.1 Preparación de la mezcla suelo: petróleo.

Se utilizaron ~24 L de crudo tipo Castilla (12° API) (ECOPETROL) para contaminar ~650 Kg de suelo, para obtener una concentración ~20.000 mgTPH/Kg_{ps}.(Anexo A). Esta concentración fue seleccionada porque generalmente cuando ocurren derrames accidentales de crudo la contaminación de TPHs se encuentra por encima de los 15.000 mg/Kg_{ps} (Dibble y Bartha, 1979; Wrenn *et al.*, 1994; Reynolds *et al.*, 1997; Townsend *et al.*, 2000). El cálculo fue realizado teniendo en cuenta la densidad del suelo (1.1 g/cm³), la cantidad total de suelo a contaminar (~ 650 Kg) y la dimensión de los mesocosmos (48.000 cm³) (Anexo A).

La adición del petróleo al suelo se realizó manualmente dividiendo el suelo en cuatro grupos, los cuales fueron contaminados con ~ 6 L de crudo. Posteriormente se mezcló todo el suelo tratando de destruir los grumos presentes y alcanzar una mayor homogeneidad en la mezcla. Para simular el proceso de intemperización la mezcla se homogenizó por volteo manual durante 1 semana (Townsend *et al.*, 2000). El proceso de intemperización ocurre en la naturaleza y causa la volatilización de los HCs de bajo peso molecular que poseen una alta toxicidad (Leahy y Cowell, 1990). Adicionalmente, el suelo fué tamizado empleando costales de fique con el objeto de disminuir la variabilidad en el tamaño de las partículas de suelo y

para permitir una mayor aireación durante el proceso de biorremediación (Figura 1).



Figura 1. Proceso de tamizaje del suelo por medio de costales de fique, para el ensamblaje de los mesocosmos.

5.2.2 Montaje de los mesocosmos

La mezcla suelo:petróleo se distribuyó en mesocosmos (cajas de polietileno de alta densidad (60 X 40 X 25 cm) hasta alcanzar una altura de ~15 cm. Este material fué seleccionado por su baja permeabilidad y mínima absorción de HCs (Marguessin *et al.*, 2000; 2003). Los 12 mesocosmos fueron ubicados en el invernadero de la PUJ sobre un mesón de cemento, separados unos de otros (~20 cm) a lo largo de la estructura (Figura 2).



Figura 2. Distribución de los mesocosmos en el invernadero. Facultad de Ciencias-PUJ.

5.3 Evaluación de las condiciones iniciales del estudio

Con el objetivo de evaluar las condiciones iniciales de la mezcla, se tomaron 4 muestras aleatorias de 200 g a una profundidad de ~0.8 cm. Dos de las muestras fueron enviadas a un laboratorio analítico de referencia (PRODICOM, LIDA) para la determinación de la concentración de TPHs por detección infrarroja Método 4030 (EPA, 1996). Las muestras fueron colocadas en bolsas herméticas resellables y se rotularon adecuadamente (fecha y hora de recolección, procedencia, análisis a realizar, tratamiento, EM y número de UE). Posteriormente fueron transportadas en nevera portátil bajo condiciones de refrigeración (~4-8°C); Las dos muestras restantes fueron transportadas al laboratorio de USBA para la realización de los siguientes análisis: TPHs por el método D-5831 (ASTM, 1995) y por el método EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994), nitrato, amonio y

fósforo (HACH, 1994; 1998). Los análisis de nutrientes fueron usados para establecer y ajustar las relaciones de C:N:P (100:10:1), ya que esta relación ha sido reportada como eficiente en numerosos estudios de biorremediación (Calabrese *et al.*, 1993; Marguesin y Shinner, 1997, 2003a, Reynolds *et al.*, 1997, Cleves y Sandoval, 2001). Adicionalmente se determinaron: pH, % de humedad, peso seco, recuento de heterótrofos y degradadores de HCs por los métodos mencionados anteriormente en el numeral 5.2.

La humedad del suelo fue evaluada con el objeto de determinar la cantidad de agua necesaria durante el proceso de biorremediación, debido a que este parámetro puede llegar a ser un factor limitante durante dicho proceso (Cleves y Sandoval, 2001). Para esto se realizó un cálculo aproximado de la capacidad de campo adicionando diferentes cantidades de agua: 10, 30, 40, 60, 80 y 100 mL a 500 cm³ de suelo. Se estableció que 30 mL de agua eran suficientes para saturar el suelo. De acuerdo a la dimensión de la superficie del mesocosmo (0.036 m³) se determinó que eran necesarios ~ 2L de agua por cada UE, dos veces por semana (Anexo B).

5.4 Diseño experimental

Para evaluar el efecto de la adición de nutrientes (nitrógeno y fósforo) en la biodegradación de TPH en el suelo contaminado con HCs, se empleo un diseño de bloques completamente aleatorio. Durante el estudio se evaluaron 2 controles: control absoluto (abiótico) y control relativo (AN) y

2 tratamientos FIC y SIS cada uno por triplicado (n=3). El proceso de biorremediación fue evaluado durante 127 d con 5 eventos de muestreo (EM), ~25 días (Tabla 10). En cada EM, se tomaron 2 muestras aleatorias (n=2) por cada UE, para un total de 6 muestras por tratamiento/EM. A cada muestra se le realizó análisis fisicoquímicos (nutrientes, % humedad y peso seco, pH y TPHs) y microbiológicos (recuento de heterótrofos y degradadores de HCs).

Tabla 10. Eventos y días de muestreo durante el estudio.

Evento de muestreo	Días de muestreo
1	0
2	28
3	63
4	99
5	127

5.5 Descripción de los tratamientos

Con base en las concentraciones observadas de nutrientes: nitrato, amonio y fósforo (12.04 ± 2.8 , 4.50 ± 3.7 y 30.82 ± 0.2 mg/Kg_{ps}, respectivamente) y el balance de masas obtenido en los análisis preliminares de la mezcla suelo: petróleo, se ajustó la concentración a una relación de C:N:P 100:10:1. La adición de los tratamientos se realizó al inicio del estudio y en la mitad (día 63) (50:50%) para generar un aporte equitativo en el tiempo de nitrógeno y fósforo (Bragg *et al.*, 1994; Marguassin y Schinner, 1997; Marguassin *et al.*, 2000, 2003).

5.5.1 Control absoluto (abiótico).

El control abiótico del estudio (T1) fue considerado como el control absoluto del estudio. Se empleó el esterilizante para suelos Basamid®, BASF (Anexo C). Este compuesto fue seleccionado por su alta efectividad y baja toxicidad en el ambiente. Adicionalmente, los compuestos que se derivan del Basamid no son persistentes en el medio ambiente y su degradación es relativamente rápida (1-2 semanas) (BASF, 2000). La concentración de Basamid® utilizada y el modo de aplicación se realizó según recomendaciones de la casa comercial (BASF), adicionando 70 g de Basamid® por m² (Anexo D) (Sarate, 2003). Antes de la adición del Basamid®, el suelo fue humedecido (40-50% de la capacidad de campo) durante 5 días. Se adicionaron ~17 g del esterilizante sobre el área (0.24 m²) de cada UE. El Basamid® fue esparcido y homogenizado de manera uniforme, empleando equipo de protección adecuado sobre la superficie previamente humedecida (Fritsch y Huber, 1995). Las UEs fueron tapadas con un plástico para evitar la evaporación del ingrediente activo (Dazomet).

5.5.2 Control relativo

El control relativo (T2) contenía la mezcla suelo: petróleo para evaluar efectos del volteo manual.

5.5.3 Adición del FIC

Para evaluar el efecto del FIC (tratamiento 3) se adicionó triple quince (15:15:15, C:N:P) marca Fergon® (Anexo E). Este fertilizante se

seleccionó porque ha sido utilizado en diferentes estudios de biorremediación de suelos, es económico, de fácil adquisición y manejo (Belloso *et al.*, 1998; Cleves y Sandoval, 2001; Marguesin y Shinner 1997, 2001).

Los análisis preliminares de la mezcla suelo: petróleo indicaron una concentración de ~21,500 mgTPH/Kg_{ps} y 2,129 mg N/Kg_{ps}, El balance de masas indicó que era necesario adicionar ~ 40.0 g de N por UE (Anexo F). El FIC fue aplicado en 2 EM, día 0 y 63 (50:50%). Debido a que la presentación del triple quince es en forma de gránulos secos y de acuerdo a las instrucciones de la casa comercial este fué disuelto en agua antes de su aplicación. 134 g de FIC fueron adicionados en 1 Lt de agua agitando la solución con plancha magnética durante 1 h para obtener una mezcla homogénea. Finalmente, la solución fue dispersada uniformemente en la mezcla suelo: petróleo.

5.5.4 Adición de SIS

El tratamiento 4 (T4) evaluó la adición de nutrientes en forma de SIS: NH₄NO₃ (Mol Labs) como fuente de nitrógeno y K₂HPO₄ (JT Baker) como fuente de fósforo y potasio (Wrenn *et al.*, 1994; Marguessin *et al* 2000).

De acuerdo a la cantidad de N necesarios (~ 40.0 g de N) se cálculo la cantidad requerida de NH₄NO₃ por UE, que fué de ~114 g (Anexo G). Al igual que el FIC, las SIS fueron adicionadas a un 50% de la relación al inicio del estudio (día 0) y en la mitad del estudio (día 63) 50:50. La solución

se preparó en 1 Lt de agua destilada con agitación en plancha magnética durante 1 h. Con base en la relación escogida fue necesario adicionar ~201 mgP/Kg_{ps} por cada UE. Finalmente se determinó que se requerían ~21.3 g de K₂HPO₄ por cada UE, teniendo en cuenta la cantidad de suelo (18,66 Kg_{ps}) necesitado por mesocosmo; las SIS se mezclaron en 1 Lt de agua destilada. El procedimiento se repitió por cada una de las UEs seleccionadas aleatoriamente para este tratamiento (Tabla 11).

Tabla 11. Composición de los tratamientos utilizados durante la bioestimulación.

Tratamiento	UE	Sales inorgánicas (g/UE)	Fertilizante 15:15:15 (g/UE)	Basamid G® (g/UE)
T1	1 2 3	-	-	
T2	1 2 3	-	-	17
T3	1 2 3	57 NH ₄ NO ₃ 10.7 K ₂ HPO ₄	-	-
T4	1 2 3	-	-67	

Adición al 50% de la relación C:N:P, en los días 0 y 63.

5.6 Aireación de los mesocosmos

Durante el metabolismo aerobio de los compuestos orgánicos oxidados, las bacterias utilizan el oxígeno (O₂) como aceptor final de electrones, por lo que resulta de gran importancia su suministro durante la biorremediación (Eweis *et al.*, 1999). Para la biodegradación de HCs, la manera más rápida, efectiva y económica para generar el aporte de oxígeno es mediante las actividades como el arado, volteo mecánico o manual y el trillado (Acosta *et al.*, 1995; Ordóñez, 1998). El proceso de aireación de los mesocosmos se realizó 2 veces por semana por volteos

manuales, empleando palas de jardinería metálicas, con el fin de garantizar el oxígeno necesario para el metabolismo de los microorganismos, además de generar una mayor uniformidad a la mezcla (Figura 3).



Figura 3. Proceso de volteo manual realizado en los mesocosmos.

5.7 Seguimiento fisicoquímico y microbiológico de los tratamientos

5.7.1 Recolección y manipulación de muestras

En cada evento de muestreo (EM) se tomaron 2 muestras compuestas aleatorias ($n=2$) por UE; utilizando una cuadrícula de muestreo (10 x 10 cm) (Figura 4). Cada cuadrante se enumeró de 1 hasta 24, y seleccionaron aleatoriamente 3 cuadrantes por muestra compuesta. Durante el procedimiento se utilizó guantes de látex desechables, y las muestras se tomaron con espátulas metálicas, previamente limpiadas con isopropanol al 60% evitando de esta manera contaminación cruzada. Se tomaron ~250 g de muestra, los cuales se depositaron en bolsas plásticas

resellables (Multinitta ®). Cada muestra se rotuló como había sido previamente descrito (Figura 5). Durante cada EM se realizaron análisis fisicoquímicos y microbiológicos (Tablas 12 y 13).

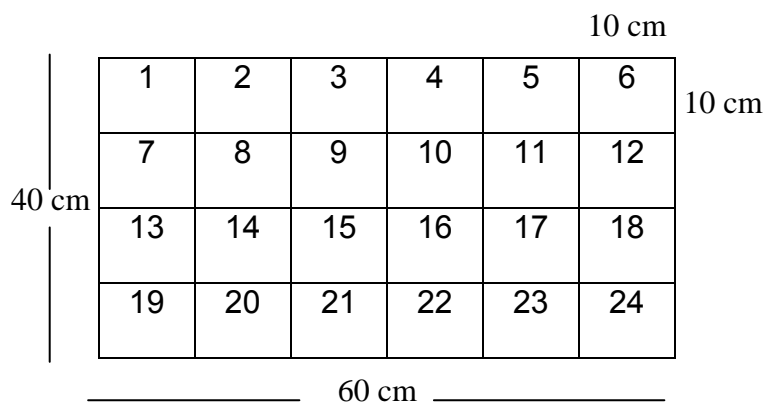


Figura 4. Cuadrícula de muestreo utilizada en los mesocosmos.



Figura 5. Muestreo de los mesocosmos

Tabla 12. Métodos de análisis físico-químicos realizados durante el estudio

DETERMINACIÓN	MÉTODO
% Humedad	(IGAC, 1994) (Anexo Q).
pH	Método 9045c EPA (Anexo R).
N-NO ₃ ⁻ (mg/Kg _{ps})	Método No. 366 HACH a 500 nm (Anexo A).
N-NH ₄ ⁺ (mg/Kg _{ps})	Método No. 391 HACH 425 nm (Anexo A).
P (mg/Kg _{ps})	Método No. 521 HACH 890 nm (Anexo A).
TPH (mg/Kg _{ps})	Método de extracción por agitación mecánica (Schawab <i>et al.</i> , 1999) y determinación gravimétrica método 9071 (EPA, 1994).
TPH (mg/Kg _{ps})	ASTM D 5831-96

Tabla 13. Análisis microbiológicos en suelo determinados durante el estudio

DETERMINACIÓN	MÉTODO
Determinación de microorganismos degradadores de HCs	Número más probable (NMP) microorganismos degradadores de HCs (Braddock y Brown, 1990; Haines, 1996)
Recuento de heterótrofos	Recuento en agar infusión suelo (ASM, 1986)

5.8 Métodos empleados para el análisis y determinación de TPHs en suelos

Los TPHs describen una gran familia de cientos de compuestos químicos originados del petróleo crudo. Los TPHs comúnmente, se refieren a HCs de petróleo, HCs extractables o aceites y grasas; y están definidos de acuerdo al método analítico empleado para su determinación (Weisman, 1998; Zhu *et al.*, 2001).

5.8.1 Método D-5831(ASTM, 1995) para la determinación de combustibles en suelos

Este método se emplea para la determinación de compuestos aromáticos de combustibles presentes en suelos. El método puede ser usado para identificar la presencia de contaminación o para realizar una estimación de la concentración del combustible presente en el suelo, por medio de la ecuación obtenida en una curva de calibración (ASTM, 1995; Sorini *et al.*, 1997). El método de ASTM se seleccionó por ser un método sencillo, que permite el procesamiento de un gran número de muestras por día (~ 30 muestras/día), en un tiempo corto (~10 min/muestra), es efectivo para la determinación de TPHs en suelos ricos en materia orgánica, los cuales comúnmente presentan interferencias, y además por ser relativamente económico (< \$20.000 por muestra) (Sorini *et al.*, 1997; Roldan, 2002). Adicionalmente, este método ha resultado ser una herramienta efectiva para la evaluación y el seguimiento de diferentes procesos de biodegradación de HCs en suelos (Sorini *et al.*, 1997; Cleves y Sandoval, 2001; Roldan, 2002).

La técnica consiste en la extracción de los HCs con isopropanol y determinación espectrofotométrica. La adición de óxido de calcio es empleada para remover las interferencias de la humedad del suelo y los ácidos húmicos presentes en la muestra que podrían causar falsos positivos en los resultados (ASTM, 1995).

Inicialmente, se realizó una curva de calibración empleando petróleo para contaminar el suelo (crudo Castilla, API 12°) a partir de una solución inicial de 1,000 mg/L (solución madre). Posteriormente se prepararon 5 soluciones estándares de: 10.0, 20.0, 50.0, 80.0 y 90.0 mg/L (n=2). Las concentraciones de los estándares fueron seleccionados por estar dentro del rango de 0.000 a 1.000 Unidades de Absorbancia (AU). El alcohol isopropílico se empleó para llevar el instrumento a cero (blanco reactivo). Muestras cercanas a 1 AU fueron diluidas dentro del intervalo de absorbancia, empleando isopropanol y la lectura fue corregida por el factor de dilución. La curva de calibración se creó a partir de los estándares (mg/L vs Absorbancia: Abs) y se utilizó para calcular la concentración de TPHs (mg/L) con relación a los resultados obtenidos (Abs) de las muestras. La concentración obtenida en mg/mL fué multiplicada por un factor de 10 para encontrar la concentración en mg/Kg (ASTM, 1995). El factor de 10 se empleó debido a la relación volumen de solvente (mL) / masa de suelo (g): 50 mL de alcohol isopropílico: 5 g de suelo. Los resultados fueron expresados como mg/Kg_{ps} (Standard Methods, 2000)

Se colocaron 5 g de muestra de suelo en un frasco de vidrio de boca ancha de ~125 mL, previamente pesado. Se añadieron 5 g de óxido de calcio en polvo, grado reactivo (Sigma®; LIME) y se mezclaron con una espátula metálica hasta obtener una mezcla completamente seca. El óxido de calcio fué secado previamente a 900°C en una mufla durante 12 h, y almacenado en un desecador hasta su uso. 50 mL de alcohol isopropílico (grado reactivo) (Mallinckrodt®) fueron adicionados a la mezcla, y se colocó

una barra magnética (teflón®; VDRL) en la misma botella, para su posterior agitación en plancha magnética (Lab-line; Pyro-Magnestir) durante 3 min. Después de ~5 min de sedimentación, 10 mL de sobrenadante fueron recolectados con una jeringa desechable, posteriormente este se filtró empleando cartuchos de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0.45 μm x 13 mm (Millex ®; LCR). El extracto fue colocado en celdas de cuarzo de 1cm de ancho, y medido a 254 nm en un espectrofotómetro UV (Jenway 6405 UV/Vis).

Como parte del control de calidad, durante el estudio se evaluaron blancos de laboratorio (BL) (isopropanol), soluciones estándares, arena sin contaminar (ASC) previamente secadas en una mufla a 550° C durante 1 h para eliminar la materia orgánica presente, arena contaminada con HCs (AC), suelo orgánico (SO) y suelo orgánico contaminado (SOC). Estas muestras fueron analizadas con el fin de determinar y comparar la eficiencia de extracción de los métodos, y detectar posibles interferencias de materia orgánica presente. El BL permitió verificar posibles interferencias causadas por los reactivos y materiales de vidrio utilizados durante el análisis. El valor obtenido en AU, fué sustraído de los resultados obtenidos para cada lote de muestras.

Los parámetros de precisión y exactitud de la técnica fueron evaluados de acuerdo a los porcentajes de coeficientes de variación (%CV) y los porcentajes de recuperación (% P) que se calcularon durante cada evento de muestreo (EM). Se realizó un *spike* (adición de una concentración conocida) por cada lote de corrida (~ cada 20 muestras). Los

spikes se utilizaron para verificar que el % de P de la técnica estuviera en un rango del 80-120% (ASTM, 1995). El *spike* fué utilizado a una concentración de 60,000 mgTPH/Kg_{ps}, que era de 2 a 3 veces la concentración esperada en la muestra (~ 20,000 mgTPH /Kg_{ps}). El % de P fué calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\% P = (A - B / \text{Concentración del spike}) \times 100.$$

A = Concentración de mgTPH /Kg_{ps} de de la muestra con *spike*.

B = Concentración de mgTPH/Kg_{ps} de la muestra sin *spike*.

(Ecuación No 1)

5.8.2 Método EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) para la determinación de TPHs en suelos

Este método, permite la extracción de HCs de petróleos volátiles y semivolátiles de suelos y sedimentos. La agitación mecánica, asegura un completo contacto del solvente con la fase sólida, incrementando así la eficiencia de la extracción (Schawab *et al.*, 1999). Este método presenta diferentes ventajas tales como: (a) es una técnica sencilla y eficiente para la extracción de HCs de petróleo de diferentes muestras de suelo, (b) asegura un total contacto con la fase sólida, incrementando la eficiencia de la extracción si se emplean varios ciclos, (c) requiere equipos e instrumentos relativamente simples (d) consume bajas cantidades de solventes orgánicos y (e) el periodo de extracción es corto ~3 h, en comparación con otros procesos (p.e., Soxhlet) (Schawab *et al.*, 1999).

Se pesó 1.0 g de suelo en una balanza analítica (Mettler: AJ 150) y se colocaron en un tubo de 50 mL (Corning). Se adicionaron 10 mL de una mezcla diclorometano (DCM) grado reactivo (Mallinckrodt AR®) y acetona (ACN) grado reactivo (Mallinckrodt AR ®) en proporción 1:1. Esta mezcla fue seleccionada porque permite una mayor eficiencia en el proceso de extracción de los TPHs (Schawab *et al.*, 1999). La mezcla fue colocada en una plataforma de agitación orbital (Innova; modelo 2001) a 120 ciclos/min por 30 min. Transcurrido este tiempo, los tubos fueron puestos en una centrifuga (IEC Centra; MP-4R) a 1,054 rpm por 10 min. El sobrenadante fue recogido en un frasco de vidrio de ~ 50 mL, y el *pellet* (muestra de suelo) fue nuevamente resuspendido en 10 mL de la mezcla DCM: ACN (Figura 6); el procedimiento se repitió 3 veces. El volumen final del extracto se filtró con papel whatman No 40 (Ashless 125mm X 100) recubierto con 1 g de silica gel (Merck®, 20 mm) secada previamente durante 1 h en una mufla a 250°C, el filtro fue colocado en un embudo de vidrio. El extracto filtrado fue puesto en tubos de vidrio de 50 mL (Kimax ®) previamente pesados ($\pm 0,0001\text{g}$). Los tubos se colocaron en baño María (Precision Scientific) a una temperatura de $55 \pm 5^\circ \text{C}$, ~2 h hasta su completa evaporación. Los tubos se colocaron en un desecador ~2 h hasta alcanzar un peso constante y los tubos fueron pesados nuevamente en una balanza analítica (Mettler AJ 150). La concentración de TPHs presente en las muestras se obtuvo por la diferencia del peso del tubo antes y después de la evaporación (Ecuación 2).



Figura 6. Proceso de extracción de TPHs del suelo contaminado, por el método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994)

$$\frac{mgTPH}{kg_{ps\ suelo}} = \frac{ganancia.en.peso.del.tubo(g) * \left[\frac{1000mgTPH}{gTPH} \right]}{peso.del.solido(g) * fracción.de.peso.seco(ps) * \left[\frac{kg_{ps\ suelo}}{1000g.suelo} \right]}$$

(Ecuación No 2).

Calculo de la fracción de peso seco:

Se pesaron ~10.0 g de suelo y se secaron en un horno (UM MEMMERT-300) durante toda la noche utilizando bandejas de aluminio a una temperatura de $105 \pm 0.5^{\circ}C$. Transcurrido este tiempo se dejó enfriar la muestra en un desecador a peso constante para determinar la fracción de peso seco (Ecuación 3).

$$\text{Fracción de peso seco} = \frac{\text{Peso de la muestra seca (g)}}{\text{Peso de muestra húmeda (g)}} \quad (\text{Ecuación No 3}).$$

Durante esta parte del estudio se emplearon 2 tipos de blancos de laboratorio para evaluar el control de calidad: (a) un BL y (b) un blanco de laboratorio contaminado con petróleo (crudo Castilla) (BLC). El BL fue preparado con arena libre de contaminación, la cual se secó previamente en una mufla a 550°C durante 1 hora asegurando la eliminación de materia orgánica presente. El BLC se obtuvo contaminando el BL a una concentración de 40,000 mg/Kg_{ps} de petróleo (crudo Castilla).

Adicionalmente, se realizaron *spikes* del suelo contaminado utilizado durante el estudio a una concentración de 60,000 mgTPH/Kg_{ps}; adicionando ~0.06 mg de petróleo (crudo Castilla). El % de P fué obtenido al dividir el peso incrementado de las muestras con el spike, por el cambio de peso del blanco del *spike*, empleando la ecuación No 1. Los % P fueron considerados aceptables si el valor teórico se encontraba dentro del rango ~ del 75% y 115% (EPA, 2000).

5.9 Análisis de nutrientes.

5.9.1 Análisis de nitratos (N-NO₃⁻).

Los análisis de nutrientes se realizaron en el laboratorio de USBA de la PUJ. Previo al proceso de extracción y análisis de nutrientes (nitratos, amonio y fosfato), el suelo se secó en un horno (UMMEMMERT-300) a 60.0 ± 0.5 °C, durante toda la noche (HACH, 1994). Esto se realizó para

transformar los resultados a peso seco (Kg_{ps}). El suelo fué tamizado a través de una malla de 20 mm (HACH, No 18624-00) para obtener un tamaño de partícula uniforme, removiendo todos los fragmentos de rocas, raíces, tallos, etc. Se tomaron 4.2 g de suelo tamizado empleando una cuchara graduada HACH No 17044-00 y se colocaron en una botella de 25 mL (HACH; No 18624-00), y se adicionaron 25 mL de agua desionizada. Se añadieron ~ 0.02 g de polvo de extracción de nitrato (HACH; No 14556-46), y se agitaron durante ~ 30 s. El proceso de extracción para la determinación de nitratos y amonio se realizó siguiendo el mismo procedimiento HACH (1994) (Figura 7)



Figura 7. Proceso de extracción en suelos para determinación de nitratos y amonio (HACH, 1994).

Para la cuantificación de N-NO_3^- se empleó el método No 366 ($\lambda=500\text{nm}$) (HACH, 1994) usando un espectrofotómetro (HACH DRL-2000) (Anexo H). La intensidad de color rojo indicó la concentración en mg/Kg_{ps}

de N-NO_3^- presente en la muestra (Figura 8). Para el control de calidad, se corrieron blancos de laboratorio con agua desionizada para determinar cualquier tipo de interferencia con los reactivos y/o materiales. El valor obtenido del BL en AU, fue sustraído al valor obtenido en AU para ese lote de muestras.



Figura 8. Determinación de nitrato en muestras de suelo empleando el método No 366 ($\lambda=500\text{nm}$) (HACH, 1994).

Durante el análisis se realizaron pruebas de precisión y exactitud empleando estándares comerciales (HACH, 1998) y preparados en el laboratorio (Standard Methods, 1995) (Anexo I) a una concentración de 10 mg/L de N-NO_3^- ; este valor fue transformado a $\sim 52 \text{ mg N-NO}_3^-/\text{Kg}_{\text{ps}}$ determinando el factor de conversión (HACH, 1994). Para la determinación de la precisión del método se preparó una solución estándar de 10 mg/L, el estándar fue analizado 5 veces ($n=5$) siguiendo el mismo procedimiento

que para una muestra normal. La desviación estándar (DS) obtenida se comparó con una DS de ± 2.3 mg N-NO₃⁻/Kg, reportada por el método (HACH, 1994; 1998). Para la evaluación de la exactitud se utilizó el estándar comercial de HACH (1994) de 10 mg/L de N-NO₃⁻ y se preparó un estándar en el laboratorio de 41 mg N-NO₃⁻/Kg. Los estándares leídos por esta técnica debería tener una concentración de 44 mg N-NO₃⁻/Kg. (HACH, 1994).

5.9.2 Determinación de amonio (N-NH₄⁺)

La extracción para la determinación de amonio en suelo fué la misma que la empleada para nitratos (HACH, 1994); la cuantificación de N-NH₄⁺ se realizó utilizando el método No. 391 ($\lambda=425$ nm) (HACH, 1994) (Anexo H). La intensidad de color amarillo en la muestra indicó la concentración en mg N-NH₄⁺/Kg_{ps}.

Para el control de calidad, al igual que para la determinación de nitratos y fosfato; se corrieron BL con agua desionizada. El valor obtenido del BL en AU, fue sustraído al valor obtenido en AU para ese lote de muestras. Se determinaron parámetros de precisión y exactitud. Para la evaluación de la precisión del método se preparó una solución estándar de 139 mg N-NH₄⁺/Kg (Standard Methods, 1995) (Anexo I). El estándar fue analizado siguiendo el mismo procedimiento que para la muestra de suelo, pero se emplearon 25 mL de la solución estándar en lugar de 1 mL del extracto diluido (HACH, 1994). Este procedimiento se realizó 5 veces (n=5), luego se evaluaron las desviaciones estándar obtenidas, se compararon

con los reportados por el método ($\pm 1.4 \text{ mg N-NH}_3^+/\text{Kg}_{\text{ps}}$) (HACH 1994; 1998). Para la evaluación de la exactitud se preparo una solución de estándar preparada en el laboratorio de 1 mg/L N-NH_3^+ , este valor fué transformado a $\sim 132 \text{ mg N-NH}_3^+/\text{Kg}$ utilizando el factor de conversión (HACH, 1998).

5.9.3 Determinación de fósforo (P)

Para la determinación de P se empleó el método de extracción con bicarbonato de sodio, el cual permite evaluar la fracción de P disponible presente en el suelo (HACH, 1998). Se colocó 1.0 g de suelo seco y tamizado utilizando una cuchara graduada (HACH; No 510-00) en una botella de 25 mL a la cual se le adicionaron 20 mL de agua desionizada. Luego se agregaron $\sim 0.9 \text{ g}$ de extractante No 3 para suelos (HACH, No 14556-46). La botella fue tapada y agitada durante 30 s . Se adicionaron $\sim 0.02 \text{ g}$ de polvo de extracción para nitrato (HACH, No 20441-68) y se agitó nuevamente durante $\sim 30 \text{ s}$.

Para la cuantificación de fosfato se empleó el método espectrofotométrico No 531 a una longitud de onda de 890 nm (HACH, 1998 (Anexo H). Para el control de calidad se evaluaron parámetros de precisión y exactitud. Se preparó una solución una solución de 16.3 mg/L de P (Standard Methods, 2000) (Anexo G), El valor fué transformado a $\sim 33 \text{ mgP/Kg}_{\text{ps}}$ (HACH, 1998). El estandar fue analizado 5 veces ($n=5$) siguiendo el mismo procedimiento que para una muestra. Se comparó la DS obtenida con el valor reportado por el metodo ($\pm 0.3 \text{ mg/Kg}$ de P) (HACH, 1994;

1998). Para la evaluación de la exactitud se tomaron 0.5 mL de la solución estándar de 16.3 mg/L de P en lugar de 5.0 mL del extracto, esto debería tener una lectura de 32.6 mg/Kg de P.

5.10 Análisis microbiológicos.

Para el recuento de los microorganismos se empleo el método de recuento en placa de heterótrofos totales en agar infusión suelo (ASM, 1986) (Anexo J) y el recuento de microorganismos degradadores de HCs se realizo por el método de NMP en placas de 96 pozos con el indicador INT (Haines, 1996; Wreinn y Venosa, 1995).

5.10.1 Preparación y homogenización de las diluciones

Se diluyeron 10 g de suelo en 90 ml de agua bufferada estéril (Standard Methods, 1995) (Anexo K) obteniendo una dilución 10^{-1} . La mezcla se agitó durante 30 min a 150 rpm en una plataforma de agitación orbital (Innova®), para lograr una mayor homogenización de la mezcla. La agitación facilita el desprendimiento de los microorganismos de la matriz del suelo (Towsend *et al.*, 2000). A partir de esta dilución se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-6} . Este rango fue seleccionado debido a que los recuentos preliminares de microorganismos heterótrofos realizados en el suelo se encontraron dentro de este rango de dilución.

5.10.2 Recuento en superficie de microorganismos heterótrofos en placa.

El método de recuento en placa en superficie se emplea para la recuperación y conteo de microorganismos totales presentes en el suelo (Hurst *et al.*, 1997). El análisis de heterótrofos totales estima la población de microorganismos presentes en la muestra de suelo y se basa en la dilución seriada de una muestra obteniendo colonias contables que son expresadas como UFC/g_{ps} (Standard Methods, 2000; Marguesin y Schinner, 2001) El recuento se realizó a partir de los microorganismos viables que son capaces de crecer en medio enriquecido (agar infusión suelo, AIS) (ASM, 1984) (Anexo J) y formar colonias visibles (Figura 9). Este medio suple las necesidades nutricionales que se encuentran presentes en su hábitat natural al ser preparado con el suelo de estudio. Se inocularon 0.1 mL de las últimas diluciones por duplicado y se llevó a incubar a temperatura ambiente durante 7 d (ASM, 1984).

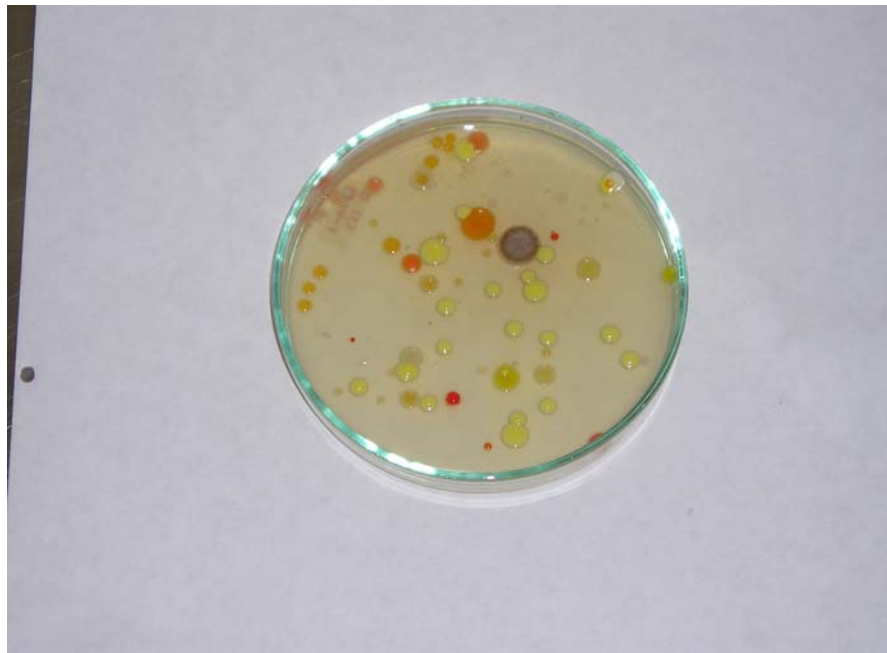


Figura 9. Colonias de microorganismos heterótrofos en AIS.

5.10.3 Determinación de microorganismos degradadores de HCs en placas de 96 pozos por la técnica de NMP.

Para el desarrollo de esta técnica se utilizó un medio líquido mineral (Caldo Bushnell Haas, BH) (Anexo L), enriquecido con HCs (ACPM) (Fendipetroleo, Nacional). Para confirmar la presencia o ausencia de microorganismos metabólicamente activos se utilizó el indicador violeta lodonitrotetrazolium (INT) (Sigma®) (Anexo L). Este compuesto compete con el oxígeno por los electrones de la cadena respiratoria, reduciéndose a un compuesto insoluble de color de rosado-rojo, en caso de haber metabolismo activo (Haines *et al.*, 1996; Venosa and Wrenn, 1995). La formación de un precipitado del precipitado indica la reducción del INT a formazan insoluble (Haines *et al.*, 1996).

Para el desarrollo de esta técnica se utilizaron placas de 96 pozos, previamente esterilizadas con luz UV durante 1 h. En cada uno de los pozos se agregaron 180 µL de caldo BH (Venosa y Wrenn, 1995), a continuación se adicionó 5 µL de ACPM como fuente de energía. Finalmente cada uno de los pozos seleccionados fue inoculado con 20 µL de las diluciones (10^{-2} – 10^{-6}) del suelo preparadas previamente en agua bufferada estéril realizándose 5 repeticiones por dilución (n=5). En cada placa se realizaron 3 controles: (a) control del medio (BH) para evaluar la ausencia de fuentes de carbono y microorganismos contaminantes, (b) BH con ACPM para evaluar la presencia de microorganismos contaminantes, y (c) BH con la menor dilución confirmando que la única fuente de carbono del medio es el ACPM.

Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 d y transcurrido este tiempo, a cada uno de los pozos se les adicionó 50 μ L de INT 3% (Anexo M) e incubado por 16 h (Haines *et al.*, 1996). Después de la incubación, los pozos fueron evaluados y se realizó la lectura, tomando como positivos los pozos que presentaron una coloración roja-rosada, producida por la reducción del INT (Figura 10). La combinación de pozos positivos/negativos de las 5 diluciones realizadas se analizaron en el programa Most Probable Number Calculator, versión 4.04, 1996 (Venosa y Wrenn, 1995; Cleves y Sandoval, 2001) (Anexo N) y expresados como NMP de microorganismos degradadores por g_{ps}.



Figura 10. Método de NMP para la determinación de microorganismos degradadores de HCs en placas de 96 pozos.

5.10.4 Aislamiento e identificación de microorganismos degradadores.

Las bacterias degradadoras fueron aisladas de los pozos de las diluciones más altas que presentaron crecimiento en el NMP (Brown y

Braddock, 1990; Haines *et al.*, 1996; Wrenn y Venosa, 1996). Estos pozos fueron seleccionados porque existe una mayor densidad de microorganismos degradadores de HCs. Las cepas fueron aisladas en un medio mínimo de sales (agar BH) (Marguessin *et al.*, 2003). Adicionalmente, se estableció una atmósfera saturada de HCs usando sensidiscos humedecidos (papel whattman No 40) con 20 µL ACPM, los cuales se ubicaron en la tapa de la caja de petri (Vives, 1994; Espitia, 2002; Marguesin *et al.*, 2003). Las cajas fueron incubadas durante 15 d a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó una selección macro y microscópica de las colonias que presentaron características similares. Una vez se obtenía crecimiento y se había realizado la selección de las bacterias, las cepas se mantuvieron en agar nutritivo previo a su identificación bioquímica, utilizando las placas de no más de 24 h de crecimiento (Figura 11); los microorganismos fueron identificados mediante pruebas bioquímicas BD BBL para gram-negativos (CRYSTAL™ comercial) (Anexo O).



Figura 11. Crecimiento de bacterias degradadoras de HCs en agar nutritivo; antes de su identificación bioquímica.

5.10.4.1 Preservación de las cepas degradadoras de HCs.

Las cepas degradadoras de HCs aisladas y seleccionadas, fueron conservadas en el laboratorio de USBA- PUJ a -70°C en medio líquido Skim milk 10% (Difco), para ser empleadas en posteriores estudios.

5.11 Análisis estadístico

Inicialmente se realizó un test de Shapiro Wilk (Stadistics 8, 2003) para determinar si los datos seguían una distribución normal. Las variables que no siguieron una distribución normal ($p < 0.05$) se normalizaron con logaritmo en base 10. Posteriormente se realizó el análisis de los resultados empleando un análisis de varianza (ANOVA). Por medio de esta técnica se evaluó la varianza total del conjunto de datos que se dividió en 4

componentes (T1-T4); determinando las diferencias significativas entre cada tratamiento y EM. El análisis de varianza fué soportado con un análisis de comparaciones múltiples de Sheefé para verificar que grupo de tratamientos presentaron las diferencias. Finalmente, se realizó un análisis de correlación entre las variables medidas, las cuales fueron determinadas por medio de correlaciones de Pearson para aquellos datos que siguieron una distribución normal o una correlación de Serman para los datos que no siguieron una distribución normal (no paramétrica).

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Análisis preliminares del suelo

El suelo empleado en el estudio se caracterizó por ser moderadamente ácido, estar constituido en su gran mayoría por arcilla, tener un alto contenido de materia orgánica (MO), baja densidad aparente, nivel moderado de nitrógeno total y nutrientes (nitratos, amonio) y alto contenido de fósforo asimilable (Tabla 14). Las características son representativas de algunos tipos de suelos de la sabana de Bogotá, específicamente en la zona de Zipaquirá-Cundinamarca. Estos suelos tienen texturas medias (menos del 35% de arcilla y menos del 70% de arena) y finas (más del 35% de arcilla), altos contenidos de P (>40 mg/Kg_{ps}), con un pH ácido (4.5-5.5) asociado a la presencia de radicales carboxílicos de la materia orgánica y a la presencia de aluminio intercambiable, y altos contenidos de MO (Garavito, 1980; IGAC, 1979; 1995). Durante el estudio, el alto contenido de arcilla, por lo tanto el pequeño tamaño de poro del suelo, dificultó el proceso de humedecimiento del suelo, la preparación y homogenización de la mezcla suelo: petróleo.

Como parte del control de calidad del estudio, fué necesario la preparación y entrenamiento en los análisis fisicoquímicos y microbiológicos del personal que participó en el estudio, por medio de la evaluación de parámetros de precisión y exactitud. Una vez que el control de calidad fué satisfactorio (comparado con las técnicas analíticas), se procedió al análisis de las muestras de suelo y su comparación con los resultados (nutrientes) obtenidos en el laboratorio del IGAC;

determinándose que no existían diferencias significativas (NSD) (*t-student*, 2 colas, $p < 0.05$) ($n=3$) (Tabla 14).

Tabla 14. Caracterización físico-química y granulométrica del suelo empleado en el estudio y comparación estadística IGAC-USBA ($n=3$).

ANÁLISIS	IGAC	USBA
pH	5.5 ± 0.10	5.10 ± 0.06 NSD
N-NO ₃ ⁻ (mg/Kg _{ps})	21.90 ± 6.1	25.50 ± 4.5 NSD
N-NH ₃ ⁺ (mg/Kg _{ps})	19.60 ± 2.7	12.78 ± 2.48 NSD
Fósforo disponible (mg/Kg _{ps})	75.95 ± 11.10	63.15 ± 1.23 NSD
% de Nitrógeno Total	0.60 ± 0.10%	
% Materia orgánica	18.30 ± 1.84 %	
Densidad aparente (g/cc)	1.08 ± 0.06	
Granulometría (%)	Arena = 21. Limo = 25. Arcilla = 54.	
Clase textural	Arcilloso.	

Fuente: IGAC, 2003; USBA, 2003

6.2 Análisis preliminares a la mezcla suelo:petróleo

La mezcla suelo:petróleo mostró una disminución significativa en las concentraciones de nitratos, amonio y fósforo (Tabla 15) con relación al suelo antes de la adición de los HCs (*t-student*, 2 colas, $p < 0.05$) ($n=3$). La baja concentración de nutrientes hizo necesario la incorporación de productos bioestimulantes en forma de FIC y SIS para suplir las necesidades de algunos macroelementos (N:P) requeridos durante el proceso de biorremediación, siendo ajustada a la concentración previamente descrita (100:10:1) (Atlas, 1981; Atlas y Bartha, 2001).

Tabla 15. Caracterización de la mezcla suelo: petróleo empleados para los cálculos de C:N:P.(n=3)

Análisis	Concentración (mg/Kg_{ps})
^A N-NO ₃ ⁻ (mg/Kg _{ps})	12.04 ± 2.83
^A P (mg/Kg _{ps})	30.82 ± 0.21
^A N-NH ₃ ⁺ (mg/Kg _{ps})	4.5 ± 0.71
^B TPH (mg/Kg _{ps})	21,481.50 ± 2,543.40

Fuente: USBA, 2003; PRODICOM, 2003.

A = Análisis realizados en USBA.

B = Análisis realizado en PRODICOM método 4030 (EPA, 1996) detección infrarroja.

6.3 Evaluación de los controles de calidad de los 2 métodos analíticos empleados para el análisis de TPHs

Uno de los indicadores más importantes de la efectividad de un proceso de biorremediación es la reducción en las concentraciones de TPHs (Douglas *et al.*, 1991; Weisman, 1998; Zhu *et al.*, 2001); por este motivo, es importante realizar un seguimiento adecuado de la reducción de TPHs durante este proceso.

Para comparar la eficiencia de los procesos de extracción y determinación de TPHs por los 2 métodos analíticos se utilizaron 3 tipos de suelos: (a) un suelo orgánico (SO), (b) una arena limpia (AL) y (c) un SO contaminado con petróleo (tipo Castilla) (SOC). Las muestras analizadas al inicio del estudio (día 0) fueron empleadas para comparar la eficiencia de los procesos de extracción y determinación de TPHs por los 2 métodos analíticos. Los métodos fueron comparados basándose en parámetros como: limite de detección del método (LDM), limite de cuantificación (LC), precisión (%CV) y exactitud (%P).

6.3.1 Método D-5831 para determinación de combustibles en suelos (ASTM, 1995)

Se realizaron 3 curvas de calibración para calcular las concentraciones de TPHs presentes en la muestra de suelo por este método (Figura 12). Las pendientes y los interceptos de las curvas de calibración fueron NSD (*t-student*, 2 colas, $p < 0.05$). Los coeficientes de determinación (r^2) de las curvas de calibración (Tabla 16) fueron mayores al valor mínimo aceptado (0.995) (Standard Methods, 2000).

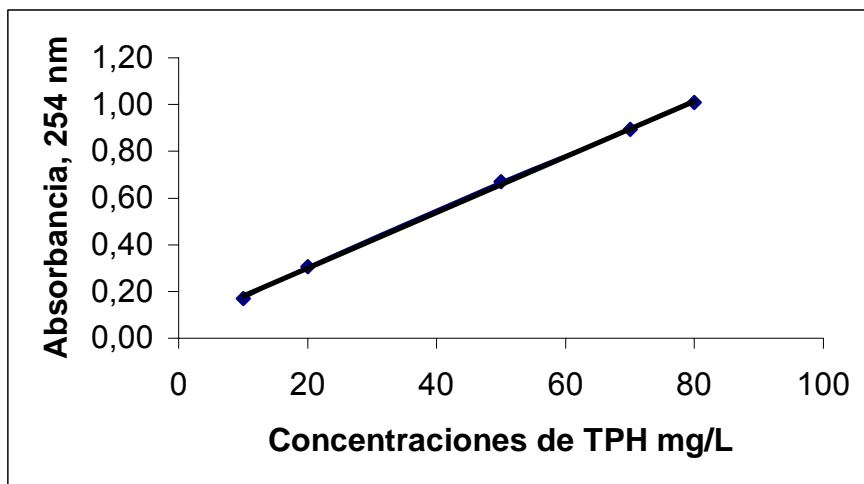
Tabla 16. Curvas de calibración empleadas para la determinación de TPHs por el método D-5831(ASTM, 1995).

Curva de calibración	Pendiente (absorbancia / mg/L)	Intercepto Y (absorbancia)	r^2	n
1	$0.0119 \pm 2.28 \times 10^{-4}$	$0.0616 \pm 4.85 \times 10^{-3}$	{0.9993}	4
2	$0.0134 \pm 3.08 \times 10^{-4}$	$0.0228 \pm 2.30 \times 10^{-3}$	{0.9984}	4
3	$0.0124 \pm 2.46 \times 10^{-4}$	$0.055 \pm 5.03 \times 10^{-3}$	{0.9986}	4

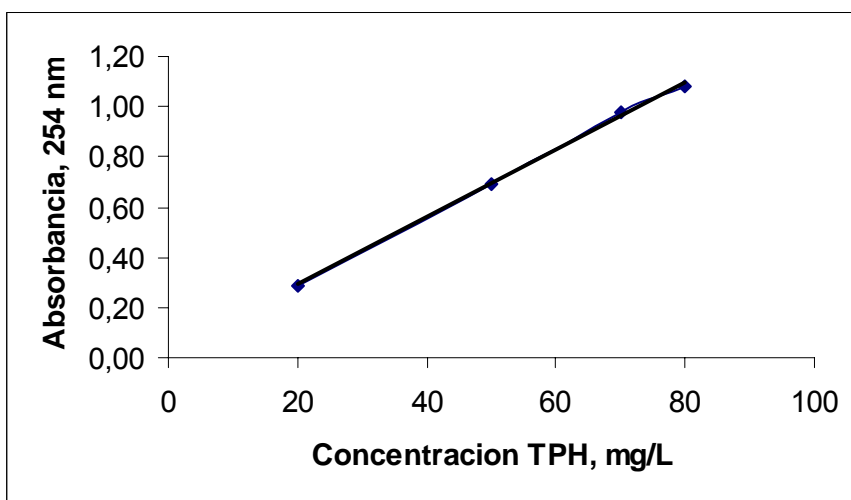
{ } Exceden el valor mínimo aceptado de 0.995.

La absorbancia del estándar más bajo de las 3 curvas de calibración (10 mg/L) fue empleado para calcular el LDM (27.2 mg/Kg TPH_{ps}) (n=6) (Anexo P) el estándar fue corrido 2 veces por cada curva de calibración. Para calcular el LDM se multiplico la DS de la absorbancia del estándar de 10 mg/L por el valor de 3.37 (*t-student*, una cola, $p=0.01$) (Standard Methods, 2000; ASTM, 1995) La concentración de 2.72 mg/L del LDM correspondió a 24.2 mg/KgTPH_{pH} en la muestra de suelo y a 40 mg/Kg_{ps} (ASTM, 1995). El LC del método fué de 183.5 mg/Kg_{pH} y 269.9 mg/Kg_{ps}, este se calculó 10 veces la desviación estándar de la absorbancia del estándar de 10 mg/L (ASTM, 1995) (Anexo O).

A



B



C

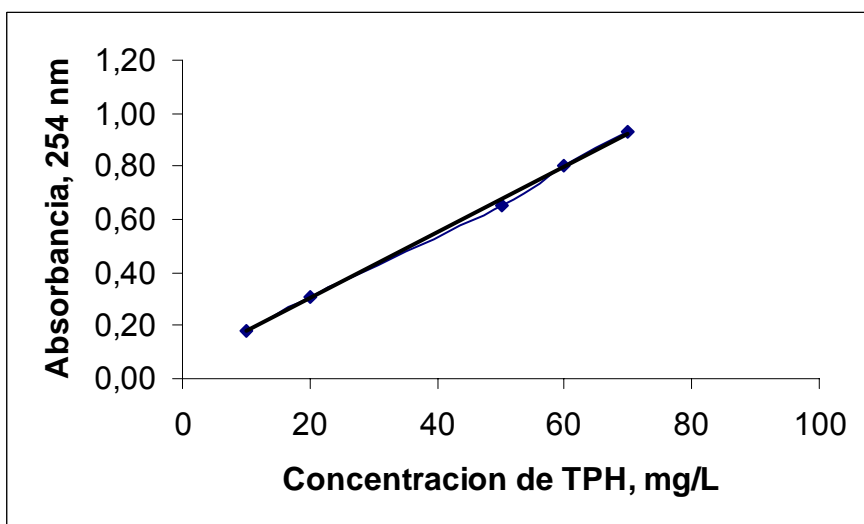


Figura 12. Curvas de calibración realizadas para el método D-5831 (ASTM, 1995).

Para la evaluación de la matrices de laboratorio con el método de ASTM, se analizaron muestras de SO y AL (Tabla17). Las concentraciones de TPHs para la AL fueron más bajas que las del LC. La muestra de SO tuvo una concentración más alta que la del LC. Lo cual puede deberse a que el método de ASTM puede llegar a detectar mayores concentraciones de TPHs en relación a otros métodos ya que es altamente sensible a los componentes aromáticos presentes en las muestras (Sorini *et al.*, 2000). Adicionalmente, Sorini *et al* (1997) reportó que algunos compuestos húmicos presentes en el SO pueden llegar a interferir en la lectura de los TPHs a una longitud de onda de 254 nm. Por lo tanto es probable que este tipo de componentes hayan afectado la lectura, sobrestimando la concentración de TPHs presentes en la muestra del SO.

Tabla 17. Concentraciones de TPHs obtenidas por el método D-5831 (ASTM, 1995) para las matrices de suelo evaluadas (AL, SO y *spikes*).

Muestra	N	TPH mg/Kg_{ps}	%CV	%P del <i>spike</i>
AL	3	78.2 ± 45.22	{± 57.79}	-
<i>Spike</i> de AL	3	39,768.3 ± 4266.13	± 10	95.28 ± 12.53
SO	3	286.5 ± 19.05	± 7	-
<i>Spike</i> de SO	3	34,389.1 ± 5800.42	{± 16}	81.87 ± 5.03

Spike de 8000 mg de crudo Castilla en 200g de muestra. (40,000 mgTPH/Kg_{ps}).

LMD = 40 mg/Kg_{ps}; LC= 269.88 mg/Kg_{ps}

{ } % CV excede el valor publicado de ≤ 11%

Las concentraciones de TPH presentes en los spikes están modificados por su fracción correspondiente de peso seco.

El ASTM reporta valores de % CV para SO y AL contaminados con combustible diesel, de ≤11% (802 ± 80 mg/Kg y 618 ± 61 mg/Kg_{ps},

respectivamente). Lamentablemente ASTM no reporta valores de %CV para SO y AL contaminados con crudo, por lo cual la precisión del método se evaluó teniendo en cuenta los valores reportados para combustible diesel. A pesar de que los %CV del *spikes* de SO fué mayor que el valores reportado, este no fué SD (Test de Barlett, $p=0.05$) por lo tanto la precisión del método no se vio afectada y se consideró como aceptable.

Los %P de los *spikes* de las AL y SO se encontraron dentro del rango recomendado por el ASTM (80-120%) (Tabla17). Adicionalmente, el % de P del SO fue significativamente más bajo que el de la AL, esto pudo haber sido causado por la interferencias que causan algunas sustancias húmicas que se encuentran retenidas en la matriz del SO, y que en algunos casos no son removidos por el óxido de calcio alterando los valores de TPHs. A pesar de esto, la rápida extracción con isopropanol y el subsecuente análisis por espectrofotometría recuperó una cantidad aceptable de TPHs. Los % de P de los *spikes* realizados para AL y SO no presentaron diferencias significativas (*t-student*, 2 colas, $p < 0.05$), adicionalmente estos se encontraron dentro del rango reportado (ASTM, 1995).

Los valores de % CV para las muestras evaluadas durante el estudio excedieron el valor publicado ($>11\%$). Esto pudo haberse debido a la alta variabilidad presente en la mezcla y ha la poca homogeneidad y distribución del contaminante en el suelo ocasionado por el gran contenido de arcilla del suelo.

Tabla 18. Precisión (% CV) durante el estudio obtenidos por el método D-5831 (ASTM, 1995)(n=24).

Día	%CV
0	{13}
28	{14}
63	{13}
99	{18}
127	{14}

{ } %CV exceden el valor publicado de $\leq 11\%$.

Así mismo, durante los 5 eventos de muestreo, se realizaron %P y blancos (Tabla19). Los resultados obtenidos muestran que los % de P obtenidos en los 127 días de estudio se encontraron dentro del rango reportado 80-120% (ASTM, 1995) (Figura 13).

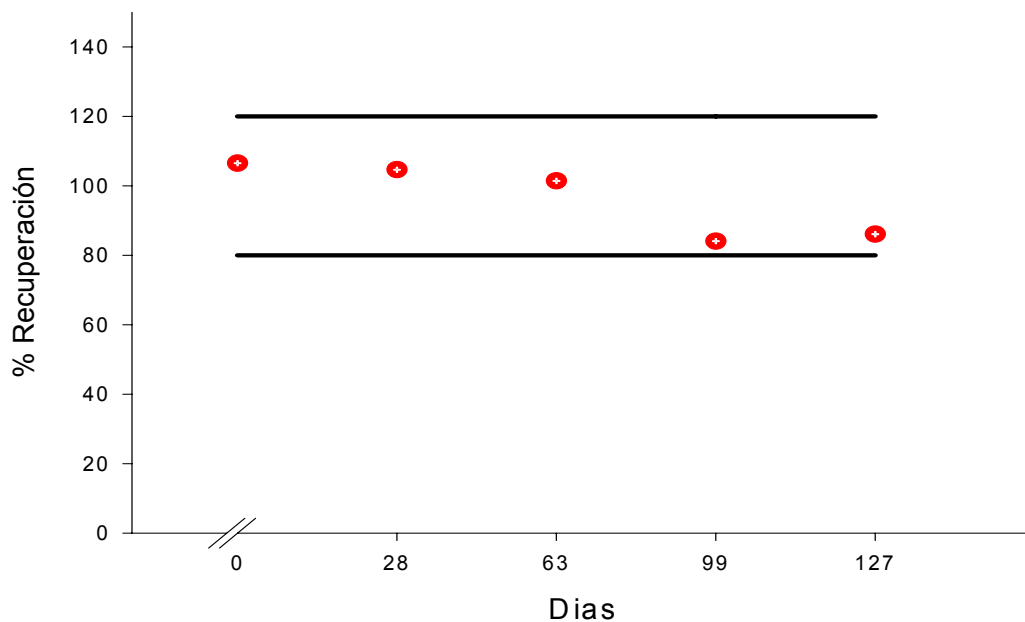


Figura 13. % de recuperación obtenidos por la técnica D-5831 (ASTM, 1995) durante el estudio. Se observa los % de P entre el rango del 80-120%.

Tabla 19. % P y blancos obtenidos por el método D-5831 (ASTM, 1995).durante el estudio

Día	%P	Blancos (mgTPH/Kg_{ps})
0	106.52	48.40 BQL
28	104.65	46.72 BQL
63	101.41	50.08 BQL
99	84.07	53.07 BQL
127	86.10	60.04 BQL

Spikes de ~ 60.000 mg/Kg TPH_{ps} (~ 0.4 g de crudo en 5 g de muestra)
 BQL= Por debajo del LQ = 269.88 mg/Kg TPHps

6.3.2 Método de EAGM (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994)

Este método fué empleado durante el estudio debido a que presenta diversas ventajas durante el proceso de extracción y determinación de TPHs, mencionadas en el numeral 5.8.2. Los métodos de determinación gravimétricos ya han sido evaluados y empleados previamente en el seguimiento de diferentes procesos de biorremediación en suelos (Simonton, 1998; Roldan, 2002; Coulon y Delille, 2003); adicionalmente los métodos gravimétricos han sido aprobados y recomendados por la Agencia de protección ambiental de los Estados Unidos (EPA) para cuantificar bajas concentraciones de TPHs en suelos, sedimentos y lodos (Weisman, 1998).

Para calcular el LCM y el LC se analizaron 7 muestras de AL, ya que este es el mínimo de muestras requeridas para calcular estos parámetros (Tabla20). El LDM fué calculado como 3.14 veces la DS de las replicas de AL (*t-student*, 1 cola, $p= 0.01$) (Standard Methods, 2000). El LC fue calculado como 10 veces la DS de las replicas de AL. Los LDM y LQ fueron de 655.31 mg TPH/Kg_{ps} y 2,085 mg TPH/Kg_{ps}, respectivamente (Anexo Q).

Tabla 20. Replicas de arena limpia empleadas para calcular el LC y LDM para el método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994).

Muestra	mgTPH/Kg _{ps}
1	ND
2	308.9
3	189.1
4	748.3
5	288.1
6	368
7	185.6
Media	347.1
Desviación estándar (DS)	208.5

ND = No detectado.

Aunque se emplearon muestras de AL para calcular el LDM y LC, se pudo observar que las muestras presentaron una concentración relativamente alta de TPHs (748.3 y 368 mgTPH/Kg_{ps}). Esto pudo ser causado por la adherencia de pequeñas partículas que fueron transportadas durante el proceso de filtración con la silica gel a los tubos en donde se realizó la evaporación, afectando el peso final del frasco, y por lo tanto la concentración de TPHs presentes en la muestras. Los LDM reportados para este método son de ~5-10 mg/L en agua y de 50 mg/kg_{ps} en suelos (Weisman, 1998). Por lo tanto durante el presente estudio, concentraciones de TPH \leq 748.3 mgTPH/Kg_{ps} no pudieron ser determinados por este método.

Las concentraciones de TPH presentes en las muestras del SO y las de AL fueron SD que el LCM y que las del LC (t-student, 2 colas, p<0.05) (Tabla21). Estos resultados indicaron que algunos de los componentes presentes en el SO (p.e., ácidos húmicos, materia orgánica) causaron interferencias positivas durante el análisis de TPHs. Estas interferencias

fueron probablemente extraídas por la mezcla 1:1 ACN+DCM y detectados como TPHs. La precisión de las muestras del SO expresados como %CV excedieron el valor reportado (<25%) y esto puede ser causado a que los componentes orgánicos presentes en el SO afectaron la precisión de la técnica a bajas concentraciones de TPH (%CV=44), mientras que a altas concentraciones de TPHs la precisión (%CV=9) no se vio afectada (Tabla21).

Tabla 21. Concentraciones de TPHs de las diferentes matrices utilizando el método EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994).

Muestra	N	mgTPH/Kg_{ps}	%CV	%P
AL	3	415.4 ± 44.4 <LCM= 655.31 mg/Kg _{ps}	± 11	-
Spike de AL. AL + HC	3	39,451.9 ± 968.1	± 2.4	93.7 ± 1.8
SO	3	4,596.5 ± 2023.1	{± 44}	-
SOC	2	48,735.2±4224.5	±9	101.3 ± 7.5
Spike SO SO + HC	3	84,952.7 ± 11164.8	± 13.4	112.9 ± 12.8

Spike de 8000 mg de crudo Castilla en 200g de muestra. (40.000 mg TPH /Kg_{ps}).

{ } % CV excede el valor publicado de < 25%.

Las concentraciones de TPH presentes en los spikes están modificados por su fracción correspondiente de peso seco.

La precisión (%CV) de las muestras del suelo contaminado para los tratamientos y controles estuvieron dentro del valor publicado: %CV=≤ 25% (Standards Methods, 2000; EPA, 2000). De esta manera se determinó una buena precisión en el método a pesar de la alta variabilidad que se presentaba en el momento de la toma de muestras debido al gran contenido de arcillas presentes en el suelo, las cuales dificultaron la

homogenización de la mezcla y que además, podrían haber llegado a interactuar con los solventes disminuyendo su capacidad de extracción.

Tabla 22. Porcentajes de CV obtenidos del suelo contaminado empleado durante el estudio por la técnica de EAGM (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) (n=24).

Día	%CV
0	± 15
28	± 10
63	± 16
99	± 15
127	± 16

Posteriormente se evaluó la exactitud de la matriz de laboratorio, teniendo en cuenta lo reportado por la literatura para los % P siendo de 75-115% (EPA, 2000). Los % de P obtenidos tanto para los *spikes* de AL, SO y SOC se encontraron dentro de este rango (Tabla 23). Sin embargo, el %P del SO fué mayor que los de la AL y SOC pero NSD que la del rango recomendado (*t student*, 2 colas, $p < 0.05$). Todos los análisis realizados en las matrices conocidas de muestras de suelo tuvieron una buena precisión y exactitud (NSD) al ser comparados con los valores anteriormente publicados.

La exactitud evaluada durante el estudio muestran % de P que se encontraron dentro del rango reportado: 75-115% (EPA, 2000) (Figura 14). Los blancos realizados durante el desarrollo del estudio siempre estuvieron debajo del LMD y LC del método (Tabla 23). Los blancos de laboratorio

realizados durante el desarrollo del estudio siempre estuvieron debajo del LC Y LDM

Tabla 23. % P y blancos obtenidos durante los 127 días de estudio por el método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) (n=24).

Día	%P	Blancos (mgTPH/Kg _{ps})
0	110.94	177.96 BDL-BQL
28	90.86	300.45 BDL-BQL
63	100.10	458.97 BDL-BQL
99	99.78	ND
127	103.31	225.63 BDL-BQL

ND: No detectado.

BDL = Por debajo del LMD= 655.31 mg/Kg

BQL= Por debajo del LC = 2085 mg/Kg

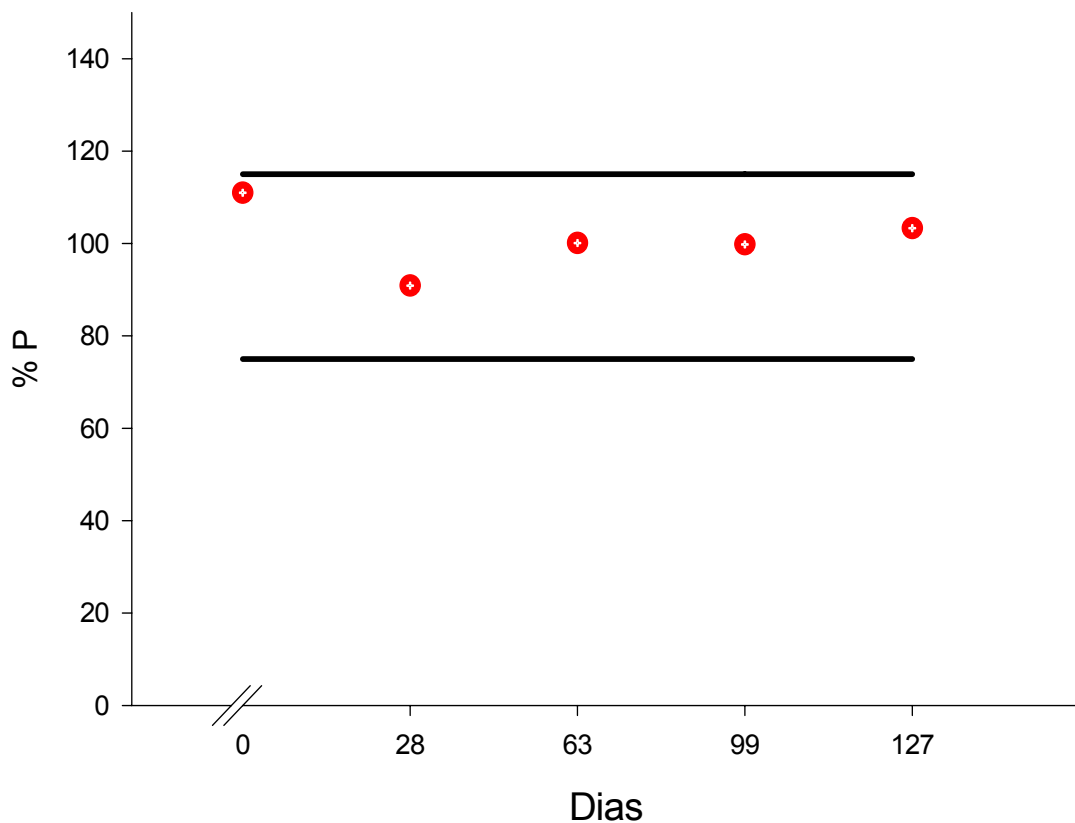


Figura 14. Porcentajes de recuperación (%P) obtenidos por la técnica de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) durante el estudio. Se observa los % de P entre el rango del 75-115%.

6.3.3 Comparación de los 2 métodos analíticos para determinación de TPHs

Los valores calculados para LDM y LC para ASTM fueron más bajos (40 y 269.88 mg/Kg_{ps}, respectivamente) que los reportados por el método EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) (655.31 y 2085 mg/Kg_{ps}, respectivamente). Por lo tanto, pequeñas concentraciones de TPH pudieron ser detectadas mejor y cuantificadas por el método de D-5831 (ASTM, 1995). Esto puede haber ocurrido debido a que los límites de detección para el método de EAMG fueron calculados sobre la DS de la AL, a diferencia de los del ASTM que se calcularon con el estándar de calibración más bajo empleado en las curvas de calibración (10 mg/L). El método D-5831 (ASTM, 1995) presentó interferencias con los componentes orgánicos presentes en las muestras analizadas de SO (bajo % P) (Tabla 24) a diferencia del método EAMG en donde estos % de P fueron significativamente mayores.

La precisión de las muestras de AL y spike de SO para el método D-5831 (ASTM, 1995) estuvieron por fuera del rango recomendado (%CV = ≤ 11%), a diferencia del método EAMG en donde todos los CV fueron < 25%, exceptuando la muestra para el SO. Comparando la precisión (%CV) de las muestras de suelos contaminado durante los 5 EM, indican que hubo DS entre los 2 métodos evaluados (*t-student*, 2 colas, p=0.05). Lo cual pudo haberse debido a la alta variabilidad presente en la mezcla, adicionalmente el método EAMG presentó un bajo % de CV, presentando una mejor

precisión que el del ASTM en las muestras de suelo contaminado (Tabla, 24).

Los % de P de los 2 métodos se encontraron dentro de los criterios publicados para cada uno de ellos tanto para las muestras son *spikes* de AL y SO. Los % de P para las 2 muestras presentes en los spikes de SO fueron SD (T *student*, 2 colas, p=0.05), pero NSD entre los spikes de la AL. (T *student*, 1 cola, p=0.05) (Tabla 16).

Tabla 16. Comparación estadística de los %CV y %P entre los métodos analíticos para determinación de TPHs.

Muestra	Concentración en mg/Kg_{ps}	%CV	%P
<i>Spike</i> de AL.	-	SD	NSD
<i>Spike</i> de SO.	SD	SD	SD
Muestras de suelo (127 d)	SD	SD	-

Los 2 métodos analíticos fueron comparados en cuanto a tiempos de extracción y costos. Los procesos de extracción realizados con isopropanol en el método de ASTM fueron mas cortos (0.06h), mientras que para el método de extracción por agitación mecánica (Schawab *et al.*, 1999) y determinación gravimétrica 9071 (EPA, 1994) fueron mayores (2h). Ambos métodos permiten el procesamiento de grandes volúmenes de muestras en un solo día, ~40 muestras en 6 horas para el gravimétrico, y de ~ 90 muestras para el ASTM.

El método gravimetrico resulta ser menos costoso (~\$20.000 por muestra Vs \$30.000 por muestra, respectivamente) que el de ASTM.

Aunque en el proceso de extracción por el método de agitación mecánica requiere grandes volúmenes de solventes (~40 mL por muestra), los materiales para su procesamiento son menos costosos que los de ASTM, en donde se requieren implementos costosos (p.e., filtros PTFE, óxido de calcio grado reactivo, etc). Este método presentó una mejor precisión y exactitud que el método de D-5831 (ASTM, 1995) reflejados en los %CV y %P encontrados en las muestras de suelos analizadas.

6.4 Biodegradación de TPHs

La concentración inicial de TPHs presente en la mezcla suelo:petróleo fue evaluada por los métodos: infrarrojo: IR (PRODICOM), D-5831 (ASTM, 1995) y EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) (Tabla 17). Se observó que no fueron significativamente diferentes (NSD) entre los 3 métodos evaluados, así como en los 2 laboratorios (PRODICOM Vs USBA) (*t-student*, $p < 0,05$, $n=3$).

Tabla 17. Concentraciones de TPHs obtenidas en la mezcla suelo:petróleo por los 2 laboratorios, métodos (IR, ASTM, EAMG) ($n=3$).

PRODICOM (mgTPH/Kg_{ps})	USBA (mgTPH/Kg_{ps})
IR: 21,481 ± 2,453.40	ASTM: 24,184 ± 2,356.22
	EAMG: 18,368 ± 3,635.15

6.4.1 Evaluación de TPHs por los 2 métodos analíticos

Al inicio del estudio (día 0), las concentraciones de TPHs determinadas por el método D-5831 (ASTM, 1995) y por el método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) no presentaron DS. Durante el

estudio se observó una disminución gradual de los TPHs a través del tiempo para los tratamientos y los controles evaluados (ANOVA, $p < 0,05$, $n=120$) (Figuras 15 y 16).

La reducción más rápida de HCs se observó en los primeros 28 días (Scheffé, $p < 0,05$, $n=48$) (Anexo S), específicamente para los tratamientos con SIS y FIC por los 2 métodos evaluados (EAMG y ASTM) (Figuras 17 y 18) ($16,197.1 \pm 1,354.9$ y $13,851.7 \pm 643$ y $15,737.4 \pm 1,534.2$ y $14,27.6 \pm 1,356$ mgTPH/Kg_{ps}, respectivamente). De igual forma, durante este periodo se presentaron los mayores recuentos de devgradadores de HCs para los tratamientos (70×10^2 y 11×10^3 NMP/g_{ps}, respectivamente). Adicionalmente, durante este período se observaron las mayores tasas de degradación de los tratamientos, siendo significativamente mayores a las de los controles (t-student, 2 colas, $p < 0,05$).

Tabla 18. Tasas de degradación (mg/Kg_{ps}/día) obtenidas por los 2 métodos analíticos durante los primeros 28 días

METODO	CONTROL RELATIVO	CONTROL ABIÓTICO	SIS	FIC
<u>EAMG</u>	160.8	84.57	255.1	230.5
<u>ASTM</u>	187.2	42.18	301.3	238.4

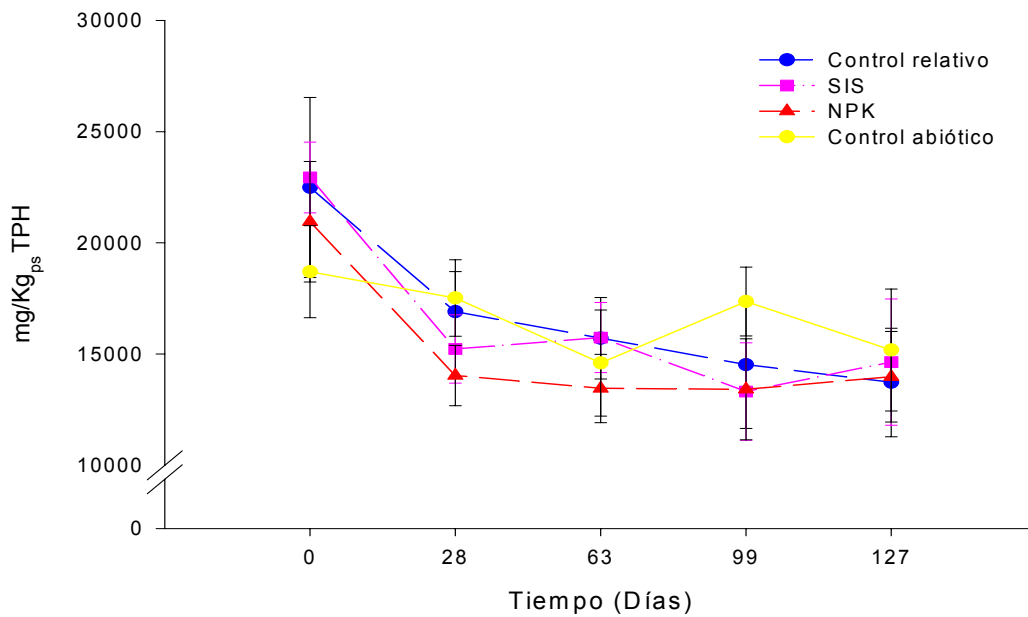


Figura 15. Concentraciones de TPHs durante el estudio por la técnica D-5831 (ASTM, 1995). Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y la DS=1.

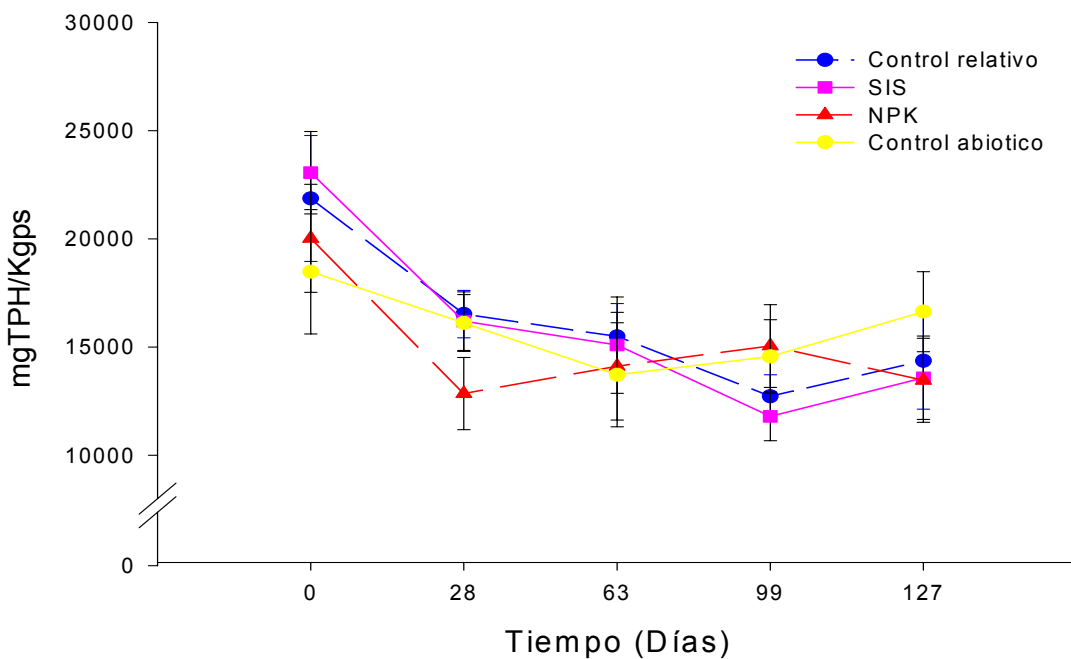


Figura 16. Concentraciones de TPHs durante el estudio por el método de EAMG (Schwab *et al.*, 1999; EPA, 1994). Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y la DS=1.

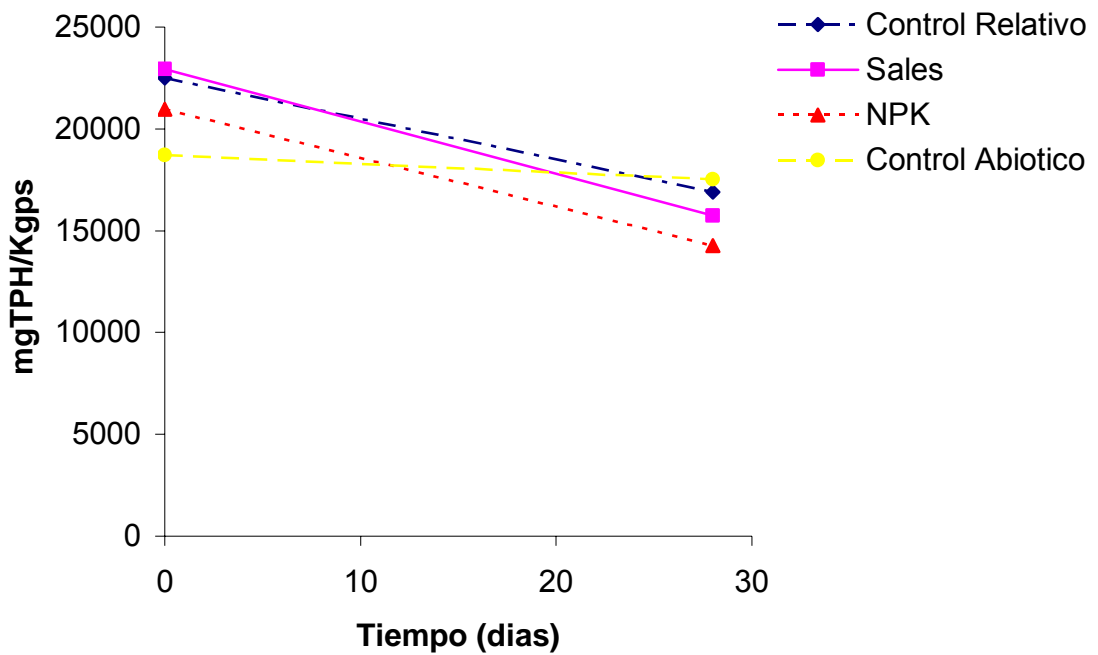


Figura 17. Concentración de TPHs en los primeros 28 días por el método D-5831 (ASTM; 1995). Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6).

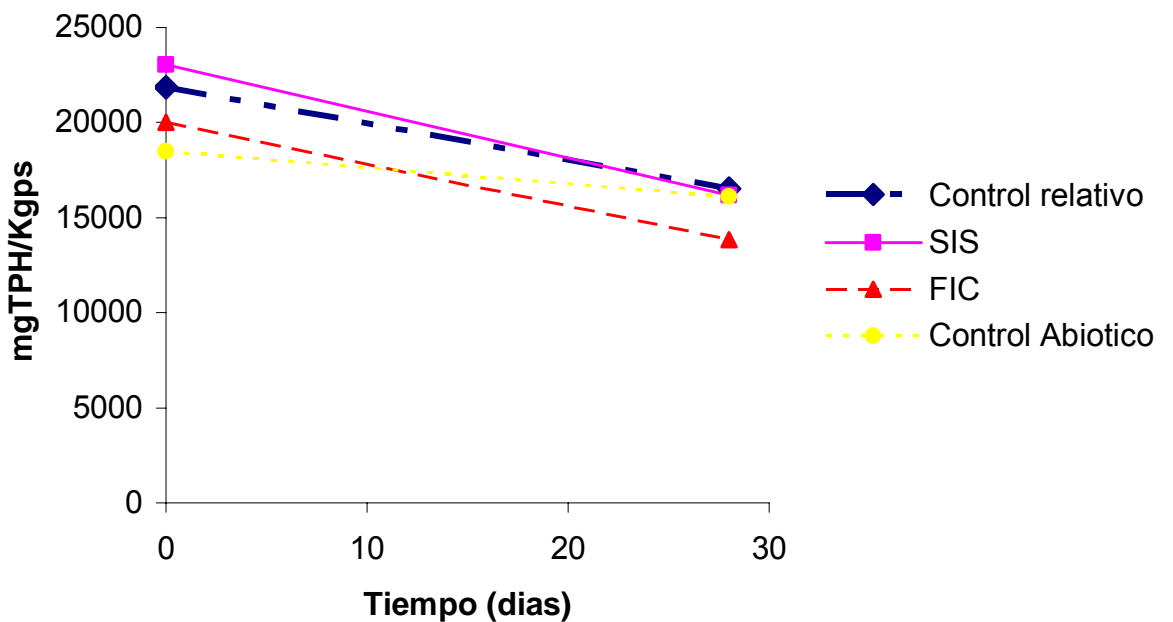


Figura 18. Concentración de TPHs en los primeros 28 días por el método EAMG (Schawab et al., 1999; EPA, 1994). Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6).

La rápida reducción en las concentraciones de TPHs (primeros 28 días) pudo ser causada por una mayor reducción de HCs volátiles (bajo PM), a causa de los procesos de volteo manual. Posteriormente los compuestos de mayor peso molecular, y que son más difíciles de degradar por los microorganismos, van acumulándose en la matriz de suelo haciendo más lenta la tasa de biodegradación (Marguesin y Schinner, 1997a; Ercoli *et al.*, 2001). Adicionalmente, durante este periodo hubo un consumo marcado de nutrientes, específicamente nitrato y fósforo, lo cual estimuló la biodegradación de TPHs por parte de los microorganismos degradadores nativos.

Después de los primeros 30 días las tasas de degradación fueron mucho más lentas, y no presentaron DS entre controles (AN) y tratamientos (SIS y FIC). Pero si fueron SD a las del control abiótico. Estas bajas tasas de degradación pudieron ser causadas por los bajos valores de pH (~4.0) y el bajo número de microorganismos degradadores ($\sim 1 \times 10^3$ NMP/g_{ps}) presentes en los tratamientos. Muchos estudios han reportado que la degradación de HCs disminuye con el tiempo, debido a que los HCs se vuelven menos disponibles para la biodegradación por su carácter recalcitrante y su limitada biodisponibilidad (Marguessin y Schinner, 1999), causando una tendencia decreciente de los recuentos microbianos antes del agotamiento de los TPHs (Song y Bartha, 1990; Hamme *et al.*, 2003).

A pesar de que no hubo una DS en las concentraciones de TPHs durante el estudio (Tabla 19 y 20) (controles Vs tratamientos) (ANOVA, $p < 0,05$, $n=124$). Los tratamientos con SIS y FIC presentaron los mayores %

de remoción de HCs durante el estudio, por los 2 métodos evaluados; lo cual indica que los fertilizantes potenciaron la biodegradación de los TPHs. Sin embargo, muchos estudios han reportado que la adición de fertilizantes en forma de FIC o SIS, no siempre aumentan los % de remoción de TPHs, debido a que otro tipo de factores pueden suprimir o limitar la actividad microbiana o interactuar con los nutrientes retardando la tasa de degradación, algunos de estos factores pueden ser: un bajo pH (<5), bajos porcentajes de humedad, la concentración de los TPHs (fracciones de difícil degradación), AE, temperatura y biodisponibilidad, entre otros (Steffensen y Martin, 1995; Marguessin *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2001; Cleves y Sandoval, 2001).

Tabla 19. Porcentajes de remoción de TPHs obtenidos por la técnica D-5831 (ASTM, 1995) durante el estudio.

Tratamiento	Concentración inicial (mgTPH/Kg_{ps})	Concentración final (mgTPH/Kg_{ps})	% de remoción
Control relativo	22,487.7±2,074.75	15,757.8±1,321.9	30
Control ábiotico	18,700.5 ± 2063.96	15,981.3±2,742.3	15
SIS	22,938.4±1,974.5	14,035.2±2,347.9	39
FIC	20,952.7±3,202.43	14,011.9±1,386.8	34

Tabla 20. Porcentajes de remoción de TPHs obtenidos por la tecnica de EAGM (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) durante el estudio.

Tratamiento	Concentración inicial (mgTPH/Kg_{ps})	Concentración final (mgTPH/Kg_{ps})	% de remoción
Control relativo	21,864.2±2,909.5	14,867.6±2,232.5	32
Control ábiotico	18,479.9±2,876.4	16,633.9±1,848.9	10
SIS	22,561.1±1,726.4	13,181.5±1,931.8	41
FIC	20,025.4±2,500.3	13,412.6±1,837.5	34

El tratamiento con SIS presentó el mayor porcentaje de remoción de HCs durante el estudio por los 2 métodos analíticos evaluados (ASTM y EAMG) (41 y 39%, respectivamente). Esto puede haber sido debido a la composición de las sales, las cuales son más solubles y por lo tanto resultan más disponibles para los microorganismos encargados de llevar a cabo el proceso de biodegradación (Wrenn *et al.*, 1994). La adición de N y P incrementó los porcentajes de remoción de TPHs. Numerosos estudios han evaluado el efecto de diferentes fuentes de N y P, las cuales tienen diferentes resultados sobre la biodegradación, dependiendo de su solubilidad y toxicidad. Sin embargo, aunque el modo de acción (liberación lenta) de los FIC es diferente al de las SIS, se han reportado estudios en donde se han obtenido altas tasas de degradación de TPHs, empleando este tipo de fertilizantes (Song y Bartha, 1990; Marguessin y Schinner a, b; 1997; Marguessin *et al.*, 2000; Yerushalmi *et al.*, 2003).

De manera general durante todo el estudio, el control relativo tuvo una reducción significativa de TPHs indicando que los procesos de AN

podieron ser efectivos, a pesar de la baja concentración de nutrientes necesaria para llevar a cabo el proceso de biodegradación (Tabla 19 y 20). Los procesos de AN incluyen una combinación de fenómenos físicos, químicos y biológicos, que permiten la reducción de TPHs en el ambiente contaminado (Zhu *et al.*, 2001; Hincbee, 1998). La biodegradación es uno de los mas frecuentes mecanismos para la eliminación de contaminantes ambientales; sin embargo los procesos químicos y físicos, tales como la dispersión, dilución, sorción, volatilización y transformaciones abióticas resultan ser importantes (EPA, 1999; Marguesin *et al.*, 1999). Se determinó que solo de un 10-15% fué debido a procesos abióticos tales como: tales como volatilización, transformación procesos de sorción (arcillas minerales y partículas húmicas) e importantes transformaciones químicas las cuales tienen un papel bien importante en la descontaminación y pérdida de HCs del suelo (Marguessin y Shinner, 1997a, Marguessin *et al.*, 2000, 2003).

Durante la implementación de la técnica D-5831 (ASTM, 1995) se detectaron interferencias con la materia orgánica presente en el suelo en las lecturas de los TPHs. Las interferencias pueden haber sido causadas por la presencia de ácidos húmicos provenientes del suelo, los cuales no fueron removidos por el óxido de calcio. Estos compuestos contienen en su estructura anillos aromáticos que pueden ser extraídos a través de diferentes solventes orgánicos. Estos compuestos son detectados por el espectrofotómetro de luz UV a una longitud de onda similar a la empleada en la técnica (Sorini, 1997).

Comparando las concentraciones de TPHs evaluadas por los 2 métodos analíticos se puede observar que aunque el comportamiento de los TPHs a lo largo del estudio fué similar por ambos métodos, al finalizar el estudio el control abiótico, y los tratamientos con FIC y SIS presentaron valores de TPHs más altos por el método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994), esta diferencia puede estar causada por la presencia de HCs alifáticos medidos por la tecnica de EAMG, mientras que el método de ASTM solo cuantifica los compuestos aromáticos.

Generalmente, se ha reportado degradación de TPHs entre un 10-18%, la cual puede estar atribuida a procesos abióticos (Marguessin *et al.*, 2000, Marguessin y Schinner, 2001). Durante este estudio este porcentaje se encontró entre un 10-15%, evaluados por los 2 métodos para la determinación de TPHs. A diferencia de este estudio, Marguesin y colaboradores (2000) evaluaron el proceso de biorremediación en un suelo aluvial (50.1% arena) contaminado con diesel a una concentración de 5,000 mgTPH/Kg_{ps}, (pH: 6.8), el cual permaneció neutro o ligeramente alcalino por medio de la adición de CaCO₃. Se determinó el efecto de los procesos de bioestimulación por medio de la adición de diferentes fuentes de N y P: FIC (triple quince), nitrato de amonio calcico, K₂HPO₄ y urea. Después de 98 días a 20°C esta concentración inicial se había reducido a 609-1,328 mgTPH/Kg_{ps} (73-88% de remoción) en los tratamientos que habían recibido bioestimulación, la cual fue mayor a la encontrada en este estudio, de otra parte un 21% se atribuyó a procesos abióticos tales como volatilización,

adsorción y transformaciones químicas, porcentaje similar al encontrado durante esta investigación.

La degradación de TPHs observada en esta investigación (127 días) puede ser comparada con el % de remoción reportado por Marguessin y Schinner, 2001 en suelos alpinos contaminados con diesel, aunque la concentración inicial de TPHs fué más baja ($2,612 \pm 70$ mgTPH/Kg_{ps}). El suelo empleado fué una mezcla de grava y arena, con un pH neutro durante 3 estaciones de verano. La mayor degradación de TPHs se presentó en los tratamientos durante las primeras 6 semanas. Después de 48 días había ocurrido una disminución en la concentración de TPHs correspondiente al $42 \pm 6\%$ en el tratamiento con bioestimulación (adición de nutrientes). En el presente estudio la mayor remoción de TPHs se llevo a cabo en los primeros 28 días, posiblemente por ser un suelo con un gran contenido de materia orgánica. Al final de la segunda estación de verano (447 días después) el tratamiento con AN había removido un $41 \pm 4\%$ de HCs y el tratamiento con bioestimulación un $66 \pm 2\%$. Al final del estudio (780 d) el tratamiento con bioestimulación había alcanzado un valor finales de TPHs de 774 ± 52 mg/Kg_{ps} ($70 \pm 2\%$) y en AN 1296 ± 110 mg/Kg_{ps} ($50 \pm 4\%$). A pesar de la adición de nutrientes, después del invierno no hubo una DS en la reducción de TPHs entre los controles y los tratamientos. Adicionalmente en la segunda y tercera estación de verano la AN tuvo las mas altas tasas de degradación de HCs (7.0 y 3.8 ug/d^{ía}, respectivamente que en los tratamientos (2.7 y 3.3 ug/g^{ía}), es decir que los procesos de AN tuvieron un efecto significativo en la disminución de TPHs, adicionalmente

durante este periodo se presento un bajo % de humedad (~12%) y una disminución en el pH (de 8.0 a 6.0) en los tratamientos que recibieron fertilización, lo cual concuerda con el estudio realizado en USBA en donde la AN no presentó diferencias significativas con los tratamientos debido posiblemente a los bajos valores de pH y bajo numero de degradadores.

Marguessin y Schinner, 1997, evaluaron la biodegradación de diesel a bajas temperaturas (10°C) en 5 tipos de subsuelos alpinos los cuales tenían un rango de pH entre el 5.0 y 7.5. Unos de los tratamientos recibió bioestimulación con un FIC (NPK) en una relación 100:10:2 similar a la relación 100:10:1 utilizada en el presente estudio. Inicialmente el suelo tuvo una contaminación de TPHs de 5.000 mg/Kg_{ps}, y después de 20 días a 10°C la reducción de HCs fué mas alta en el suelo fertilizado (27-53%) que en el suelo no fertilizado (AN) (16-31%). El control abiótico presento un % de remoción del 23%.

Mishra y Colaboradores, 2001, evaluaron en su estudio la efectividad de los procesos de bioaumentación y bioestimulación en un suelo organico (pH: 7.0-7.6). Durante su investigación la adición del consorcio de microorganismos más los nutrientes, resulto en la máxima respuesta del proceso de biorremediación. La concentración de TPHs se redujo de 91.8 ± 9.2 g/Kg de suelo a 47.2 ± 5.4 g/Kg de suelo en 120 días, lo cual es equivalente a un % de remoción del 48.5%, comparado con un 17% de la reducción que se encontró en los tratamientos solo con nutrientes.

Marguessin y Schinner, 2003 evaluaron un proceso de biorremediación en un suelo aluvial contaminado con 400mg/Kg_{ps} de BTEX

(42.3% arena, pH=7.1). Durante el estudio se determinó el efecto de la adición de un FIC (triple quince) y un fertilizante oleofilico (Inipol EAP22). Después de 28 días, se observó que un 19% en la reducción de la contaminación inicial fue debido a procesos abióticos similar al valor encontrado en este estudio (10-15%). La fertilización con el FIC estimuló la tasa de biodegradación, particularmente para tolueno y benceno (45%), para los otros componentes no hubo una DS con los controles (35%).

6.5 Análisis de pH

Antes de la adición de los HCs el pH del suelo presento un valor promedio de 5.5 ± 0.1 (n=4), considerado como moderadamente ácido (IGAC, 1994). Sin embargo, a pesar del bajo valor de pH que presentó el suelo este no fué ajustado hacia valores neutros por tres razones: a) para no afectar a los microorganismos nativos, que era la población a estudiar durante el proceso de estimulación, los cuales ya estaban adaptados b) porque no era una variable de estudio propuesta en el proyecto, y c) por los trabajos que reportan procesos de biodegradación exitosa en suelos ácidos (Hickey, 1995; Raymond *et al.*, 1998; Marguessin *et al.*, 2003).

Al inicio del estudio (día 0), los tratamientos y controles presentaron un rango de pH entre 5.05 - 5.82, siendo el tratamiento con SIS el que presentó el valor más bajo de pH (5.05 ± 0.07) (n=6) durante este EM (Anexo R). Este descenso, se atribuyó a la composición del NH_4NO_3 , el cual se caracteriza por poseer el nitrógeno en forma de amonio catión (NH_4^+) y en forma de nitrato anión (NO_3^-) dando una reacción global ácida en el suelo. Durante el proceso de nitrificación del NH_4^+ del fertilizante a

NO_3^- se liberan iones H^+ que producen una acidez en el suelo (Fink, 1985; Suppo, 1996; Silvia *et al.*, 1998).

Durante el estudio, se observó una reducción significativa en los valores de pH en los tratamientos donde se adicionaron las SIS y FIC en relación con la de los controles (Scheffé, $p < 0.05$) ($n = 120$) (Anexo S). Esta disminución de pH coincidió con un aumento en la concentración de nitratos. Los tratamientos con SIS y FIC alcanzaron en el último EM un pH de 4.1 ± 0.1 y 4.2 ± 0.2 , respectivamente (Figura 19). Después de un derrame de HCs ocurre una disminución en los valores de pH debido a la activación del metabolismo microbiano en presencia de carbono (alta concentración de TPHs), el carbono, nitrógeno y el fósforo representan para los microorganismos su soporte para el incremento en la biomasa (Atlas y Bartha, 1981; Marguessin y Schinner, 1997a).

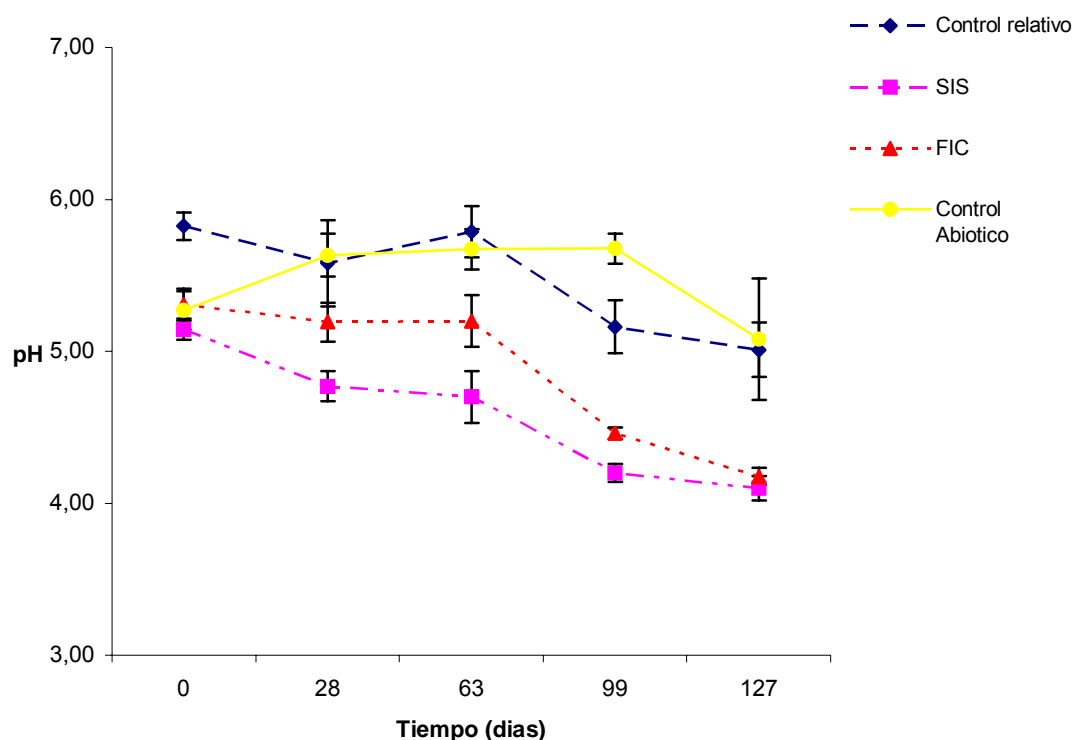


Figura 19. Valores de pH durante el estudio. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error =1 DS.

Adicionalmente, los bajos valores de pH pudieron haber sido causados por el incremento en las concentraciones de nitrato, la formación de ácido nítrico, presencia de fosfatos de hierro y aluminio en el suelo y la baja capacidad amortiguadora (Wrenn *et al.*, 1994; Marguesin y Schinner, 1997a; Marguessin *et al.*, 2000; 2003). La formación de compuestos intermediarios ácidos durante la degradación de HCs puede variar las condiciones de pH del lugar en donde se lleva a cabo el proceso de biorremediación (Atlas y Bartha 1981). Esta disminución de pH evidencia una mayor actividad metabólica de los microorganismos que utilizan los HCs como fuente de carbono y energía para su desarrollo (Watkinson y Morgan, 1990; Atlas y Bartha, 2002; Marguesin *et al.*, 2003).

Aunque la población de microorganismos estaba adaptada a un pH moderadamente ácido (5.5), los valores tan bajos que se presentaron hacia el final del estudio (~4.0) pudieron inhibir el desarrollo y crecimiento de las poblaciones de microorganismos nativos, disminuyendo significativamente el recuento tanto de heterótrofos, como de los degradadores de HCs para el tratamiento con SIS entre los días 28 y 63 (ANOVA, $p < 0.05$) ($n=120$) (Anexo S), el cual presentó la reducción más rápida de pH durante el estudio.

El control relativo, presentó un pH inicial de 5.8 ± 0.1 ($n=6$), el cual se mantuvo relativamente constante hasta el día 63, presentando después un descenso significativo (ANOVA, $p < 0.05$) ($n=120$) hasta un valor de 5.0 ± 0.2 en el día 127 (Anexo R). Por su parte el control abiótico al inicio del estudio presentó un valor de pH de 5.3 ± 0.1 , incrementándose ligeramente hasta el día 99, alcanzando un valor de 5.08 ± 0.40 al final del estudio (Figura 19).

El crecimiento y actividad de los microorganismos es afectado fácilmente por valores de pH ácidos (< 5.0), aunque hay microorganismos que son capaces de llevar a cabo el proceso de biodegradación en condiciones extremas, el rango óptimo para llevar a cabo este proceso se encuentra entre 5.0-8.8 (Dibble y Bartha, 1979; Leahy y Colwell, 1990; Levin y Gealt, 1997; Hamme *et al.*, 2003). Adicionalmente, muchos ambientes contaminados con HCs se caracterizan por tener condiciones extremas (pH, temperatura, presión y concentraciones de sal). Sin embargo, los microorganismos nativos degradadores de HCs se

encuentran adaptados a estos ambientes lo cual les permiten crecer y mantenerse. Por ese motivo, los degradadores nativos tienen un importante papel en la biodegradación en estos ambientes extremos (Marguesin y Schinner, 2001).

A pesar de que la mayoría de estudios en biorremediación han trabajado con pHs cercanos a la neutralidad, considerado como el óptimo para la mineralización de petróleo en suelos contaminados; se han reportado estudios en donde se han encontrado valores de pH ácidos en suelos en el rango de 4.5-5.5 (Hickey, 1995; Marguessin y Schinner, 1997a, b; Stapleton *et al.*, 1998). Adicionalmente, estudios en biorremediación de suelos contraminados con HCs con valores iniciales de pH < a 5.0 han mostrado ser exitosos después de que el pH del suelo ha sido neutralizado a valores superiores a 7.5 (Dibble y Bartha, 1979; Song y Bartha, 1990; Song *et al.*, 1990; Marguesin y Schinner, 1997; Marguesin *et al.*, 2000).

Hickey (1995) evaluó el efecto de la extracción con vapor en un suelo contaminado con gasolina sobre la población microbiana nativa. El estudio fué realizado en suelo arenoso (85%) a un pH de 5.0 el cual se mantuvo constante durante todo el proceso. Durante este estudio el bajo pH del suelo no tuvo efectos significativos sobre la población nativa de microorganismos ni en los porcentajes de degradación de TPHs. La baja actividad microbiana que se presento en el estudio entre los días 180 y 462 fué asociada a una baja en la densidad de la población de microorganismos degradadores de HCs ($<10^4$) debido a una limitación de nutrientes. Marguessin y colaboradores (2003) caracterizaron las poblaciones de

microorganismos degradadores de HCs en 12 tipos de suelos contaminados con diesel y 8 suelos alpinos prístinos. En el estudio los valores de pH en los suelos se encontraron en un rango entre 4.8-9.0 y no encontró un efecto significativo del pH sobre la densidad de microorganismos heterótrofos y ni degradadores de HCs.

Por el contrario Hambrick y colaboradores (1980) encontraron que las tasas de mineralización del octadecano y naftaleno eran menores a un pH inferior de 5.0 comparado con las tasas encontradas a pH cercanos a 6.5. Adicionalmente, la tasa de mineralización del octadecano incremento cuando el pH se acerca a la neutralidad (6.8-8.0). Wrenn y colaboradores (1994), evaluaron el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la biodegradación de HCs, determinando el efecto de la adición de SIS sobre el pH, consumo de oxígeno y crecimiento de los microorganismos degradadores bajo condiciones de laboratorio. Durante el estudio se observó un descenso significativo en los valores de pH en los cultivos que contenían NH_4Cl y NH_4NO_3 , pero no en los que contenían como fuente de nitrógeno KNO_3 . El recuento de microorganismos heterótrofos totales y degradadores de HCs fue afectado por los bajos valores de pH que se presentaron en los tratamientos (4.46-5.30). La presencia de amonio como la fuente de N se asoció a las reducciones de pH que afectaron la densidad de microorganismos degradadores de HCs, pudiendo llegar a inhibir o cesar completamente la tasa de biodegradación de HCs. Estos estudios apoyan los resultados obtenidos durante el estudio en USBA, en el cual la

adición de los tratamientos afectó significativamente el pH pudiendo llegar a inhibir el crecimiento de los degradadores de HCs

6.5.1 Análisis de Humedad

Al inicio del estudio los 4 tratamientos evaluados no fueron SD en los porcentajes de humedad (ANOVA, $P < 0,05$, $n=24$) (Anexo S). La mayoría de degradadores de HCs crecen en un contenido de humedad entre el 30-40%, rango considerado como óptimo para llevar a cabo el proceso de biodegradación (Leahy y Colwell, 1990; Sanchez *et al.*, 1998; Vidali, 2001). El porcentaje de humedad durante el estudio se mantuvo dentro de un promedio \sim de $27 \pm 5\%$ con la adición periódica de agua (riegos manuales). Sin embargo, el alto porcentaje de arcilla presente en el suelo causó la formación de grumos que dificultaron que la mezcla fuera homogénea y que hubiera una distribución uniforme del agua en los mesocosmos.

Durante el estudio, se observó una disminución significativa en los valores de humedad en el día 28 para los tratamientos con SIS, FIC y el control ábiotico (Scheffé, $p < 0,05$) ($n=120$) (Anexo S) (Figura 19). Al inicio del estudio se presentaron los mayores % de humedad para los tratamientos (SIS y FIC) ($\sim 30-35\%$), periodo en el cual se observaron los recuentos más altos de heterótrofos y degradadores de HCs. Un rango adecuado de humedad en el suelo hace posible un aumento en la solubilidad de los TPHs, lo que genera un mayor contacto entre los microorganismos y los HCs, influyendo en el proceso de aireación

(transporte de O₂) a través de los poros, favoreciendo el proceso de biorremediación (leahy y Colwell, 1990)

El control relativo presentó el mayor porcentaje de humedad durante el estudio, el cual fue significativamente mayor que el de los tratamientos (Scheffé, $p < 0,05$) ($n=120$), especialmente en los primeros 63 días (33.7 ± 2.7). Esto fue causado por problemas en el sistema de riego instalado, que ocasionaron un aumento significativo de agua en los mesocosmos; por tal motivo, el sistema de riego automático fué suspendido, continuando con riegos manuales. Entre el día 63 y 99 se observaron valores constantes en el % de humedad, la cual disminuyó al final del estudio (día 127) alcanzando un valor promedio de 29.73 ± 1.87 ($n=6$) (Anexo R) (Figura 20).

El control abiótico presentó los valores más bajos de porcentajes de humedad durante el estudio (ANOVA, $p < 0,05$) ($n=120$). El uso del Basamid G® dificultó el proceso de riego y homogenización de la mezcla suelo: petróleo. Por tal motivo, al final del estudio el porcentaje de humedad fué significativamente menor que las de los otros tratamientos (Scheefé, $p < 0,05$) ($n=120$). De otra parte, los tratamientos con SIS y FIC presentaron un comportamiento similar en los porcentajes de humedad durante el estudio alcanzando un valor de 28.7 ± 4.0 y 30 ± 4.0 ($n=6$) en el día 127 (Figura 20).

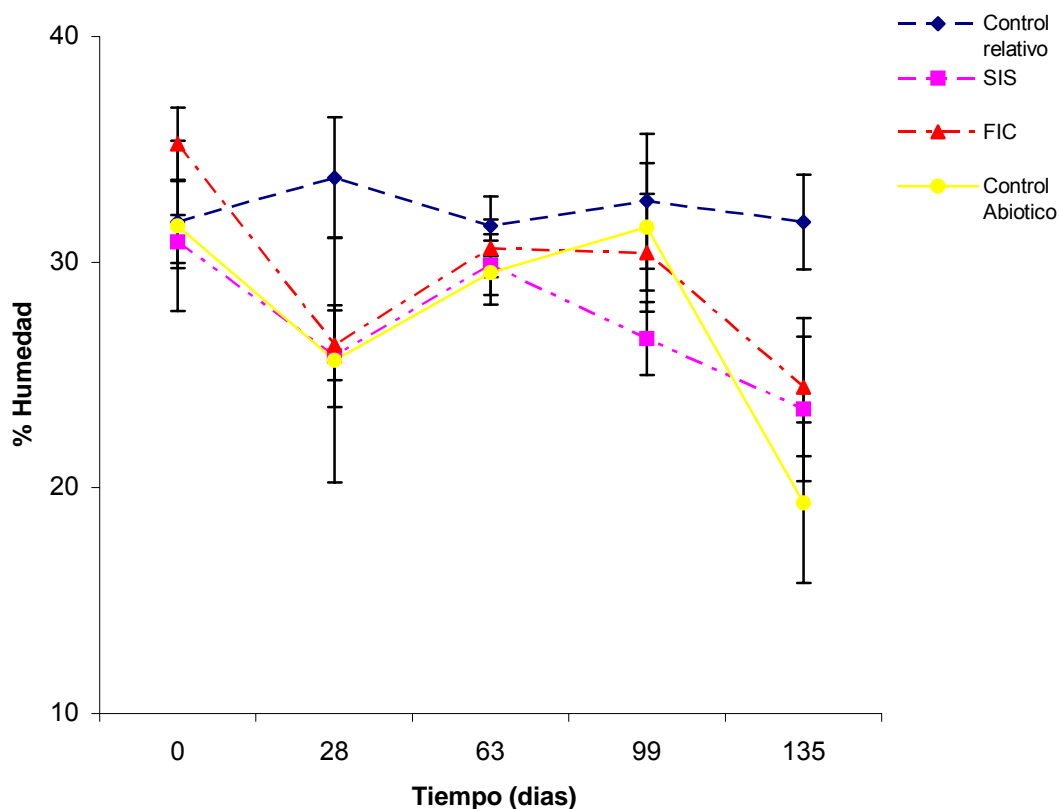


Figura 20. Valores de porcentajes de humedad. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error =1 DS.

6.5.2 Análisis de nitratos y amonio

Después de la adición de los nutrientes las concentraciones de nitratos en los tratamientos con SIS y FIC fueron de 404.17 ± 18.82 y 62.67 ± 2.80 mg N-NO₃⁻/Kg_{ps} (n=6), respectivamente (Anexo R). La baja concentración de nitrato presente en el FIC es atribuida a que el amonio es la fuente principal de nitrógeno; por esta razón, las concentraciones de amonio que se encontraron en el FIC al inicio del estudio fueron significativamente mayores que las de las SIS (276.0 ± 34.6 mg N-NH₃⁺/Kg_{ps}) (n=6) (Scheffé, p< 0.05) (n=24) (Figura 21). La concentración

de nitrato incremento significativamente hasta el día 63 en donde alcanzó un valor de 348.10 ± 45.14 mg N- $\text{NO}_3^-/\text{Kg}_{\text{ps}}$. El rápido incremento en las concentraciones de nitrato en el tratamiento con FIC fué causado a la adición del triple quince, el cual a pesar de ser un fertilizante de liberación lenta, aportó progresivamente la fuente de nitrógeno al suelo (Suppo, 1996). Adicionalmente, este aumento en los valores de nitratos pudo ser el resultado del proceso de nitrificación, llevado a cabo por los microorganismos a partir de la urea presente en el fertilizante al utilizar el amonio como donador de electrones en presencia de oxígeno como AE. De la misma forma, durante este periodo hubo la reducción más drástica de los valores de pH en el suelo; ya que en este proceso, se libera hidrógeno lo que incrementa la acidéz del suelo (Atlas y Bartha, 2001).

Después de la adición de nutrientes (día 0 y 63) se presentó una reducción en las concentraciones de nitrato en el tratamiento con SIS y en el día 63 para el FIC (Figura 21). El consumo de nitrato fué más rápido en las SIS que en el FIC, debido posiblemente a que las sales inórganicas son más solubles en el suelo que el FIC, y por esta razón son asimiladas más fácilmente por los microorganismos.

De otra parte, las concentraciones de nitrato y amonio en los 2 controles durante el estudio, fueron constantes y significativamente menores que las de los tratamientos. Esto indica que se presentó un mayor consumo del nitrógeno durante el proceso de biodegradación y una falta de nitrógeno en los controles. Las concentraciones de estos nutrientes (nitrato y amonio) en los controles (AN y abiótico) alcanzaron valores de 13 ± 2.10

y 14.67 ± 1.86 mg $\text{NO}_3^-/\text{Kg}_{\text{ps}}$, y 31.83 ± 5.12 y 58.33 ± 8.24 mg $\text{N-NH}_3^+/\text{Kg}_{\text{ps}}$, respectivamente durante el último EM (Anexo R) (Figuras 21 y 22).

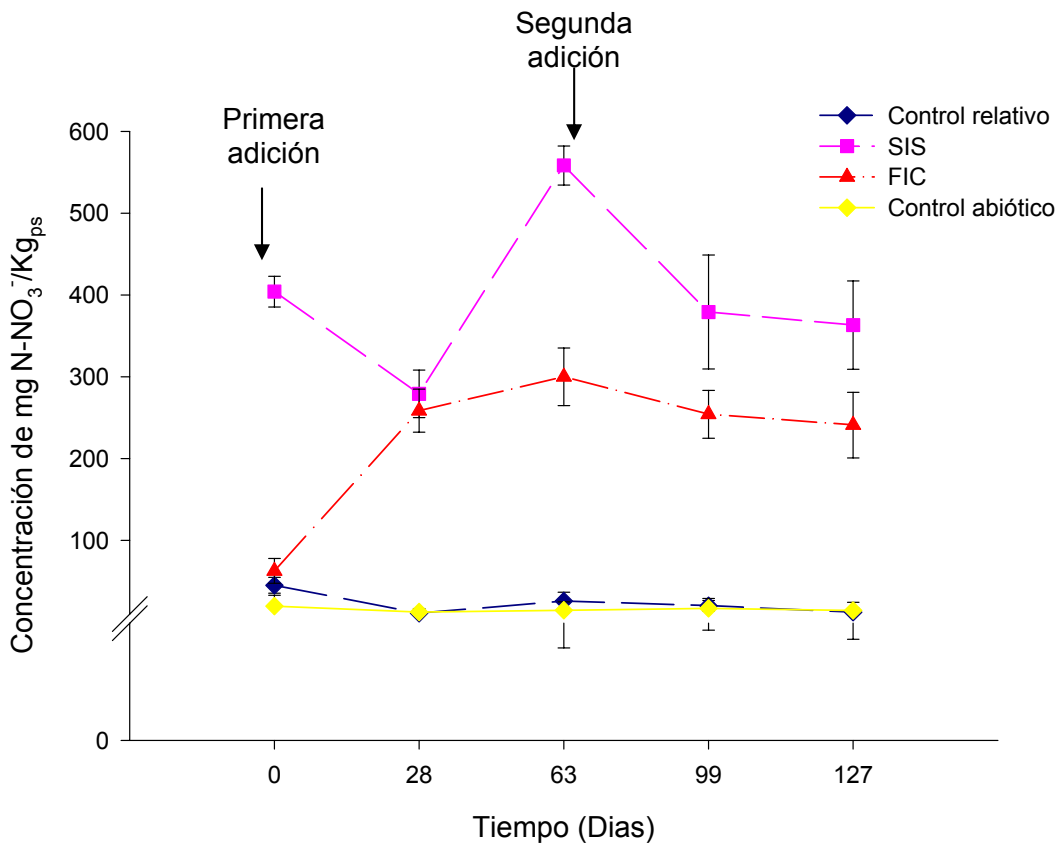


Figura 21. Concentración de nitrato durante el estudio. Se muestra el valor promedio de 6 datos ($n=6$) y las barras de error $=1$ DS. Las flechas indican la adición de nutrientes.

La concentración de nitratos en el control de AN presentó un descenso significativo durante los primeros 28 días (11.17 ± 1.94 mgN- NO_3^- mg/ Kg_{ps}) (ANOVA, $p < 0.05$, $n=48$) (Figura 21). Este descenso puede ser atribuido a su uso durante la biodegradación intrínseca como nutriente (forma asimilativa) o como AE (forma desasimilativa). Este proceso de denitrificación pudo haber sido favorecido por las fallas en el sistema de riego en este tratamiento, lo cual favoreció un ambiente anaerobio.

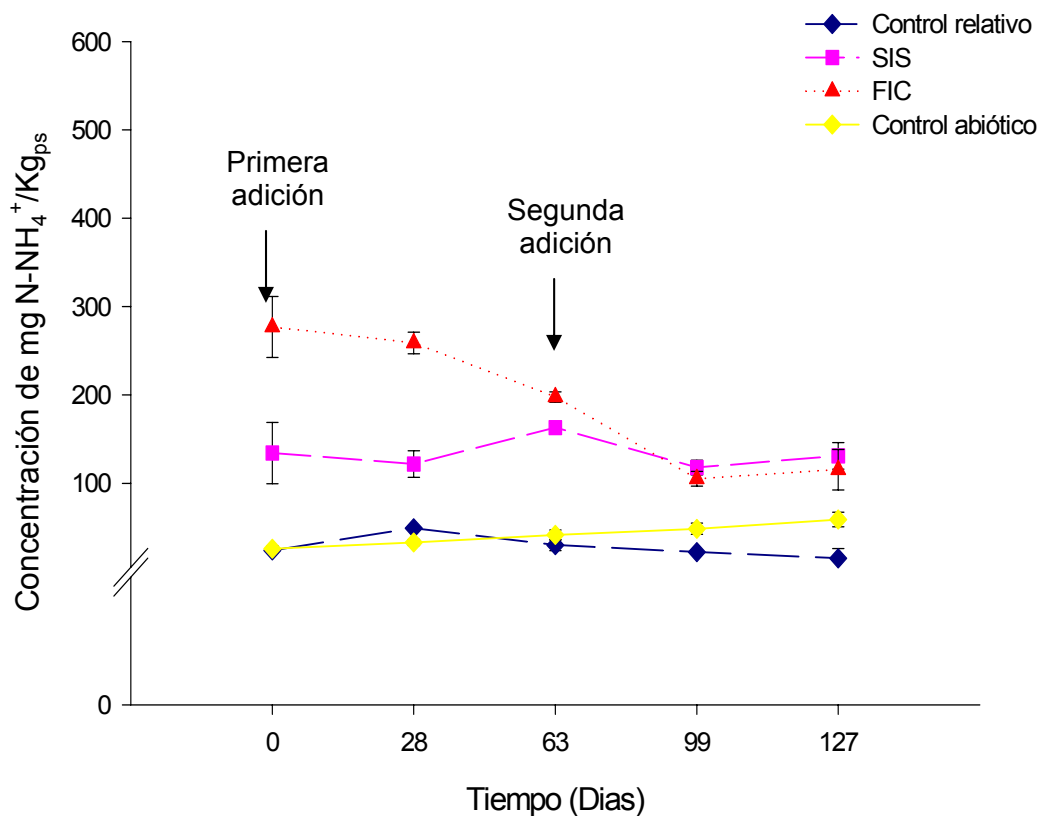


Figura 22. Concentración de amonio durante el estudio. Se muestra el valor promedio de 6 datos ($n=6$), y las barras de error =1 DS. Las flechas indican la adición de nutrientes.

Durante el estudio la concentración de amonio en el SIS, permaneció relativamente invariable (131 ± 15.03 mg N-NH₃⁺/Kg_{ps}, día 127). La presencia constante de amonio en este tratamiento, se relacionó con la rápida disminución en el pH, el cual alcanzó un valor de 4.10 ± 0.06 en el último EM (Figura 23). Sin embargo, el nitrato presentó un comportamiento variable, indicando un rápido consumo de este nutriente después de su adición (día 0 y 63) (Figura 23). Este consumo marcado de nitrato se puede correlacionar con la degradación de HCs observada durante este periodo (día 0 y 63), lo cual confirma que la adición de los nutrientes estimuló la

tasa de biodegradación de TPHs por parte de los microorganismos degradadores nativos, y que fué observada por los dos métodos analíticos (ASTM y EAMG) evaluados.

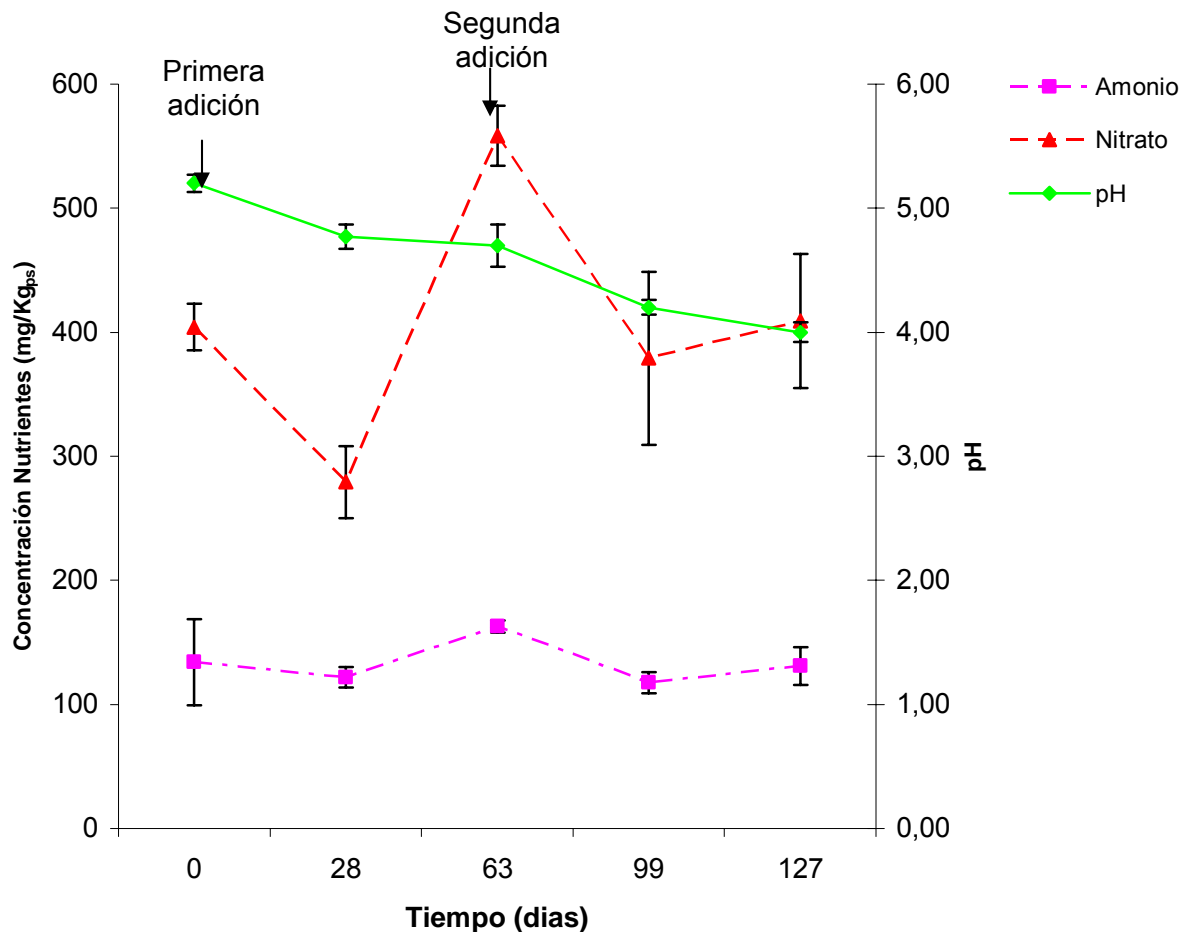


Figura 23. Comportamiento de los nutrientes y pH en el tratamiento con SIS durante el estudio. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error=1DS.

El tratamiento con FIC presentó un comportamiento diferente que el SIS. La concentración inicial de amonio ($276.83 \pm 34.58 \text{ mgN-NH}_3^+/\text{Kg}_{ps}$) disminuyó durante todo el estudio. Por otro lado, la baja concentración inicial de nitrato aumento durante los primeros 63 días ($300.12 \pm 35.36 \text{ mgN-NH}_3^+/\text{Kg}_{ps}$) y luego permaneció invariable (Figura 24) Independiente

del tratamiento y por este motivo de la fuente de nitrógeno, durante el presente estudio se observó que no hubo consumo de nitrato ni de amonio después del día 99. Esta inhibición en la toma de nitrógeno estuvo acompañada de una reducción en la biodegradación de TPHs, Este fenómeno esta relacionado con el descenso en el pH y el bajo número de degradadores.

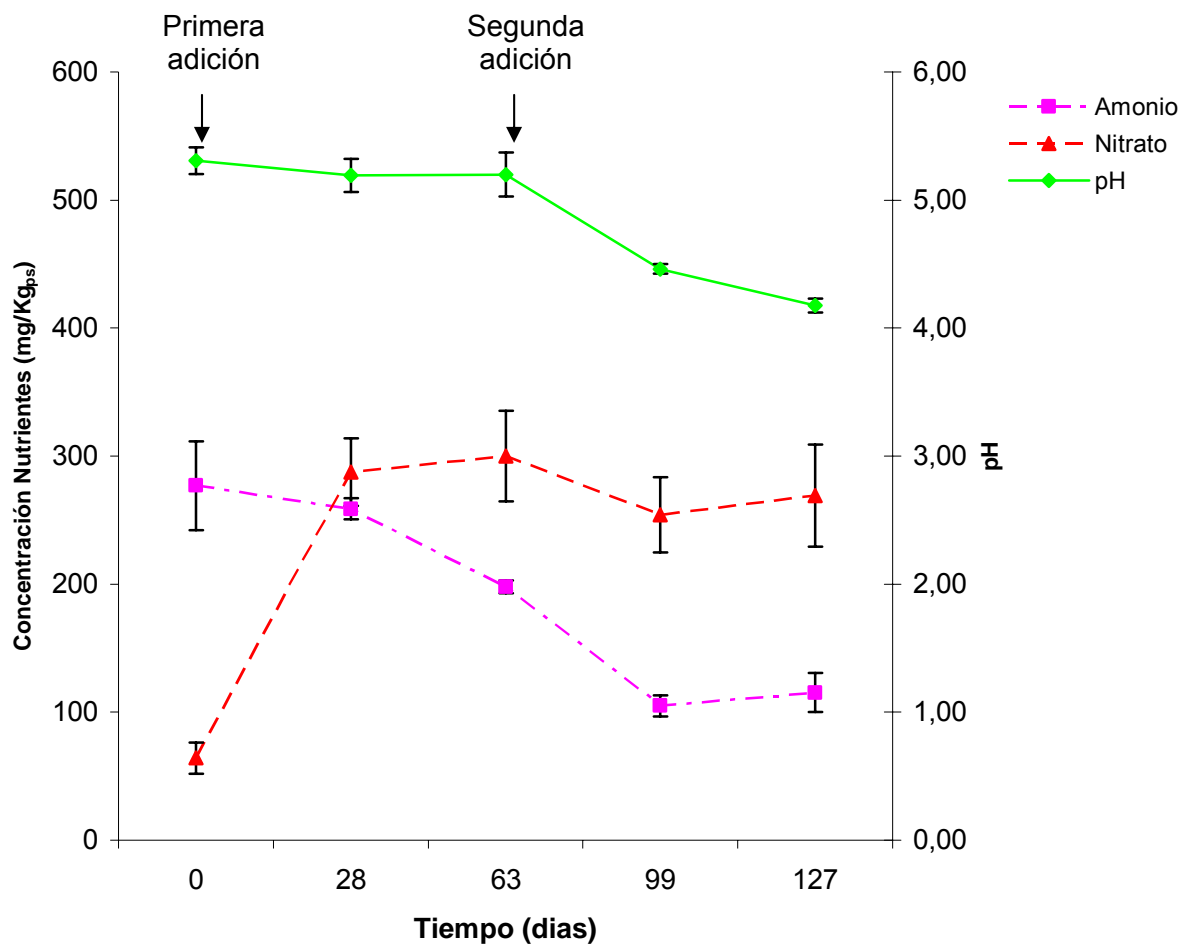


Figura 24. Comportamiento de los nutrientes y pH en el tratamiento con FIC durante el estudio. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error=1DS.

Muchos estudios han evaluado el efecto de la adición de FIC y SIS en suelos contaminados con HCs de petróleo. Estos estudios se centran

básicamente en la reducción de TPHs y en las densidades de microorganismos degradadores (Dibble y Bartha, 1979; Song *et al.*, 1990; Song y Bartha, 1990; Marguessin y Schinner, 1997a, b; Marguessin *et al.*, 2000, 2003; Broock *et al.*, 2001). De otra parte, algunos de ellos realizan un seguimiento de las concentraciones de nutrientes (amonio, nitrato y fosfato) durante la investigación (Marguessin y Schinner, 1997, 2001).

Los cambios obtenidos en las concentraciones de nutrientes durante el estudio, pueden compararse con las observadas por Marguessin y Schinner (2001). Los autores evaluaron el efecto de un proceso de bioestimulación Vs AN, sobre la biodegradación de TPHs en un suelo alpino (48% arena) (pH: 7.0- 8.0). Durante el estudio, se ajustó la concentración de C:N:P, 100:10:1 como la evaluada en el presente estudio, de la misma manera se empleó un FIC (tipo NPK, 15:15:15). Se observó un incremento significativo en las concentraciones de nitrato, amonio y fosfato despues de la adición de los tratamientos. Sin embargo, las concentraciones de nutrientes (N-nitrato, N-amonio y P) disminuyeron considerablemente con el tiempo. Esta disminución fúe atribuida a metabolismo, inmovilización en biomasa e inmovilización en los coloides del suelo y lavado del suelo, el cual fué confirmado al realizar estudios en los lixiviados. Asi mismo, al igual que en el presente estudio, las concentraciones de nitrato disminuyeron más rapidamente que las de amonio, debido a que el nivel de inmovilización del nitrato en la matriz del suelo es bajo.

Marguessin y Schinner, 1997 evaluaron en su estudio el efecto de un proceso de bioestimulación en la degradación de TPHs en 2 tipos diferentes de suelos, uno rico en carbonato (suelo A) (pH: 7.2) y otro en silicato (suelo B) (pH: 6.2). Durante el estudio se observó un descenso significativo en las concentraciones de amonio en los 2 tipos de suelo evaluados, lo cual fué atribuido principalmente a incorporación en la biomasa microbiana e inmovilización en las matrices del suelo. De otra parte, el contenido de nitrato fué el mismo al inicio del estudio en ambos tipos de suelos, esta concentración permaneció invariable en el suelo A durante los primeros 100 días, y después disminuyó en un 20%.

6.5.3 Análisis de Fósforo (P).

Al inicio del estudio las mayores concentraciones de fósforo las presentaron los tratamientos con SIS y FIC (55.22 ± 4.16 y 74.03 ± 3.76 mgP/Kg_{ps}, respectivamente). De otra parte, los controles presentaron valores significativamente menores durante los primeros 28 días (38.62 ± 2.30 ; AN y 31.93 ± 2.71 mgP/Kg_{ps}; abiótico) (Anexo R).

Durante el estudio se observó una disminución significativa en las concentraciones de fósforo para los tratamientos con SIS y FIC (ANOVA, $p < 0.05$) ($n=120$) (Anexo T); mientras que los controles no presentaron DS en los valores de fósforo a lo largo del estudio (Figura 25). La disminución en el contenido de fósforo en el suelo pudo haber sido causado por metabolismo bacteriano; fenómeno de inmovilización en el cual se lleva a cabo la incorporación de fosfato soluble dentro de las células microbianas y

que esta determinada directamente por las reacciones químicas del suelo según su pH.

El fósforo puede ser inmovilizado por la fase sólida del suelo en presencia de hidróxidos de hierro (Fe^{++}), aluminio (Al^{++}) y de calcio (Ca^+) (carbonato o hidróxido de calcio). A pH mayores de 6.0 el fosfato es adsorbido por los óxidos de Fe y Al, formando un compuesto de fosfato de calcio poco soluble con precipitación de fosfato dicálcico o tricálcico que se transforma rápidamente en hidroxiapatita. A un pH inferior de 5.0 se produce adsorción por los óxidos de Fe y Al, y precipitación de fosfatos de hierro y aluminio, que tienen carácter poco soluble (Atlas y Bartha, 1981; Illmer y Schinner, 1995; Marguessin y Shinner, 1997; Marguessin y Schinner, 2001). El suelo empleado en el estudio fue ácido, en este tipo de suelos los óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio inmovilizan el pentóxido de fósforo (P_2O_5) contenido en los abonos y fertilizantes químicos. Adicionalmente, la disponibilidad de fósforo para los microorganismos es mayor en suelos arenosos que en suelos arcillosos, como el evaluado en el presente estudio (53% arcilla), debido a que los terrones de arcilla, sesquióxidos de hierro y aluminio actúan como componentes fijadores de este elemento (Atlas y Bartha, 2000).

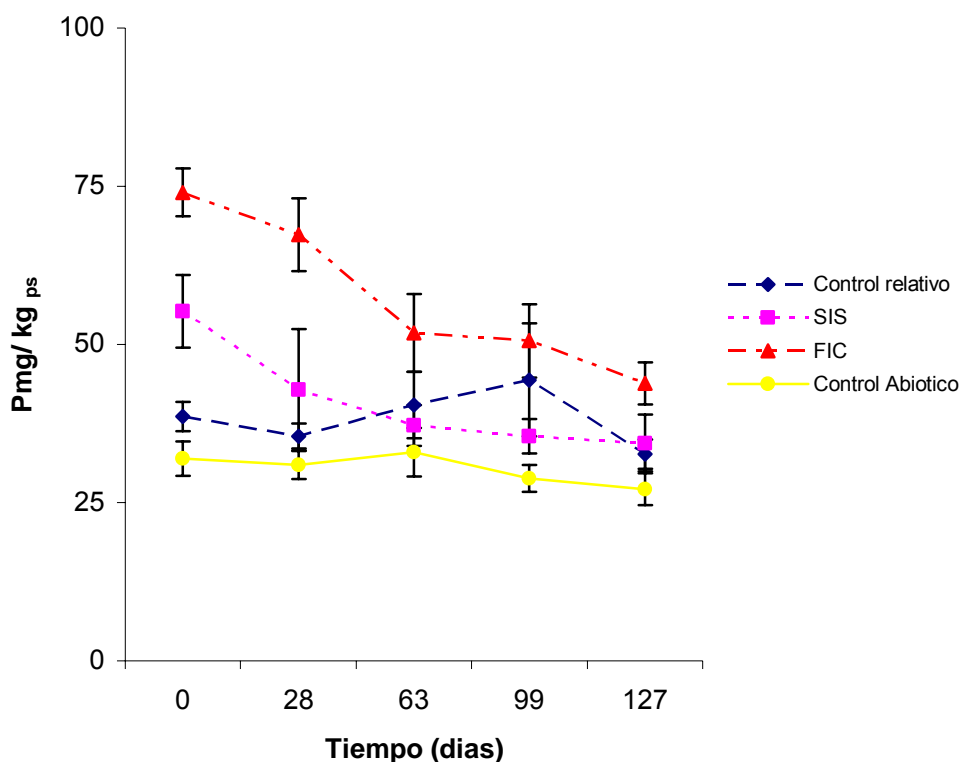


Figura 25. Valores de fósforo (P) durante el estudio. Se presenta el valor promedio de 6 datos por tratamiento (n=6), barras de error = 1DS.

Aunque hubo un rápido consumo de P en los tratamientos con SIS y FIC, el mayor consumo de este elemento se presentó en el tratamiento con FIC (Figura 25), sin embargo este fertilizante aportó una mayor cantidad de P durante el estudio. Este aspecto podría ser útil a la hora de decidir que tipo de fertilizante es adecuado para un proceso de biorremediación teniendo en cuenta su costo-eficiencia. El FIC aporta un mayor porcentaje de P, 15% de P_2O_5 y 15% de P soluble en agua, de fácil aplicación y muy económico, es además un fertilizante de liberación lenta, que permite liberar sus nutrientes gradual y continuamente a un ritmo ajustado a las necesidades de los microorganismos, sin embargo, su presentación en forma de granúlos secos en algunos casos dificulta su distribución y

homogenización uniforme en el suelo. De otra parte las SIS, aunque se disuelven más rápidamente en el agua, resultan ser muy costosas y aportan muy baja cantidad de fósforo, el cual es consumido rápidamente por los microorganismos en los primeros días del proceso de biodegradación.

6.6 Seguimiento microbiológico del proceso de biorremediación.

6.6.1 Recuentos preliminares de heterótrofos totales en el suelo sin contaminar

En el suelo sin contaminar, se observó un recuento inicial de heterótrofos totales de: $68-91 \times 10^6$ UFC/g_{ps}. Estos recuentos fueron considerados adecuados ya que para la remediación de suelos contaminados con HCs se requiere una concentración mínima de heterótrofos totales $>10^5$ UFC/g_{ps} (Silverio y Sordo, 1989; Coulon y Delille, 2001; Ercoli *et al.*, 2001). Si la concentración microbiana es baja, puede dificultar el proceso de biodegradación; y puede ser necesario la incorporación de microorganismos al suelo (bioaumentación).

6.6.2 Recuento de microorganismos heterótrofos totales en el estudio

Al inicio del estudio (día 0) el recuento de heterótrofos totales para los tratamientos y controles estuvieron dentro del rango de 45×10^5 - 27×10^6 UFC/g_{ps} (Anexo R). Siendo los tratamientos con SIS y FIC los que presentaron el mayor recuento de microorganismos (58×10^5 y 60×10^5 UFC/g_{ps}, respectivamente), sin embargo, este recuento no fue mayor al

encontrado en el suelo antes de la adición del petróleo, es decir que la adición de los nutrientes no estimuló el crecimiento de la población de heterótrofos totales. Después de la adición del petróleo se observó un leve descenso (un orden de magnitud) en la población de microorganismos, y esto pudo haber sido causado por la acción tóxica (alta concentración) que pueden ejercer algunos tipos de HCs petróleo. Las especies presentes menos resistentes a los HCs en el suelo tienden a desaparecer, y se pueden producir altas tasa de mutagenicidad a causa de la posible presencia sustancias tóxicas Venosa *et al.*, 1999; Townsend *et al.*, 2000; Cooulon y Delille, 2001).

En el presente estudio los recuentos de microorganismos heterótrofos totales permanecieron relativamente constantes en los tratamientos con SIS y FIC (ANOVA, $p < 0,05$, $n=120$) (Anexo S). Sin embargo, a partir del día 63 se presentó un descenso significativo en los heterótrofos (un orden de magnitud) para ambos tratamientos (Figura 26) (Scheeffé, $p < 0,05$, $n=120$). El tratamiento con SIS tuvo un recuento de 86×10^4 UFC/g_{ps} y el tratamiento con FIC de 93×10^4 UFC/g_{ps}. La disminución en la concentración de microorganismos heterótrofos puede estar asociada a los bajos valores de pH que presentaron en los tratamientos (~4.0), lo cual pudo llegar a inhibir el crecimiento de la población microbiana presente el suelo.

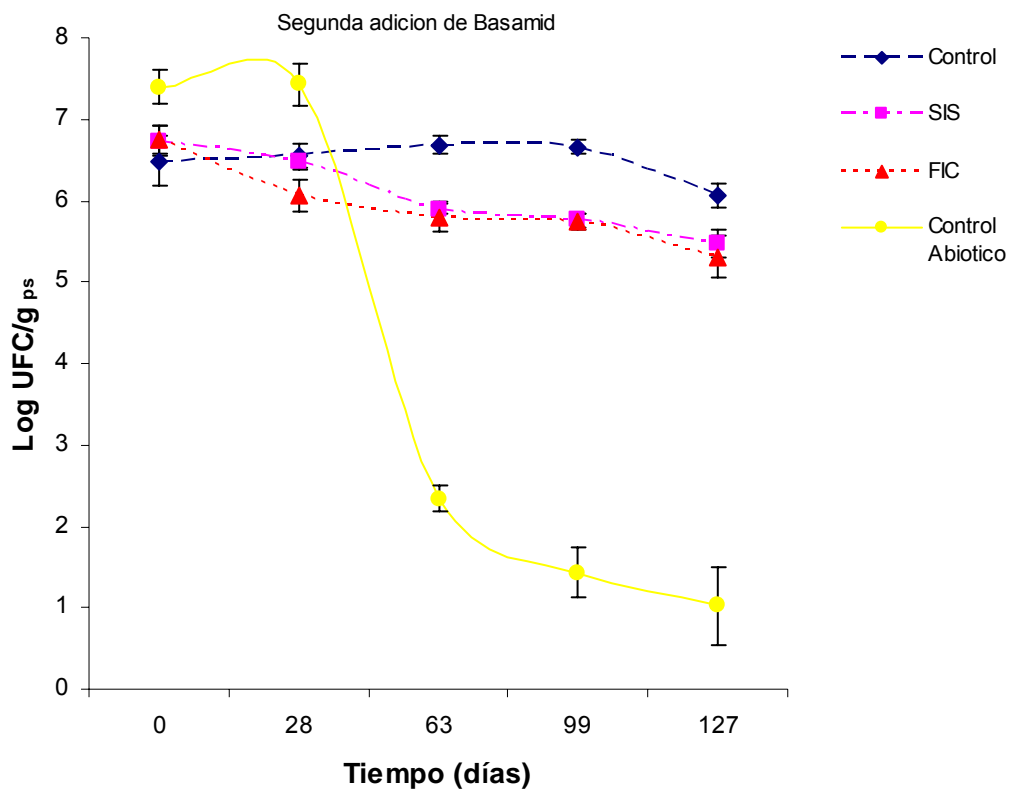


Figura 26. Recuento de microorganismos heterótrofos durante el estudio. Se muestra el valor promedio de 6 datos ($n=6$) y las barras de error=1DS.

El control relativo no presentó cambios significativos en la población de microorganismos heterótrofos a lo largo del estudio (ANOVA, $p < 0.05$, $n=120$), iniciando con un recuento de 45×10^5 UFC/g_{ps}, finalizando con un recuento de 12×10^5 UFC/g_{ps}. Aunque en el control abiótico se empleó el Basamid como esterilizante para el suelo y se siguieron las instrucciones del producto y del productor para su aplicación se siguieron adecuadamente, los recuentos iniciales fueron significativamente más altos que las de los otros tratamientos. Por recomendación del distribuidor se volvió a aplicar el producto a una concentración mayor obteniendo bajos recuentos a partir del día 63 ($< 10^2$ UFC/g_{ps}).

La baja efectividad presentada por el Basamid® pudo ser causada por las altas temperaturas que se presentaron durante los primeros 30 días del estudio (>20°C), lo cual generó una disminución en el contenido de agua en los mesocosmos, por lo que el ingrediente activo del compuesto (DAZOMET) no interactuó con las zonas húmedas del suelo, dificultando la formación de subproductos que eliminan las formas biológicas presentes en el suelo (BASF, 1984). Por este motivo para la segunda adición del Basamid se realizó un humedecimiento más prolongado del suelo (2 semanas) antes de su aplicación, tanto en la mañana como en la tarde.

En términos generales, durante el estudio el recuento de heterótrofos totales fue mayor que el recuento de degradadores durante el estudio. Esto es debido, a que en el suelo existen microorganismos que son capaces de vivir en presencia de los HCs pero no necesariamente de usarlos como fuente de energía (Atlas y Bartha, 2002; Marguésin *et al.*, 2003) (Figura 27).

Las concentraciones de microorganismos heterótrofos encontrados en el estudio pueden relacionarse con las encontradas en otros estudios de biorremediación de suelos contaminados con HCs. Hickey (1995), al inicio de su estudio encontró una densidad de microorganismos de 10^6 UFC/g_{ps}, la cual después de 180 días se disminuyó 2 órdenes de magnitud, posiblemente causado a una limitación de nutrientes (N y P) y a el bajo pH que se presentó durante el estudio (5.0).

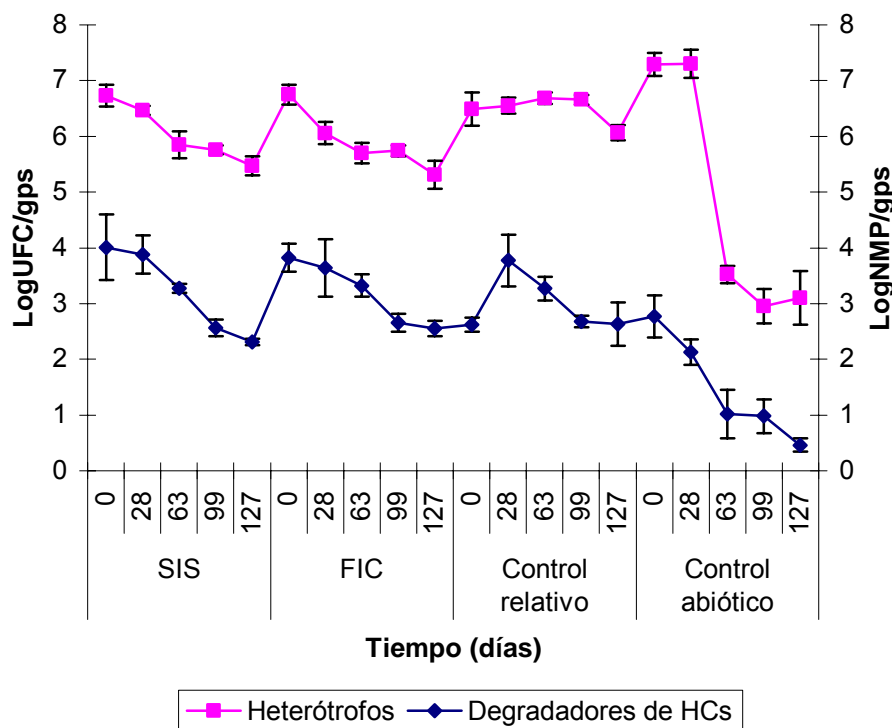


Figura 27. Relación de heterótrofos y degradadores de HCs durante el estudio. Se muestra el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error=1DS.

Coulon y Delille, 2001 Evaluaron el efecto de la bioestimulación sobre el crecimiento de bacterias nativas en un suelo Sub-Antártico contaminado con HCs (pH: 6.4). Antes de la contaminación el suelo tenía un recuento de 3.2×10^6 UFC/g_{ps}, el cual se mantuvo constante en los controles. Durante el estudio, no se observó un efecto significativo de los fertilizantes sobre el número de microorganismos heterotófos totales, posiblemente porque el N y el P fueron los factores limitantes. Por este motivo, se observó un descenso en la población de microorganismos al final del estudio (3 meses después de la contaminación) de un orden de magnitud de (10^5 UFC/g_{ps}).

Marguessin y Schinner, 2001 evaluaron el efecto de la AN y la bioestimulación en un suelo Alpino (pH:8.0), observando un recuento inicial de microorganismos heterótrofos totales de $65 \times 10^8 \text{ UFC/g}_{\text{ps}}$, la cual fué mayor a la encontrada en el presente estudio de USBA (10^5 - $10^6 \text{ UFC/g}_{\text{ps}}$). Los autores no observaron un efecto significativo de los nutrientes sobre los recuentos de heterótrofos totales pero si sobre los recuentos de degradadores de HCs durante los primeros 67 días.

6.6.3 Recuento de microorganismos degradadores de HCs en placas de 96 pozos por la técnica del NMP

Inicialmente se utilizó kerosene como sustrato para la determinación de microorganismos degradadores de HCs, debido a que este ya había sido reportado por Cleves y Sandoval (2001). Sin embargo, se presentaron interferencias en la lectura de la prueba, debido a que no había formación del color rosado-rojo por el INT. Por este motivo, se tomó la decisión de evaluar crudo y ACPM como sustratos alternativos.

Cuando se empleó crudo como fuente de carbono y energía en el suelo sin contaminar se obtuvieron recuentos más bajos de microorganismos degradadores de petróleo (45 - $58 \times 10^2 \text{ NMP/g}_{\text{ps}}$). El uso de ACPM como sustrato presentó recuentos significativamente mayores (17 - $21 \times 10^3 \text{ NMP/g}_{\text{ps}}$). La composición del ACPM tiene una menor concentración de HCs complejos (de menor peso y más sencillos estructuralmente) por ser un producto refinado, los cuales son menos difíciles de degradar por parte de los microorganismos. Por otra parte, el

petróleo puede contener diversas mezclas de diferentes clases de HCs (aromáticos, alifáticos, PAHs) que pueden ser mas difíciles de biodegradar o que en algunos casos pueden llegar a ser tóxicos para los microorganismos (Haines *et al.*, 1996; Weisman, 1998). Finalmente se seleccionó el ACPM como fuente de carbono debido a que la manipulación de este producto es mucho más fácil que el crudo, no se queda adherido a las paredes de los pozos, ni a los instrumentos de laboratorio y permitió una mayor recuperación de microorganismos degradadores.

Para la remediación de suelos contaminados con HCs se requiere una concentración inicial mínima de degradadores específicos de 10^3 - 10^4 UFC/g_{ps} (Leahy y Colwell, 1990; Ercoli *et al.*, 2001). Esta concentración se encontró dentro del rango que presentó el suelo inicialmente sin la adición de los HCs. En estos casos generalmente no se requiere de la adición de degradadores, y se puede hacer bioestimulación de los parámetros limitantes (p.e., nutrientes, aceptores de electrones, entre otros) para acelerar el proceso de biorremediación por parte de los microorganismos nativos.

Durante el estudio se observó una disminución en la concentración de los microorganismos degradadores a través del tiempo (Figura 28) para todos los tratamientos y controles evaluados (ANOVA, $p < 0,05$, $n=120$). Este fenómeno se ha observado en diferentes procesos de remediación cuando la concentración de TPHs disminuye con el tiempo o cuando algún factor empieza a limitar el proceso de biodegradación (Marguesin y

Schinner, 1997; Marguessin y Schinner, 1997a, Marguessin y Schinner, 2001; Marguesin *et al.*, 2003).

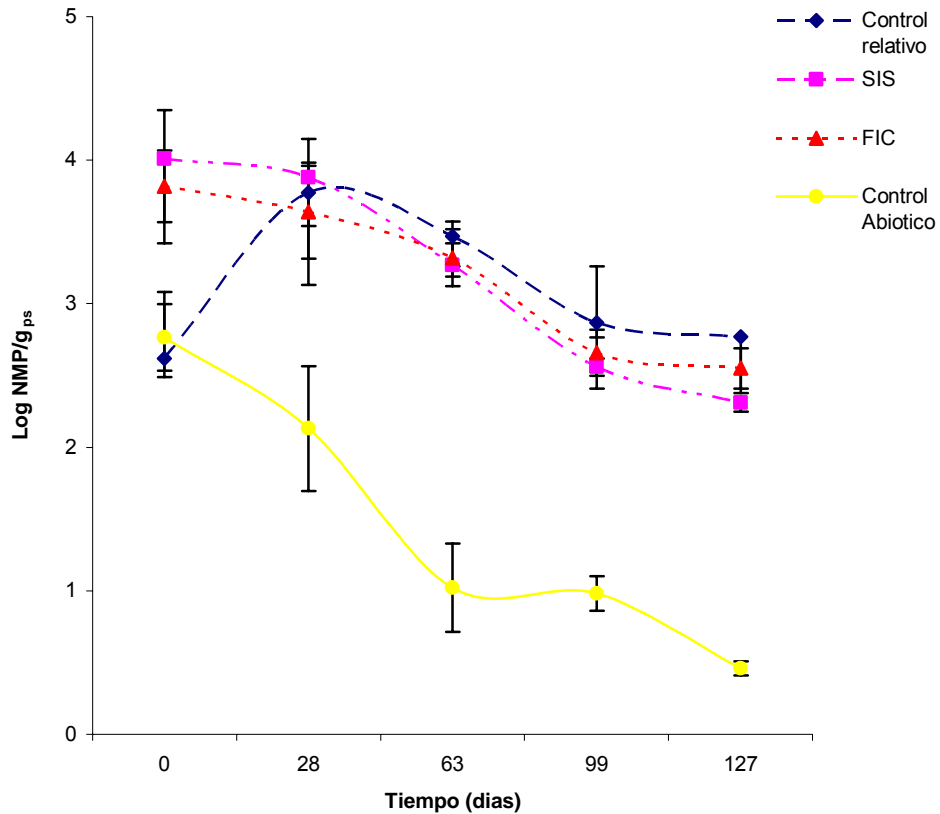


Figura 28. Recuento de microorganismos degradadores de HCs en placas de 96 pozos por la técnica del NMP. Se presenta el valor promedio de 6 datos (n=6) y las barras de error=1DS.

Al inicio del estudio los tratamientos con SIS y FIC (11×10^3 y 70×10^2 NMP/g_{ps}, respectivamente) presentaron los recuentos más altos de microorganismos degradadores de HCs que los controles (AN y abiótico), lo cual indicó que los fertilizantes suministraron los nutrientes necesarios (N y P) para el desarrollo y la actividad microbiana al inicio del estudio. Sin embargo, a partir del día 28 este rango disminuyó significativamente hasta el final del estudio alcanzando un valor de 24×10^1 y 37×10^1 NMP/g_{ps},

respectivamente. Esta disminución puede estar relacionada con los bajos valores de pH que se presentaron en los tratamientos con SIS y FIC. Los recuentos muestran que al inicio hay una rápida estimulación de los degradadores en comparación con los controles. Se ha observado en diferentes estudios de biodegradación de TPHs que al final del proceso de biodegradación, existe una acumulación de las fracciones mas largas y pesadas de HCs, las cuales son poco disponibles para los microorganismos, dificultando su rápida degradación y presentando una disminución significativa en el recuento de degradadores(Cooulon y Delille, 2001).

Al inicio del estudio, el control de AN presentó el recuento más bajo de degradadores (45×10^1 NMP/g_{ps}), el cual incremento significativamente hasta el día 28 alcanzando un recuento similar al de los tratamientos (86×10^2 NMP/g_{ps}). A partir de este día al igual que los tratamientos con SIS y FIC, mostró un descenso significativo en el recuento de microorganismos hasta el último EM (48×10^1 NMP/g_{ps}). Sin embargo, el descenso fué mayor para los tratamientos. Este control mostró un proceso de adaptación de la comunidad microbiana a los HCs que permitió el aumento de la población microbiana hasta el día 63 (Figura 28). De otra parte, el control abiótico presentó una disminución significativa en los recuentos de degradadores de HCs a lo largo del estudio, indicando que el Basamid tuvo un efecto importante sobre la población microbiana.

El rango de microorganismos degradadores que se encontró después de los 28 días del estudio mostró una población de degradadores

de HCs relativamente baja. Song y Bartha, 1990 en su estudio observaron una tendencia diferente a la del presente estudio, ellos evaluaron el efecto de un derrame de combustible para avión sobre la comunidad microbiana en un suelo arcilloso (pH de 7.5). Al inicio del estudio el número de degradadores fué de 4×10^4 NMP/g_{ps}, después de 4 semanas este rango de microorganismos aumento 2 órdenes de magnitud (10^6 NMP/g_{ps}) debido a la acción de los fertilizantes, sin embargo al final del estudio el número de degradadores permaneció en un rango aproximado a su recuento inicial, lo cual puede ser debido a que las fracciones que se encuentran en la gasolina son más ligeras y de compuestos menos pesados que son más fáciles de degradar.

Coulon y Delille, 2001 evaluaron el efecto de la bioestimulación sobre el crecimiento de bacterias en un suelo Sub-Antártico con un (pH=7.0) contaminado con diesel. Antes de la adición de los HCs el número de degradadores fué de 2.7×10^5 NMP/g_{ps}. Después de la adición de los tratamientos (Inipol) se observó un incremento significativo de microorganismos degradadores (2 ordenes de magnitud) hasta el primer mes después de la adición del fertilizante. El rango de degradadores de HCs fue más alto en el suelo contaminado con diesel, que en el suelo pristino siendo de (4.6×10^7 Vs 1.4×10^5 NMP/g_{ps}). Sin embargo, al final del estudio se observó una disminución en el número de degradadores de HCs (3 ordenes de magnitud) (después de 3 meses de contaminación). Este fenómeno, es similar al encontrado en este estudio, debido posiblemente a que los compuestos menos tóxicos (más sencillos y de bajo peso

molecular) son degradados en las etapas iniciales del proceso y los mas tóxicos (recalcitrantes) se acumulan y permanecen en el suelo por un periodo de tiempo mas largo limitando posiblemente el crecimiento de los microorganismos.

El número de degradadores de HCs encontrado en el presente estudio puede ser comparado con el realizado por Marguessin y Schinner, 1997.; en donde se evaluó la eficiencia de microorganismos nativos e inoculados en la biodegradación de suelos alpinos contaminados con diesel. Los suelos evaluados estaban constituidos principalmente por arena (58-86%) y con un pH entre 5.0-7.2. En el estudio se adicionaron nutrientes (FIC, tipo NPK) a una concentración de 100:10:1, similar a la adicionada en el presente estudio (100:10:1). Antes de la contaminación con los HCs el rango de degradadores fue de $1.5 \pm 1.3 \times 10^3$ - $3.7 \pm 3.3 \times 10^4$ NMP/g_{ps}, la menor concentración de degradadores se encontró en los suelos a un pH entre 5.0-6.2. Esta reducción en los recuentos causados posiblemente por el pH puede ser comparada con el presente estudio. Cunnigham y Philp, 2000 en su estudio reportan una concentración de microorganismos degradadores entre 10^4 y 10^5 NMP/g_{ps} en un suelo con un % de arcilla del 47% y con un pH entre 6.5-7.0, valor similar al encontrado al inicio del presente estudio.

6.6.3.1 Caracterización de microorganismos degradadores de HCs por medio de paneles bioquímicos.

De las diluciones más altas del NMP, se aislaron los microorganismos degradadores de HCs. Se obtuvieron un total de 12 cepas, las cuales fueron caracterizadas macro y microscópicamente. Posteriormente se realizaron pruebas de indol y oxidasa previa a su identificación con CRISTAL™ para gram negativos identificándose 6 microorganismos, siendo *Stenotrophomonas maltophilia* la que se presentó en mayor proporción (32%) (Tabla 21).

Tabla 21. Caracterización macro y microscópica de las cepas seleccionadas degradadoras de HCs.

No cepa	Identificación Macroscópica	Identificación Microscópica	Indol/oxidasa	Microorganismo
1.	Colonia pequeña elevada, borde irregular, color blanco cremosa.	Bacilo delgado y corto gram negativo	-/-	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
2.	Colonia pequeña, blanca cremosa, elevada, borde regular.	Coco-bacilo gram negativo	-/-	<i>Acinetobacter iwooffi</i>
3.	Colonia mediana, redonda blanca, borde regular y plana.	Bacilo largo, delgado gram negativo	-/+	<i>Burkholderia cepacia</i>
4.	Colonia mediana, blanca cremosa, elevada, borde regular, halo verdoso- azulado a la luz.	Bacilo gram negativo	-/-	<i>Pseudomonas putida</i>
5.	Colonia mediana, blanca cremosa, elevada, borde regular.	Bacilo gram negativo	-/-	<i>Chromobacterium violaceum</i>
6.	Colonia pequeña, amarilla clara, elevada, borde regular, halo.	Bacilo gram negativo	-/-	<i>Flavimonas orizihabitans</i>

Las bacterias identificadas en el presente estudio han sido reportadas como microorganismos degradadores de HCs en previos estudios: *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Burkholderia sp*, *Stenotrophomonas sp*, de la misma manera *Chromobacterium Violaceum* y *Flavimonas Orizihabitans* han sido reportadas como degradadoras de

PAHs (Eriksson *et al.*, 2003; Hamme *et al.*, 2003), y anteriormente estaban clasificadas como especies de *Pseudomonas spp.* Rahman *et al.* (2003), realizó estudios con microorganismos degradadores de HCs, dentro de los cuales se encontraban *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, *Strenophotomonas sp*, *Bacillus sp*. Las *Pseudomonas sp* han sido bastante estudiadas y existen diferentes publicaciones por su capacidad para degradar HCs. Whyte *et al.*, 1997 aislaron *Pseudomonas sp* de un suelo antártico contaminado con petróleo, y evaluaron su capacidad para degradar alcanos, tolueno y naftaleno. Por otra parte Reordon *et al.* (2000) realizó un estudio con una mezcla de HCs: Benceno, Tolueno y Etilbenceno (BTEX), observando crecimiento y biodegradación de tales compuestos por parte de *Pseudomonas*. Durante ese mismo año Greene *et al* (2000) uso un suelo al cual se le adicionó benceno, tolueno, xileno, etileno, y naftaleno, para observar la dinámica poblacional en el suelo, usando técnicas de biología molecular DGGE (electroforesis en gradiente en gel denaturante), comparó el tamaño y posición de las bandas de DNA de diferentes géneros bacterianos, para poder determinar si existían homologías entre los géneros presentes, pudiendo diferenciar géneros y especies diferentes (*Pseudomonas spp*, *Alcaligenes spp*, *Flavimonas spp* y *Rhodococcus spp*). Daane, *et al* (2001) buscó microorganismos degradadores de PAHs en sedimentos de un estuario y la rizosfera de un pantano, contaminados con naftaleno, fenantreno, y bifenil donde encontró *Pseudomonas sp*. Saadoun (2002), estudió la diversidad bacteriana en un suelo contaminado con crudo microorganismos como *Pseudomonas sp*, *Acinetobacter sp*, eran

identificados como capaces de degradar no solo este compuesto si no derivados del petróleo como diesel. 4 diferentes especies fueron identificadas *Pseudomonas Putida*, *Acinetobacter Iwooffi*, *Enterobacter Cloacae* y *Rhodococcus Erythropolis*. La prevalencia del número de genes que ellos encontraron de *Pseudomonas* en todos los tipos de suelos evaluados confirman los reportes previamente realizados acerca de su amplia distribución en suelos contaminados con HCs y su capacidad para utilizarlos como fuente de carbono y energía, permitiendo la descontaminación de muchos sitios afectados por derrames de petróleo.

Greene *et al.*, 2000 estudió la comunidad microbiana en un suelo enriquecido con una mezcla de HCs encontrando comunidades de microorganismos como *Pseudomonas*, *Alcaligenes spp* y *Rhodococcus sp*, (microorganismo aerobio de orden Actinomycete, capaz de metabolizar diferentes HCs como tolueno, benceno y fenol). Esta especie de microorganismo ha sido estudiada por otros autores como Correa *et al.*, 1999, donde el objetivo de esta investigación fue conocer su capacidad biosurfactante y evaluar su influencia en la biodegradación de HCs. Marguessin *et al.*, 2003 caracterizaron microorganismos degradadores en suelos alpinos prístinos y contaminados con diesel, en su investigación la prevalencia de 7 fenotipos involucrados en la degradación de n-alcános fueron: *Pseudomonas Putida*, *Acinetobacter sp*, *Rhodococcus sp* y *Burkordelia Cepacia*, HCs aromáticos: *P. Putida*, y PAHs: *P. Putida* y *Mycobacterium sp*. Los microorganismos fueron aislados de 12 suelos

contaminados y 8 tipos de suelos alpinos prístinos empleando análisis de hibridación con PCR.

6.7 Análisis de correlaciones

El análisis de correlación que se realizó entre los parámetros evaluados durante el estudio mostró; una fuerte correlación positiva entre el número de heterótrofos totales y los degradadores de HCs ($p < 0.05$), es decir que los recuentos de microorganismos degradadores dependen de la cantidad de heterótrofos presente. De igual forma, durante el presente estudio se presentó una correlación entre los microorganismos (heterótrofos y degradadores) y los demás parámetros determinados en el estudio, esta relación indicó como los factores (nutrientes, % de humedad y pH) pueden afectar el proceso de biodegradación (Tabla 22) ($p < 0,05$). La correlación de los parámetros microbiológicos Vs el pH, indica que los microorganismos tanto heterótrofos totales como degradadores de HCs fueron posiblemente afectados por los bajos valores de pH observados durante el estudio, pudiendo llegar a inhibir el continuo crecimiento de la población de microorganismos nativos presente en el suelo.

La concentración de nitratos presente en el suelo mostró una correlación negativa con el pH, y positiva con la densidad de microorganismos (heterótrofos y degradadores). Esta relación indicó que los bajos valores de pH observados en el estudio pudieron ser causados por el incremento en las concentraciones de nitrato

Se observó una correlación significativamente positiva ($p < 0.05$) entre la concentración de TPHs por los 2 métodos utilizados y todas las

parametros evaluados durante el estudio; con excepción del contenido de nutrientes (nitratos, amonio y fósforo). Este análisis mostró para ellos una correlación negativa con los TPHs, es decir que a medida que aumentó la concentración de nutrientes hubo una mayor disponibilidad por los microorganismos y por lo tanto disminuyó la concentración de TPHs. La fuerte correlación entre los TPHs, el pH y el % de humedad demuestra la importancia de estos parámetros dentro del proceso de biodegradación.

Tabla 23. Análisis de correlación de variables evaluadas durante los 127 días de estudio

Bioestimulación	pH	Humedad	Heterótrofos	Degradadores de HCs	Nitratos	Amonio	Fósforo	TPH G	TPH ASTM
Heterótrofos	0,307* 0,001	0,109 0,236	1,000	0,817** 0,000	0,194* 0,034	0,230* 0,000	0,431** 0,000	0,206* 0,010	0,315** 0,001
Degradadores de HCs	0,412** 0,000	0,226* 0,014	0,817** 0,000	1,000	0,291** 0,001	0,169 0,069	0,474** 0,000	0,226* 0,014	0,025 0,789
pH	1,000	0,258** 0,005	0,307* 0,001	0,412** 0,000	-0,669** 0,009	-0,410** 0,000	-0,016 0,831	0,377** 0,000	0,380** 0,000
Humedad	0,258** 0,005	1,000	0,109 0,236	0,226* 0,014	-0,157 0,088	-0,019 0,836	0,193* 0,035	0,184* 0,044	0,126 0,171
Nitratos	-0,669** 0,009	-0,157 0,088	0,194* 0,034	0,291** 0,001	1,000	0,597** 0,000	0,269** 0,003	-0,194 0,034	-0,239** 0,008
Amonio	-0,410** 0,000	-0,019 0,836	0,230* 0,000	0,169 0,069	0,597** 0,000	1,000	0,689** 0,000	-0,079 0,392	-0,471* 0,062
Fósforo	-0,016 0,831	0,193* 0,035	0,431** 0,000	0,474** 0,000	0,269** 0,003	0,689** 0,000	1,000	0,103 0,293	-0,007 0,942
TPH ASTM	0,380** 0,000	0,126 0,171	0,315** 0,001	0,025 0,789	-0,239** 0,008	-0,471* 0,062	-0,007 0,942	0,499** 0,000	1,000
TPH G	0,377** 0,000	0,184* 0,044	0,206* 0,010	0,226* 0,014	-0,194 0,034	-0,079 0,392	0,103 0,293	1,000	0,499** 0,000

* La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

** La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

7 CONCLUSIONES.

- -La adición de los nutrientes (SIS y FIC) redujo significativamente la concentración de TPHs en el suelo contaminado durante el estudio. Sin embargo, esta reducción no fue significativamente diferente a la del control relativo. La alta variabilidad presente en la matriz del suelo no permitió evidenciar diferencias en las concentraciones.
- - Las SIS presentaron los mayores porcentajes de remoción que el FIC y fueron a un mayor costo. Independiente del tratamiento, el pH para este suelo debe ser controlado
- - Los bajos valores de pH observados, pudieron inhibir el crecimiento de los microorganismos (heterótrofos y degradadores), reduciendo las tasas de degradación de TPHs en el presente estudio.
- -Los métodos analíticos evaluados durante el estudio pueden ser utilizados para la cuantificación de TPHs durante los procesos de biorremediación. Sin embargo, se debe tener un especial cuidado durante el análisis de SO, debido a las interferencias en el proceso de extracción.
- -El control abiótico permitió determinar que la biodegradación intrínseca fue el proceso predominante.
- -Se pudo determinar que *Stenotrophomonas maltophilia* (34%) fue la especie predominante durante el estudio, la cual ya había sido asociada a procesos de biodegradación de HCs.

8 RECOMENDACIONES

Se recomienda que se desarrollen estudios posteriores que mantengan la continuidad de esta investigación profundizando en aspectos como:

- Controlar y ajustar el pH durante el proceso de biorremediación en caso de ser necesario.
- Emplear las bacterias nativas identificadas en el estudio en procesos de bioaumentación.
- Realizar los estudios de biorremediación de HCs empleando otro tipo de suelos.
- Evaluar el efecto de otras fuentes de nitrógeno (p.e., KNO_3 , NaNO_3 , NH_4Cl) sobre la biodegradación de TPHs.
- Realizar 3 adiciones de nutrientes empleando la misma relación C:N:P: 100:10:1 durante el estudio de biorremediación.

9 BIBLIOGRAFÍA

- **Aguilar, G., Vasquez, R., y Fernandez., J.** 1999. La biorremediación como alternativa al tratamiento de suelos contaminados. **Avance y Perspectiva**. 17: 293-300.
- **Arevalo, D., Rubio, P., Proaño, P y Rivera, P.** 1976. Estudio general de suelos del departamento del Casanare. Intendencia de Casanare. Bogotá D.C. Volumen XII, No. 11. 65-87.
- **ASM.** 1986. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Department of Nutrition and Food Science. Massachusetts Institute of Technology, Cambridge. Washintong D.C. Pp 46-58.
- **ASTM.** 1995. D5831-96. Standard Test Method for Screening Fuels in Soils. American Society for Testing Materials. West Conshohocken,PA. Pp 1-9.
- **Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR).** 1999. Toxicological Profile for total petroleum hydrocarbons (TPH). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Pp 1-213.
- **ATSDR.** [on Line] 2003. < [http:// www. Atsdr.cdc.gov/tfacts.123.html](http://www.Atsdr.cdc.gov/tfacts.123.html) > [Consulta: 2 Febrero.2004]. USA.
- **Atlas, R.** 1975. Effects of temperature and crude oil composition on petroleum biodegradation. **Applied Microbiology and Biothechnology**.30: 396-403.
- **Atlas, R.** 1978. Microorganisms and petroleum pollutants. *BioScience*. 28: 387-394.
- **Atlas, R.** 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: **An Environmental Perspective**. *Microbial Reviews*. 45: 180-209.
- **Atlas, R.** 1988. Biodegradation of hydrocarbon in the environmental. **Environmental Biotechonology**. 45: 211-218.
- **Atlas, R y Bartha, R.** 1987. Microbial Ecology: Fundamentals and applications. Second Edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. Pp 408-419.
- **Atlas, R y Bartha, R.** 1998. Ecología microbiana y ambiental. Cuarta Edición. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. Pp 559-561.

- **Atlas, R y Bartha, R.** 2001. Ecología microbiana y ambiental. Quinta Edición. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. Pp 559-610.
- **Atlas, R.** 1996. Bioestimulación para la biorrecuperación microbiana. En: Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. España: Mc Graw Hill. Pp 15-21.
- **Ávila, M.** 1999. La biorremediación, procesos y aplicaciones. Instituto de investigación tecnológica. Escuela Politécnica Nacional. Ecuador. Pp: 1-33.
- **Baird, C.** 2001. Química ambiental. Editorial Reverte. Primera edición. Barcelona-España. Pp 246-251.
- **BASF.** 2000. Hoja de seguridad del Basamid granulado. BASF Chile S.A. Pp 8.
- **Belloso, C., Carrario, J., y Viduzzi, D.** 1998. Biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados. AIDS- Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria: 1-37.
- **Berjan, M., Gacria, V., Faus, A y Noguera, P.** 1994. El suelo y su manejo en la horticultura. Ediciones de Horticultura.S.L. Madrid-España. Pp 57-63.
- **Bitton, G.** 2002. Encyclopedia of environmental microbiology. Editorial Wyley, New-York. Segunda edición. Pp 56-97.
- **Braddock, J y Catterall, P.** 1999. A simple method for enumerating gasoline and diesel degrading microorganisms. *Bioremediation Journal* 43 (5): 81-85.
- **Braddock, J y Brown, E.** 1990. Sheen Screen a miniaturized Most-probable number method for enumeration of oil degradation microorganism. *Applied and environmental Microbiology*. 56: 3895-3896.
- **Braddock, J y Catterall, P.** 1999. A simple method for enumerating gasoline and diesel degrading microorganisms. Institute of Arctic Biology, University of Alaska. Pp 81-98.
- **Bragg, J., Prince, R., Harner, E y Atlas, R.** 1994. Effectiveness of bioremediation for Exxon Valdez oil spill. *Nature*. 368:413-418.
- **Breedveld., G y Karslen., D.** 2000. Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote contaminated soils. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 54: 255-261.

- **Brett, R., Mapson, R y Porter, J.** 2001. Microflora and nutriente changes after fumigation. Agricultura victoria, private Bag 15. Second Australasian soilborne diseases symposium. Pp 224-256.
- **Brock, D., Madigan, T y Parker, J.** 2003. Biología de los microorganismos. Decima edición. Editorial Prentice Hall. Madrid-España. Pp 43-47.
- **Brook, T., Warren, S y Zynther, R.** 2001. Biodegradation of diesel fuel in soil under varios nitrogen addition regimes. ***Soil and Sediment Contamination.*** 10: 539-553.
- **Burbano, H.** 1989. El suelo: una visión sobre sus componentes bioorgánicos. Serie investigaciones No 1, Universidad de Nariño. Pasto-Colombia. Pp 56-67.
- **Calabrese, V., Elsavege, R., Bissonnette, G y Sextone, A.** 1993. Mobility and enhanced biodegradation of a dilute waste oil emulsion during land treatment. ***Journal of Industrial Microbiology.*** 2: 13-20.
- **Castañeda, S.** 1997. Biorremediación de trazas de aceite en cortes de perforación. Unpublished Tesis de Maestría, Universidad de Los Andes, Bogotá. Facultad de ingenieria
- **Cerniglia, C.** 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. ***Biodegradation.*** Vol 3: 351-368.
- **Clark, R y Brown.** 1977. Petroleum: properties and analysis in biotic and abiotic systems. In Malins (Editions). Effects of petroleum on artic and subartic Environments and Organisms. Vol 1. ***Nature and Fate of petroleum.*** Academic Press, Inc. New York. Pp 1-89.
- **Cleves, I y Sandoval, M.** 2001. Evaluación de la biodegradación de hidrocarburos presentes en suelos contaminados con lodos aceitosos de la industria petrolera (Huila-Colombia). Trabajo de Grado. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana.
- **Coulon, F y Delille, D.** 2003. Effects of bioestimulation on growth of indigenous bacteria in sub-antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons. ***Oil & Gas Science and technology.*** 4: 469-479.
- **Cunningham, J y Philp, J.** 2000. Comparison of bioaugmentation and bioestimulation in *ex situ* treatment of diesel contaminated soil. ***Land Contamination y Reclamation.*** 4: 262-270.
- **Daane, L., Harjona, I., Zylstra, J y Haggblom, M.** 2001. Isolation and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria

Associated with the Rhizosphere of Salt Marsh Plants. ***Applied and Environmental Microbiology***. 67: 2683-2691.

-**Deni, J y Penninckx**. 1990. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon polluted soil. ***Applied and Environmental Microbiology***. 65 (9): 4008-4013.

- **Dibble, J y Bartha, R. 1979**. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. ***Applied and Environmental Microbiology***. 37 (4): 729-739.

- **Douglas, G., Prince, R., Butler, E y Steinhauer, W.** 1994. The use of internal chemical indicators in petroleum and refined products to evaluate the extent of biodegradation. In **Zhu et al., 2001**: Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. Pp 50-55.

- **ECOPETROL**. 1998-1999. Atentados contra la infraestructura petrolera en Colombia. Dirección de relaciones externas. Pp 1-26.

- **ECOPETROL**. 2001. Incremento de atentados en Colombia. Reporte especial: Subversión y medio ambiente. Defensoría del pueblo. Pp 1-18.

- **ECOPETROL** [on Line]. 2003. Reporte de estadísticas de la industria petrolera en Colombia. http://www.ecopetrol.com.co/paginas2.asp?pub_id=36162&cat_id=51&idCategoriaprincipal=10&cat_tit=Estadísticas%20y%20cifras > [Consulta: 11 Noviembre, 2003].

- **ECOPETROL**. 2004. Memorias de conferencia: "Incremento de atentados contra los oleoductos en Colombia" su incidencia económica y social. Universidad Externado de Colombia. Perez, B; Coronado, C. Pp 19.

-**Elsas, J. y Smalla, K.** 1997. Methods for Sampling Soil Microbes. In **Manual of Environmental Microbiology**. Edited by C. Hurst, G. Knudsen, M. McInerney, L. Stetzenbach & M. Walter: ASM press. Pp. 383-390

- **EPA**. 1983. EPA guide for identifying clean up alternatives at hazardous waste sites and spills: Biological treatment, EPA 600/3-83/063.

- **EPA**. 1990. Available models for estimating emissions resulting from bioremediation processes: A review. EPA 600/3-90/31.

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

-**EPA**. 1995a. Remediation case studies: Bioremediation. U.S Environmental Protection Agency member Agencies of the federal remediation technologies. EPA 600/R-93/164: 1-224.

- **EPA.** 1995b. Determination of pH (9045c) in soils. Revisión No 4. Pp 1-8.
- **EPA.** 1996a. Method 4030 "Soil screening for petroleum hydrocarbons by immunoassay". Revisión No 4, 17 Pp.
- **EPA.** 1996b. Soxhlet Extraction, Method 3540c for determination of TPH in soils. Revision No 3, 15 Pp.
- **EPA.** 1998a. Soxhlet Extraction. Method 3540C. Revisión No 5 Pp 1-16.
- **EPA.** 1998b. Oil spill program. Office Of water. Environmental Protection Agency. 2: 4-6.
- **EPA.** 1999a. Monitored Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons. Washington.
- EPA.** 1999b. Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action, and Underground Storage Tank Sites., pp. 4-17. Washington.
- **EPA.** [on Line]. 2000. *Landfarming.* < [http:// www. epa.gov/swerust1/cat/landfarm.htm](http://www.epa.gov/swerust1/cat/landfarm.htm) > [Consulta: 14 Noviembre.2003]. USA.
- **EPA. 2000.** Preliminary report of EPA efforts to replace freon for the determination of oil and grease. United States Environmental Protection Agency, Office of water. EPA-821-93-009
- EPA** 2002. Hazardous Waste and Toxics Reduction Program. Techniques for Dust Prevention and Suppression. Washington.
- **EPA.** [on Line]. 2002. < [http:// www. epa.gov/ord/site/TPHsoil.htm](http://www.epa.gov/ord/site/TPHsoil.htm) > [Consulta: 12 Octubre.2003]. USA.
- **EPA.** [on Line]. 2003. Reporting and preventing of oils spills in ambient marines and terrestrial. < [http:// www.epa.gov/oilspill](http://www.epa.gov/oilspill) > [Consulta: 7 Enero.2004]. USA.
- **Eweis, J., Ergas, S., Chang, D y Schroeder, E.** 1999. Principios de biorrecuperación. Segunda edición. Editorial Mc Graw Hill. Madrid- España. Pp 643-651.
- **Enger, I y Smith, B.** 2000. Environmental Science: A study of interrelationships. MC Graw Hill. Septima edición. Pp 23-34.
- **Ercoli, E., Galvez, J., Di paola, M., Cantero, J., Medaura, M y Bauza, J.** 2001. Analisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de

hidrocarburos en suelo. Laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza.

- **Eriksson, M., Sodersten, E., Zhongtang, Y., Dalhammar, G y Mohn, W.** 2003. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons at low temperature under aerobic and nitrate-reducing conditions in enrichment cultures from northern soils. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 275-284.

- **Espitia, T.** 2002. Caracterización fenotípica y genotípica de microorganismos indicadores de hidrocarburos. Tesis de Maestría, Universidad de Los Andes, Bogotá. Facultad de ciencias

- **Finck, A.** 1985. Fertilizantes y fertilización. Fundamentos métodos para la fertilización de cultivos. Editorial Reverte. S.A. Madrid-España. Pp 45-63.

- **Flathman, P., Krupp, B., Trausch, J., Carson, J., Yao, R., Woodhull, P., Jerger, D y Zottola, P.** 1995. Biological solid phase treatment of vinyl acetate contaminated soil: An emergency response action: En: Principios de Biorrecuperación. Pp: 210-218.

- **Fristsch, H y Huber, R.** 1995. Basamid granular a halogen free soil desinfectant. *Acta Horticulturae*. 382: 76-85.

- **Garavito, F.** 1979. Propiedades químicas de los suelos. República de Colombia, Ministerio de Hacienda y Crédito público. IGAC, Subdirección agrología. Bogotá. D.C. Pp 73-81.

- **Gary, V y Duffi, S.** 2000. Environmental Chemistry. Cuarta Edición. Oxford university press. USA. Pp 381-385.

- **Gaudy, A. F. J. y Gaudy, E. T.** 1980. In Microbiology for environmental scientist and engineers, pp. 430-432: Mac GrawHill.

- **Genes, B y Consentini, C.** 1993. Bioremediation of polynuclear aromatic hydrocarbon contaminated soils at three sites. En Hydrocarbons Contaminated Soils. Vol III, Calabrese, E., Kosticky, P. Editorial Lewis Publishers. Pp 323-331.

- **Greene, A., Kay, J., Jaber, K., Stehmejer, L y Voordouw, G.** 2000. Composition of soil microbial communities enriched on a mixture of aromatic hydrocarbons. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 5282-5289.

- **Gustafson, J.** 1998. Using TPH risk-based corrective action. *Shell News*: 6: 1-10.

- **HACH, 1994 DRL/2000.** Spectrophotometer Hand Book. HACH, Company. Procedures Manual. USA. 567p.

- **HACH, 1998 DREL/ 2000.** Soil and irrigation water manual for use with 45250-22. HACH Company. USA. 368 p.
- **Haines, J., Wrenn, B., Holder, E., Strohmeir, K., Herrington, R y Venosa, A.,** 1996. Measurement of hydrocarbon degrading microbial populations by a 96 well plate Most probable number procedure. ***Journal of industrial microbiology.*** 16: 36-41.
- **Haines, J., Hermann, R., Lee, K., Cobalini, S y Blaise, C.** 2002. Microbial population analysis as a measure of ecosystem restoration. ***Bioremediation Journal.*** 6: 283-296.
- **Haines, J., Herrmann, R., Lee, K., Cobanli, S y Blaise, C.** 2002. Microbial population analysis as a measure of ecosystem restoration. ***Biorremediation Journal.*** Vol 6: 283-296.
- **Hambrick, G., Deleane, D y Patrick, H.** 1980. Effect of estuarine sediment pH and oxidation reduction potential on microbial hydrocarbon degradation. ***Applied Environmental Microbiology.*** 40: 365-369.
- **Hamme, J., Sing, A y Ward, O.** 2003. Recent advances in petroleum microbiology. ***Microbiology And Molecular Biology Reviews.*** 67: 503-549.
- **Hickey, W.** 1995. Biodegradation y bioremediation; Technical reports. Soil ventilation: effects on microbial populations in gasoline contaminated subsurface soils. ***Journal Environmental.*** 24: 571-582.
- **Hohener, P., Hunkeler, D., Hess, A., Bregnard, T., Zeyer, J.** 1998. Methodology for evaluation of engineered *in situ* bioremediation; lessons from a case study. ***Journal Microbiology Methods.*** 5: 179-192.
- **Huesemann, M.** 1995. Predictive model for estimating the extend of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. ***Environmental Science And Technology.*** 29: 7-18.
- **Hughes, J., Beckles, D., y Chandra, S.** 1997. Utilization of bioremediation processes for the treatment of PAH contaminated sediments. ***Journal of Industrial Microbiology And Biothechnology.*** 18:157-160.
- **Hurst, C., Knudsen, G., McInerney, M., Stetzenbach, L., and Walter, M.** 1997. Manual of Environmental Microbiology. ASM PRESS. Washington, D.C. pp 753-756.
- **IGAC.** 1976. Arevalo, D., Rubio, P y Rivera, P. Estudio general de suelos de los municipios de Casanare. Bogotá. Volumen XII, No 11.

- IGAC.** 1979. Olarte, L. Métodos analíticos del laboratorio de suelos. Instituto Geográfico Agustín Codazzi (IGAC), Subdirección agrológica. Ministerio de Hacienda y crédito publico. Cuarta edición. Bogotá, D.C. Pp: 95-97, 61-67.
- **IGAC.** 1995. Suelos de Colombia: Origen, evolución clasificación, distribución y uso. Malagon, D., Pulido, C., Llinas, R y Chamorro, C. Republica de Colobia Ministerio de Credito Público. Bogotá- Colombia. Pp 469-483.
- **Jackson, W., y Pardeau, H.** 1999. Potencial for enhanced of biodegradation of crude oil in Lousiana salt marsh using nutrients amendments. *Journal applied microbiology*.85: 128-133.
- **Kao, C. y Wang, Y.** 2001. Field Investigation of the Natural Attenuation and Intrinsic Biodegradation Rates at an Underground Storage Tank Site. *Enviromental Geology* .40: 622-631.
- **Kim, D., O'Shea, K. y Cooper, W.** 2002. Degradation of MTBE and Related Gasoline Oxygenates in Aqueous Media by Ultrasound Irradiation. *Journal Of Environmental Engineering*.
- **Kastner, M., Breuener-Hammali, M y Mahro, B.** 1998. Impact of inoculation protocols, salinity and pH on the degradation of polycyclic aromatics hydrocarbons (PAH) and survival of PAH-degrading bacterial introduced into soil. *Applied Environmental Biotechnology*. 4: 359-362.
- **Korda, A., Santas, P., Tenente, A y Santas, R.** 1997. Petroleum Hydrocarbon bioremediation, sampling and analytical technique, in situ treatments and commercial microorganism currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*.48: 677-686.
- **Lagrega, M., Buckingham, P y Evons, J.** 1996. Gestión de residuos tóxicos: tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Volumen II. Editorial Mc Graw Hill. Madrid-España. pp 643-651.
- **Leahy, J y Colwell, R.** 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environmental. *Microbial Reviews*. 54 (3):305-315.
- **Levin, M y Gealt, M.** 1997. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Tercera edición. Editorial Mc Graw Hill. Madrid- España. Pp 643-651.
- **Lindstrom, J., Prince, R., Cork, J, Grossman, M., Yeager, T., Braddock, J y Brown.** 1991. Microbial populations and hydrocarbon biodegradation potencial in fertilized shoreline sediments affect by T7V Exxon Valdez oil spill. *Applied and Enviromental Microbiology*. 67(4): 1675-1681.

- **Lopez, J y Lopez, M.** 1990. El diagnostico de suelos y de plantas. Métodos de campo y de laboratorio. Editorial mundi prensa. Madrid-España. Pp 174-177.
- **Long, S., Aelion, C.,Dobbins, D y Pfaender, F.** 1995. A comparison of microbial community characteristics among petroleum contaminated and uncontaminated subsurface soil samples. *Microbial Ecology*. 30: 297-307.
- **Luzio, W.** 1982. Taxonomia de suelos: un sistema básico de clasificación de suelos para hacer e interpretar reconocimientos de suelos. SMSS Technical Monograph No 5. Universidad de Chile. Pp 120-130.
- **Macnaughton, S., Stephen, J., Venosa, A., Davis, G., Chang, Y y White, D.** 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Applied and Environmental Microbiology*. 8: 3566-3573.
- **Maldonado, C.** 2004. Evaluación de los procesos de atenuación natural de hidrocarburos de petróleo utilizados para el mantenimiento de carreteras sin pavimentar. Universidad de los Andes. Tesis de pregrado en curso. Departamento de Ciencias.
- **Marquez, F., Hernandez, V., Rodriguez, R.** 2001. Biodegradation of diesel oil in soil by microbial consortium. *Water, Air, And Soil Pollution*. 128: 313-320.
- **Marguesin, R y Schinner, F.** 1997a. Bioremediation of Diesel oil contaminated alpine soils at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 47: 462-468.
- **Marguesin, R y Schinner, F.** 1997b. Laboratory bioremediation experiments with soil from a diesel oil contaminated site significant role of cold adapted microorganisms and fertilizers. *Journal Chemical Technology And Biotechnology*. Vol 70 92-98.
- **Marguesin, R y Schinner, F.** 1997c. Efficiency of indigeneus and inoculated cold-addapted soil microorganism for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Applied And Environmental Miicrobiology*. 63 (7): 2660-2664.
- **Marguessin, R., Zimmerbauer, A y Schinner, F.** 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*. 40: 339-346.
- **Marguessin, R y Schinner, F.** 2001. Bioremediation (Natural attenuation and bioestimulation) of diesel oil contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 67: 3127-3133.

- **Marguesin, R y Schinner, F.** 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied And Environmental Microbiology*. 56: 650-663.
- **Marguessin, R., Labbé, D., Schinner, R., Greer, W y Whyte, L.** 2003. Characterization of hydrocarbon degrading microbial populations in contaminated and pristine alpine soils. *Applied And Environmental Microbiology*. 6: 3985-3092.
- **Marguessin, R., Walder, G y Schinner, F.** 2003. Bioremediation assessment of BTEX contaminated soil. *Acta of Biotechnology*. Vol 1: 29-36.
- **Mayea, S y Sordo, R.** 1989. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Puebla y Edición. Playa, Ciudad de la Habana. Pp 34-51.
- **Menzie, C., Potocki, B and J. Santodonato.** 1992. Exposure to Carcinogenic Polycyclic Hydrocarbons in the Environment. *Environmental Science & Technology*. 26:1278-1284.
- **Mishra, H., Jyot, J y Kudad, R.** 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oil-sludges contaminated soil. *Applied and Environmental Biotechnology*. 47: 462-468.
- **McInerney, M. y Sublette, K.** 1997. Petroleum Microbiology: Biofouling, Souring, and Improved Oil Recovery. In *Manual of Environmental Microbiology*, Pp. 600-607: ASM Press.
- **Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R y Lal, B.** 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily sludge contaminated soil. *Applied Environmental Microbiology*. Vol 67 No 4: 1675-1681.
- **Nagadali, T., Raymond, N., Matuzahrah, N., Gilewics, M., Budzinski, H., y Bertand, J.** 2002. Degradation of phenanthrene, methylphenantrenes and dibenziothiophene by a *Sphingomonas* strain 2mPII. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 59: 79-85.
- **National Research Council.** 1993. Bioremediation *in situ*. When does it work. National Academy press, Washintong DC: 23-33.
- **Ogram, A. y Feng, X.** 1997. Methods of Soil Microbial Community Analysis. In *Manual of Environmental Microbiology*, pp. 422-430: ASM Press
- **Ordoñez, V.** 1998. Bioremediación de residuos petroleros: Tecnificación de un proceso de degradación natural. *Revisión No 1: El petróleo y su impacto en el medio ambiente*. 1: 297-304. Bogotá-D.C.

- **Park, K., Sims, R y Dupont, R.** 1990. Transformation of PAH in soil systems. *Journal of Environmental Engineering*. 3: 632-640.
- **PEMEX.** 2000. Aspectos en la contaminación del suelo por hidrocarburos de petróleo en México. Boletines de Prensa. Pemex. Boletín No. 75/2000. México: 213-314.
- **Quijano, L y Quiza, L.** 2000. Seguimiento microbiológico de la técnica de biolabranza empleada en la biorremediación in situ de lodos aceitosos en el área de campo DINA (ECOPETROL-Huila).
- **Potter, T y Simons, K.** 1998. Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. Composition of petroleum mixtures. Volumen 2. Univeristy of Massachusetts: 101pp.
- **Piehler, M., Swistak, J., Pinckney, J y Paerl, H.** 1996. Stimulation of petroleum hydrocarbon degradation by indigenous coastal N₂ fixing bacterial consortia. University of North Carolina al Chapel Hill, Instutute of marine sciences. Morehead City, NC. EPA Cooperative Agreement 821946-01-0: 18 Pp.
- **Rhaman, K., Rhaman, S., Larshmanperumalsamy, P., Marchanti, R y Banat, R.** 2003. The potencial of bacterial isolates fro emulsification with a range of hydrocarbons. *Acta Biotechnology*. 4: 335-345.
- **Ramírez, A y Viña, G.** 1998. Limnologia Colombiana: Aportes a su conocimiento y estadísticas de análisis. Editorial Panamerica. Pp 229-234.
- **Raymond, D., Dwayne, S., Sayler, G y Stacey, G.** 1998. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in an extremely acidic environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 4180-4184.
- **Reynolds, C., Bhunia, P y Koenen, B.** 1997. Soil remediation demonstration project: Biodegradation of heavy fuel oils. Special report: 20-47.
- **Rittman, B. y Mc Carty.** 2001. Biotecnologia del medio ambiente: principios y aplicaciones. Sexta Edición. Editorial Mc Graw Hill. Madrid-España. Pp 626-647.
- **Ritter, W y Scarborough.** 1995. A review of biorremediation of contaminated soil and groundwater. *Journal Environmental Science Health*. 30(2): 333-347.
- **Roldan, F.** 2002. Evaluation of the effects of addition of oxigen (O₂) and nitrate (NO₃⁻) terminal electron acceptors to the enhanced *in situ* biorremediation of a oil contaminated Salt marsh. University Hampshire. Civil Engineering. Tesis Doctoral.

- **Roldan, F.** 2003. Comunicación personal. Profesor asistente, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. Pontificia universidad Javeriana.
- **Rosemberg, E y Ron, E.** 1996. Biorremediation of petroleum contamination. Crawford and Crawford editions. Biorremediation; principles and applications, Cambige. Univerisity press. Pp 100-124.
- **Saadoun, I.** 2002. Isolation and characterization of bacteria from crude petroleum oil contaminated soil and their potential to degrade diesel fuel. *Journal Basic Microbiology*. 42: 420-428.
- Sarate, I.** 2003. Comunicación personal. Ingeniero Agronomo, BASF, Bogotá D.C.
- **Saval, B. S.** 1995. Acciones para le Remediación de Suelos en México. Segundo Mini-simposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM. Mexico. D.C. Pp 1-67.
- **Schawab, A., Wetzels, S., Pekarek, S y Banks, K.** 1999. Extraction petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environmental Science and Technology*. 33:1940-1944.
- **Sanchez, J., Aguilar, G., y Rodriguez, R.** 1998. La biorremediación como alternativa al tratamiento de suelos contaminados. *Avance y Perspectiva*.17: 293-297.
- **Sedran, M., Pruden, A., Wilson, G., Suidan, M. y Venosa, A.** 2002. Effect of BTEX on Degradation of MTBE and TBA by Mixed Bacterial Consortium. *Journal of Environmental Engineering*. 12. 821- 830.
- **Serrano, C.** Refinería del petróleo: principios extensivos a las industrias químicas y petroquímicas. Pp 7-15.
- **Silverio, S y Sordo, R.** 1989. Introducción a la microbiología del suelo. Editorial Puebla y edición. Playa, Ciudad de la Habana. Pp 307-323.
- **Silvia, M y Fuhrmann, J.** 1998. Principles and applications of soil microbiology. Editorial Prentice Hall. Madrid-España. Pp 32-46.
- **Song, H y Bartha, R.** 1990. Effects of jet fuel spills on the microbial community of soil. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 56 No 3: 646-651.
- **Song, H., Wang, X y Bartha, R.** 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 56 No 3 652-656.

- **Sorini, S., Schobron, J., Bowes, J y Frisbie, S.** 1997. ASTM. Screening method works for heavier fuel Products. ***Soil Ground water Cleanup***. 11: 14-45.
- **Sorini, S., Schabron, J y Rovani, J.** 2001. Case studies of yield analisis by ASTM Method D-5831 using the diesel DOG(R) soil test kit. Contaminated soil sediment water: 17pp.
- **Speight, J. G.** 1991. The Chemestry and Technology of Petroleum. New York: Marcel Dekker, Inc.Pp 321-353.
- **Standard Methods.** 2000. Standard Methods for the examination of water and wastewater. American Public Health association. American Water works association. Water environmental federation. 18thed. Washintong D.C.
- **Stroo, H.** 1996. Biodegradation and bioremediation of contaminated sites: The role of soil science. In American society of agronomy and soil science society. pp 37-55.
- **Suppo, F.** 1996. Fertilizantes: Nutrición vegetal. Tercera edición. AGT Editores, S.A. México. D.F. Pp 23-31.
- **Swannel, R., Mitchell, J., Waterhouse, J., Misikin,P., Head, M., Petch, D., Jones, D., Willis, K., Lee, J y Leppo, J.** 1999. Impact of bioremediation treatments on the biodegradation of buried oil and predominant bacterial populations. Microbial Bioystems: New Frontiers. Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canadá.
- **Tan, K.** 1996. Soil sampling preparation and analysis. Marcel Dekker, NY. Pp 12-21.
- **Tosdale, S., Werner, N., y Montaner, E.** 1970. Fertilidad de suelos y fertilizantes. Editorial McGraw-Hill. Madrid-España. Pp 139-167.
- **Townsend, R., Bonner, J. y Autenrieth, R.** 2000. Microbial dynamics during bioremediation of a crude oil-contaminated coastal wetland. ***Bioremediation Journal*** 4: 203-218.
- **Trantolo y Wise.** 1995. Remediation of hazardous waste contaminated soil. ***Biodeterioration & biodegradation***. 317: 114-118.
- **Trusell, R., Greenberg, A y Clesceri, L.** 1992. Standard Methods: Métodos normalizados para el análisis de aguas. Ediciones Diaz Santos, S.A. Madrid-España.
- **Vidali, M.** 2001. Bioremediation. An overview. ***Pure Applied Chemical***. Italia. 7: 1163-1172.

- **Vives, M.** 1994. Biodegradación de hidrocarburos: aislamiento de cepas nativas degradadoras y caracterización de su ADN plasmidico. Bogota.D.C. Tesis de Maestría. Universidad de los Andes, facultad de ciencias.
- **Watkinson, R y Morgan, P.** 1990. Physiology of aliphatic hydrocarbon degrading microorganisms. ***Biodegradation***. 1: 79-92.
- **Whyte, L., Bourbonniere, L y Greer, C.** 1997. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by Psychotropic *Pseudomonas* strains Possessing Both Alkane (*alk*) and Naphthalene (*nah*) Catabolic Pathways. ***Applied and Environmental Microbiology*** **63**: 3719-3723.
- **Weisman, W.** 1998. Analysis of petroleum hydrocarbons in environmental media. Total petroleum hydrocarbon criteria working group series. Amherst, Massachusetts. Volumen 1: 6-14.
- **WDNR.** 1999. Guidance On Natural Attenuation For Petroleum Releases. Washington: Bureau for Remediation and Redevelopment Interim Wisconsin department of natural resources. Pp 324.
- **Wreen, B., Haines, J., Venosa, A., Kadkhodayan, M y Suidan, M.** 1994. Effects of nitrogen source on crude oil biodegradation. ***Journal of Industrial Microbiology***. 13:279-283.
- **Wrein, B y Venosa, A.** 1995. Selective enumeration of aromatics and aliphatics hydrocarbons degrading bacterial by a most probable number procedure. ***Journal Microbiology***. 42: 252-258.
- < [www. Ideam.gov.co/legal/decretos/1990/d1753-1994.htm](http://www.ideam.gov.co/legal/decretos/1990/d1753-1994.htm) > [on Line]. 2002. [Consulta: 14 Marzo.2004]. Colombia.
- **Yerushalmi, L., Rocheleau, S., Cimpoia, R., Sarrazin, M., Sunahara, G., Peisajovich, A., Leclair, G y Guiot, S.** 2003. Enhanced biodegradation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil. ***Bioremediation Journal***. Vol 7: 37-51.
- **Zhu, X., Venosa, A., Suidan, M., y Lee, K.** 2001. Guidelines for the biorremediation of marine shorelines and freshwater Wetland. University of Cincinnati. Department of Civil And Environmental Engineering. US Environmental Protection Agency. pp 51-53, 3-7.

ANEXO A. Cálculos para realizar la contaminación del suelo a una concentración de 20,000 mg/Kg_{ps}

$$g \text{ de suelo requerido por mesocosmo} = 48,000 \text{ cm}^3 * \frac{1.1 \text{ g}}{\text{cm}^3} = 52,800 \text{ g suelo}$$

$$52,8 \text{ kKg suelo} * 12 \text{ UE}_s = 633.8 \text{ kg} \approx 650 \text{ Kg suelo}$$

$$\frac{20,000 \text{ mg petróleo}}{\text{Kg suelo}} * 650 \text{ Kg suelo} = 1300,000 \text{ mg petróleo} * \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 13,000 \text{ g petróleo}$$

$$13,000 \text{ g petróleo} * \frac{1 \text{ mL}}{0.53 \text{ g}} = 24,390.24 \text{ mL petróleo}$$

$$24,390.24 \text{ mL petróleo} * \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} = 24.4 \text{ L petróleo}$$

ANEXO B. Cálculos realizados para determinar la humedad requerida por mesocosmo

$500\text{cm}^3 \text{ suelo} + \text{Diferentes cantidades de agua (probeta)}$

$100 - 80 - 60 - 40 - 30 - 10 \text{ mL}$

$\text{Dimensión de los mesocosmos} = 0.036\text{m}^3$

$\frac{30 \text{ mL agua}}{30 \text{ mL suelo}} * 36,000 \text{ mL} = 2.16 \text{ mL agua} = 2.16 \text{ L agua} * \text{mesocosmo}$

ANEXO C. Esterilización de suelos utilizando BASAMID® Granular (Hoja de seguridad)

A. Identificación del producto y proveedor.

Nombre del producto: BASAMID GRANULADO.

Proveedor: BASF Aktiengesellschaft unternehmensbereich Pflanzenschutz
D- 67056 Ludwigshafen.

B. Composición y descripción del producto.

Desinfectante para suelos, microgranulado.

Formula química: $C_5H_{10}N_2S_2$.

Sinónimos: Dazomet.

Ingrediente activo: Tetrahydro-3,5, dimethyl-2H-1, 3, 5-thiadiazine-2
thione..... 99%.

Ingredientes inertes:..... 1%.

Total:..... 100%.

C .Propiedades físicas y químicas del producto.

Estado físico: sólido, microgranulo o en polvo.

Apariencia y olor: Color: blanco.

Olor: característico.

Concentración: Dazomet 99% p/p.

pH (23°C): 7,1-7,2 al 1%.

Temperatura de descomposición: No determinada.

Punto de inflamación: 93°C. No hay peligro de inflamación.

Temperatura de autoignición: No es autoinflamable.

Temperatura de ignición: 270°C.

Propiedades explosivas: evitar formación de nubes de polvo, riesgo de explosión del polvo.

Punto / intervalo de fusión: 104°C.

Presión de vapor a 20°C: $5,8 \cdot 10^{-4}$ mbar.

Densidad: 0,645- 0,8 Kg/Lt.

Solubilidad en agua y otros solventes: 0,36g / 100g de agua.

D. Información General.

El BASAMID®, es un esterilizante para suelos previsto para el control de hongos, bacterias, nematodos, enfermedades y malas hierbas del suelo. Durante una semana (5- 14 días), dependiendo de la temperatura presente antes de su tratamiento; debe existir una humedad constante del suelo (al menos un 50% de la capacidad de campo), procurando al máximo proporcionar riegos frecuentes en el área a tratar (2 veces al día), con el objeto de mantener una temperatura adecuada del suelo, disminuir la concentración de sales y facilitar la emisión de los gases. Se deben cubrir los mesocosmos con un plástico durante ~5-8 días para evitar la evaporación del producto, y dejando airear durante 3 días siguientes.

ANEXO D. Cálculos realizados para la adición del Basamid®

$$\text{Area} * \text{mesocosmo} = 60 * 40 \text{ m} = 0.24\text{m}^3$$

$$\frac{70\text{g}}{1\text{m}^2} * 0.24\text{m}^2 = 16.8\text{g} * \text{mesocosmo} \approx 17 \text{ g de Basamid / mesocosmo}$$

ANEXO E. Composición del FIC (NPK) (15:15:15).

Fertilizante comercial NPK, con adición de elementos coadyuantes (Mg y S) para mejor asimilación de nutrientes.

A. Marca.

Fertilizante multipropósito marca Fergon S.A. Bogotá- Colombia.

B. Fabricación.

Las partículas con que se fabrica el NPK, son de tamaño uniforme (2-5 mm de diámetro), de colores. La mezcla resultante es seca, libre de polvo.

C. Propiedades físicas y químicas.

Aspecto: Gránulos de colores variados.

Olor: Inodoro.

pH en solución acuosa al 10%: > 4.5.

Punto de ebullición: > 210 °C (se descompone).

Punto de fusión: Depende de la composición, puede descomponerse antes de fundir.

Propiedades explosivas: No clasificado como explosivo según la Directiva 67/548/EEC, test.A 14. Este producto tiene una alta resistencia a la detonación. La resistencia disminuye en presencia de contaminantes y/o altas temperaturas. Calentándole en recipientes cerrados (p.ej: en tubos y drenajes) puede desencadenar una violenta reacción o explosión, especialmente si está contaminado con sustancias relacionadas en 10.3.

Propiedades oxidantes: Puede mantener la combustión. No clasificado como material oxidante de acuerdo con la Directiva 88/379/EEC.

Densidad aparente: Normalmente entre 900-1100 Kg./m³

Solubilidad en agua: La mayoría de las fórmulas son higroscópicas.

D. Características Generales.

Es una mezcla de fertilizantes simples, Algunas de sus materias primas son: Urea, fosfato monoamónico (MAP), cloruro de potasio (KCL), y fosfato doble de potasio y magnesio.

A.Composición química.

Nitrógeno total.....	15 %.
Nitrógeno amoniacal.....	3.0%.
Nitrógeno orgánico.....	12%.
Fósforo asimilable (P ₂ O ₅).....	15%.
Potasio soluble en agua (K ₂ O).....	15%.
Magnesio (MgO).....	4%.
Azufre total (S).....	5%.
Boro (B).....	0.15%.
Cobre (Cu).....	0.13%.
Zinc (Zn).....	0.80%.

ANEXO F. Cálculos realizados para la adición de las FIC (C:N:P, 100:10:1)

$$\frac{100 \text{ g fertilizante}}{15 \text{ g N}} * 20 \text{ g N (50\% Relación)} = 133.3 \text{ g FIC} \approx 134 \text{ g FIC}$$

ANEXO G. Cálculos realizados para la adición de las SIS (C:N:P, 100:10:1)

$$a.) \text{ Carbono existente} = 21,500 \text{ mg} / \text{Kg}_{PS}$$

$$N \text{ necesario} = 2150 \text{ mg} / \text{Kg}_{PS}$$

$$P \text{ necesario} = 215 \text{ mg} / \text{Kg}_{PS}$$

$$\text{Cantidad de Nitrógeno existente en el suelo} = 21.3 \text{ mg} / \text{Kg}_{PS} (\text{Nitrato} + \text{Amonio})$$

$$21,500 \text{ mg} / \text{Kg}_{PS} - 21.3 \text{ mg} / \text{Kg}_{PS} = 2,129 \text{ mg} / \text{Kg}_{PS} (N \text{ requerido})$$

$$\frac{2,129 \text{ mg } N}{\text{Kg suelo}} * 18.66 \text{ Kg}_{PS} = 39.24 \text{ mg } N \approx 40 \text{ mg de } N \text{ requerido} * \text{mesocosmo}$$

$$b.) \text{ Fósforo } 215 \text{ mg de } P / \text{Kg}_{PS} - 5.2 \text{ mg } P / \text{Kg}_{PS} = 201 \text{ mg } P / \text{Kg}_{PS}$$

$$\frac{201 \text{ mg } P}{\text{Kg}_{PS}} * 18.66 \text{ Kg}_{sec o} = 3,750 \text{ mg } P = 3.8 \text{ mg } P$$

$$3.8 \text{ mg } P * \frac{174.18 \text{ g } K_2HPO_4}{31 \text{ mg } P} = 21.3 \text{ g } K_2HPO_4 * \text{mesocosmo}$$

$$64.05 \text{ g } K_2HPO_4 * 3 \text{ mesocosmos}$$

ANEXO H. Técnicas para la determinación de las concentraciones de nutrientes en suelos (HACH, 1994).

A- Nitratos: Ingresar al programa 366 y colocar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 500 nm. Sacar 1 mL del extracto acuoso en una celda de vidrio y diluir con 25 mL con agua desionizada. Adicionar el contenido de 1 almohadilla de nitriver 6 y tapar. Agitar durante 3 minutos, transcurrido este tiempo, déjelo sedimentar durante 2 min. Verter el sobrenadante rápidamente a otra celda procurando no dejar pasar partículas de cadmio. Adicionar 1 almoadilla de nitriver 3 y tapar, agitar durante 30 seg. Contabilizar a partir de allí 10 minutos más, prepare la muestra de blanco empleando otra celda con 25 ml de agua desionizada. Lea después de este tiempo.

B- Amonio: Utilizar el programa No 391 y llevar a una longitud de onda de 425 nm. Pipetear 1 mL del extracto acuoso en una celda de vidrio y diluir con 25 ml de agua desionizada. Agregar 5 gotas de solución de nitrógeno amonio 1 a cada muestra incluyendo el blanco. Adicionar 1.0 mL de reactivo de nessler dentro de la muestra y agitar inmediatamente. Contabilizar 1 min de reacción y lea en el espectrofotómetro.

C- Fósforo: Ingresar al programa 531 y colocar el espectrofotómetro a una longitud de onda de 890 nm. Sacar 5 mL del extracto de bicarbonato dentro de cada una de las 2 celdas y llenar con 25 mL de agua desionizada. Agregar el contenido de 1 paquete de phosver-4 en cada una de las celdas (blanco y muestra), y contabilizar 3 minutos de reacción. Colocar el blanco y llevar a zero, contabilizar otros 7 minutos y lea la muestra.

ANEXO I. Preparación de las soluciones estándar de nutrientes (nitratos, amonio y fósforo) (Standard Methods, 1995)

A- Solución de nitratos: Preparar una solución madre de 100 ppm de N-NO_3^- , disolviendo 0,7218 g de KNO_3 , previamente secados a 100°C durante 24 horas, en 1000 ml de agua desionizada. $1\text{ml} = 100\text{ ug NO}_3^- \text{-N}$.

B- Solución de amonio: Disolver 3,819 g de NH_4Cl , secado previamente a 100°C durante 24 h, en 1000 ml de agua desionizada, para preparar una solución stock de 1000 ppm de N-NH_4 . $1\text{mL} = 1\text{mg N} = 1,22\text{ mg NH}_3$.

C- Solución de fosfato: Preparar una solución madre de 50 ppm de P, disolviendo 219,5 mg de KH_2PO_4 en 1000 ml de agua desionizada. $1\text{mL} = 50\text{ ug de P-PO}_4^{-3}$.

**ANEXO J. Agar infusión suelo (American Society for Microbiology)
(ASM, 1986)**

1. Infusión suelo.

Suelo..... 500 g.

Agua destilada..... 1 Lt.

Mezclar el suelo y el agua destilada, calentar la mezcla sin hervir durante un periodo ~ de 15 min. Pasar a través de una gasa y papel filtro, o hacer una filtración en vacío en caso de ser necesario Guardar en la nevera, hasta su utilización.

2. Preparación de agar infusión suelo.

Composición por Lt de agua destilada.

Agar nutritivo..... 20 g.

Infusión suelo..... 200 mL.

Agua destilada..... 800 mL.

Mezclar y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C.

ANEXO K. Agua Bufferada (Standard Methods, 1995)

A. Solución 1 Buffer fosfato.

KH_2PO_4 0,085 g en 1,25 mL de agua destilada.

B. Solución 2. Cloruro de Magnesio.

$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,405 g en 5 mL de agua destilada.

Mezclar y diluir con agua destilada a un volumen de 1000 mL, esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C.

ANEXO L. Caldo Bushnell- Hass (BH) (Wrenn y Venosa, 1995; Brown y Braddock, 1990).

KH_2PO_4 1g.

NH_4NO_3 1g.

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,02g

FeCl_3 0,05 g.

K_2HPO_4 1 g.

MgSO_4 0,2 g.

Mezclar todas las sales en 1 Lt de agua destilada, agitar por 30 min en plancha magnética, y esterilizar en autoclave durante 15 min a 121°C.

ANEXO M. Solución de violeta Iodonitrotetrazolium (INT).

Indicador INT (Sigma®)..... 3 g.

Agua destilada..... 1000 mL.

Mezclar el INT con agua destilada previamente esterilizada durante 15 min.
Agitar durante 1 H en plancha magnética hasta completa homogenización,
guardar en nevera en frasco oscuro.

ANEXO N. Recuento de NMP con MPN calculator, versión 4.04, EPA, 1996

Una vez obtenidos los pozos positivos de NMP, por dilución estos datos se ingresan al MPN calculator (este programa opera en DOS).

En el programa se llenan los siguientes parámetros: número de diluciones, cantidad de réplicas por dilución y volumen de muestra inicial (p.e., 20 µl de muestra inicial equivalen a 0.02 ml) y las diluciones seriadas.

Una vez se ingresan las anteriores opciones se procede a introducir los datos. Es necesario incluir todas la diluciones aún cuando estas no se hallan hecho directamente en la técnica (p.e., si en la técnica se utilizaron las diluciones 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 , en el momento de ingresar las diluciones al programa se ingresan desde 10^1), asumiendo que las diluciones menores darán todos los pozos positivos.

Finalmente el valor obtenido se expresa como NMP/mL de muestra, sin embargo cuando se trabaja con suelo, es necesario realizar las conversiones pertinentes. Por lo tanto es necesario convertir el resultado de mL a g de peso húmedo, luego eso cuanto equivale en 10 g (de la muestra utilizada) y finalmente convertirlo a gramos de peso seco (FPS).

ANEXO O. BD Sistemas BBL CRYSTAL de identificación para microorganismos gram negativos

A. Identificación y uso del producto: Sirve para la identificación de bacterias aerobias gram negativas que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* así como también bacilos gram-negativos fermentadores y no fermentadores de glucosa aislados con mas frecuencia.

B. Resumen y explicación: El sistema BBL CRYSTAL E/NF ID es un método miniaturizado de identificación. Incluyen test para fermentación, oxidación, degradación e hidrólisis de diversos sustratos. Además contiene sustratos unidos a un cromógeno para detectar la presencia de enzimas que utilizan diferentes microorganismos para metabolizar distintos sustratos.

C. Principios del procedimiento: Los análisis utilizados en el sistema BBL CRYSTAL E/NF ID están basados en la utilización y degradación de sustratos específicos por parte de los microorganismos detectados por distintos sistemas indicadores. Las reacciones de fermentación detectan la capacidad de un aislado para metabolizar los carbohidratos en ausencia de oxígeno atmosférico, y las reacciones de oxidación están basadas en la capacidad del organismos para metabolizar el sustrato siendo el oxígeno el aceptor final de electrones.

D. Procedimiento de análisis: 1- Realizar pruebas de indol y oxidasa a partir de una placa de aislamiento selectiva de no mas de 24 horas.

2- Tome un tubo de inculo y etiquetelo con el numero de la muestra. utilizando una técnica aséptica, con la punta de un asa o torunda, tome una colonia grande bien aislada (con un diámetro de 2-3 mm o mayor) o 5 colonias mas pequeñas de la misma morfología.

3- Suspenda las colonias en un tubo de fluido de inculo BBL CRYSTAL.

4- Tapone el tubo y agítelo en vortex durante aproximadamente 10-15 seg. Vierta todo el contenido del fluido en el área objetivo de la base de las placas para BBL CRYSTAL.

5- Sostenga la base con ambas manos y mueva el inoculo suavemente de un lado a otro a lo largo de las pistas hasta que se hallan llenado todos los pocillos. Haga retroceder cualquier líquido sobrante del área objetivo y coloque la base en la parte superior de un banquillo.

6- Alinee la tapa de forma que el extremo marcado de la tapa este en la parte superior del área objetivo de la base.

7- Apriete hasta que perciba una ligera resistencia.

8- Coloque cada uno de los paneles inoculados en las bandejas de incubación en un incubador sin CO₂ con una humedad de 40-60%. de 18-20h a 35-37°C.

9- Después del periodo de incubación, saque los paneles, estos deben leerse boca abajo utilizando la caja de luz o el visor del panel BBL CRYSTAL. Consulte la tabla de colores de la reacción y /o el apartado de "reactivos" para obtener una interpretación de las reacciones.

10- Realice un calculo de cada perfil positivo (4, 2 o 1) o negativo (0). Después se suman los valores resultantes de cada reacción positiva en cada columna y se genera un número de 10 dígitos.

11- Introduzca este numero en un PC disponible o emplee un lector automático BBL CRYSTAL, el PC identifica automáticamente los organismos.

ANEXO P. Niveles de detección para el método D-5831 (ASTM, 1995).

- Valores en AU de la media de la absorbancia y desviación estándar para el estándar de calibración más bajo (10 mg/L) empleado para calcular el LCM y LC.

Muestra	Absorbancia (AU)
1	0.137
2	0.178
3	0.137
4	0.141
5	0.198
6	0.190
Media	0.163
DS	0.028

El LCM fue calculado 3.37 veces la DS del estándar mas bajo empleado en la curva de calibración (10 mg/L). Usando la ecuación de la curva de calibración se obtuvo la concentración en mg/Kg_{ps}, MDL= 40 mg/Kg_{ps}. El LC fue calculado 10 veces la DS y transformado a mg/Kg_{ps} siguiendo el mismo procedimiento para el MDL, este fue de 269.88 mg/Kg_{ps}. Esto se realizo de la siguiente manera:

$$LCM_{AU} = ts = 3.37 \times 0.028 \text{ Au} = 0.094 \text{ Au}.$$

Empleando la ecuación de la curva de calibración ($Y = 0.0134x + 0.0228$) esto corresponde a una concentración de 2.72 mgTPH/L, usando la relación volumen de solvente muestra (50 mL solvente/ 5 g de suelo) este valor se convierte a 40 mgTPH/g_{ps}.

$$LCM = 2.72 \text{ mgTPH/L} \times 50 \text{ mL solvente/5 g de suelo} \times 1000 \text{ g/Kg suelo} \times 1\text{L}/1000\text{mL} \times \text{Fracción de peso seco}.$$

$$LCM = 40 \text{ mgTPH/Kg}_{ps}$$

ANEXO Q. Niveles de detección para el método de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994).

Muestra	mgTPH/Kg_{ps}
1	ND
2	308.95
3	189.04
4	748.25
5	288.02
6	368.01
7	185.61
Media	347.98
Desviación estándar (DS)	208.50

ND= No detectado.

De acuerdo a la EPA (1994), el LCM se calcula de la siguiente manera:

$LCM = ts$.

En donde: $t = 3.143$ (T student, 1 cola, $P=0.01$), y la $DS = 208.50 \text{ mg/Kg}_{ps}$

$MDL = 208.50 \times 3.143 = 655.31 \text{ mg/Kg}_{ps}$.

El LC fue calculado de acuerdo a Standard Methods, 2000:

$LC = 10DS$.

$DS = 208.50 \text{ mg/Kg}_{ps}$.

$LC = 2085 \text{ mg/Kg}_{ps}$.

ANEXO R. Tablas de Resultados

- Valores de pH durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar de 6 datos (n=6).

Tratamiento	Evento de Muestreo				
	1	2	3	4	5
Control AN	5.82 ± 0.09	5.58 ± 0.29	5.79 ± 0.17	5.16 ± 0.17	4.85 ± 0.12
SIS	5.05 ± 0.07	4.77 ± 0.10	4.70 ± 0.16	4.20 ± 0.06	4.10 ± 0.06
FIC	5.31 ± 0.11	5.19 ± 0.13	5.24 ± 0.17	4.46 ± 0.04	4.18 ± 0.06
C. Abiótico	5.27 ± 0.13	5.63 ± 0.14	5.67 ± 0.13	5.68 ± 0.10	5.08 ± 0.40

- Valores de porcentaje (%) de humedad del suelo durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar de 6 datos (n=6).

Tratamiento	Evento de Muestreo				
	1	2	3	4	5
Control AN	31.77 ± 1.82	33.74 ± 2.68	31.60 ± 1.32	32.70 ± 3.00	29.73 ± 1.87
SIS	30.91 ± 1.17	25.84 ± 2.26	29.89 ± 1.34	23.89 ± 1.62	28.65 ± 3.95
FIC	35.25 ± 1.61	24.35 ± 0.88	30.62 ± 1.27	30.41 ± 2.61	29.86 ± 3.94
C. Abiótico	31.61 ± 3.77	24.82 ± 3.85	29.53 ± 1.42	29.08 ± 2.41	23.22 ± 4.81

- Valores promedio de N-NO₃⁻ durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar de 6 datos (n=6).

Tratamiento	Evento de Muestreo				
	1	2	3	4	5
Control AN	41.50 ± 7.18	13.67 ± 4.03	33.17 ± 10.94	22.00 ± 6.48	13 ± 2.10
SIS	404.17±18.82	279.17±29.23	558.33±54.01	379.17±69.67	415.00±44.72
FIC	62.67 ± 2.80	287.50±26.22	300.00±35.36	254.17±29.23	279.18±40.05
C. Abiótico	19.67 ± 4.55	12.50 ± 1.75	14.50 ± 3.45	11.83 ± 1.72	14.67 ± 1.86

- Valores promedio de N-NH₄⁺ durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar de 6 datos (n=6).

Tratamiento	Evento de Muestreo				
	1	2	3	4	5
Control AN	15.00 ± 2.76	29.17 ± 3.54	34.00 ± 6.16	26.00 ± 2.61	44.17 ± 11.13
SIS	134.17±34.66	121.83±8.21	163.00±4.98	117.67±8.30	131.00±15.03
FIC	276.83±34.58	258.83±4.22	197.67±5.85	105.00±8.39	215.33±23.02
C. Abiótico	10.83 ± 3.19	38.50 ± 3.51	41.50 ± 5.68	48.50 ± 6.28	66.33 ± 8.24

- Valores promedio de fósforo (P) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar de 6 datos (n=6).

Tratamiento	Evento de Muestreo				
	1	2	3	4	5
Control AN	38.68 ± 2.32	35.53 ± 2.00	40.70 ± 5.25	44.39 ± 3.14	32.65 ± 2.35
SIS	55.22 ± 4.16	42.83 ± 9.66	37.21 ± 2.47	35.48 ± 1.76	34.42 ± 3.92
FIC	74.03 ± 3.76	67.32 ± 5.75	51.82 ± 6.17	50.60 ± 5.66	43.85 ± 3.34
C. Abiótico	31.93 ± 2.71	30.95 ± 2.25	32.95 ± 3.82	28.83 ± 2.15	27.07 ± 2.52

- Valores promedio de TPHs por el método D-5831 (ASTM, 1995) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar de 6 datos (n=6).

Tratamiento	Evento de Muestreo				
	1	2	3	4	5
C. AN	22,487.73 ± 2,074.75	14,050.54± 1,804.61	15,706.33 ± 1,833.96	14,519.03 ± 2,861.62	15,757.81 ± 1,321.90
SIS	22,938.45 ± 1,974.48	15,737.46 ± 1,534.21	15,372.72 ± 1,575.10	13,313.20 ± 2,190.83	14,235.24 ± 2,347.91
FIC	18,433.19 ± 2,709.20	14,274.62 ± 1,356.01	13,450.69 ± 1,534.58	13,410.02 ± 2,273.86	14,061.95 ± 1,386.86
C. Abiótico	18,700 ± 2,063.96	17,519 ± 1,720.67	14,565.58 ± 2,387.25	17,357.82 ± 1,545.95	15,181.27 ± 2,742.29

- Valores promedio de TPHs, por la técnica de EAMG (Schawab *et al.*, 1999; EPA, 1994) durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar de 6 datos (n=6).

Tratamiento	Evento de Muestreo				
	1	2	3	4	5
C. AN	21,864.26 ± 2,909.56	16,524.21 ± 1,094.81	15,491.55 ± 1,519.33	12,723.25 ± 998.37	14,367.06 ± 2,232.52
SIS	22,561.12 ± 1,726.44	16,197.09 ± 1,354.90	15,091.65 ± 2,227.94	11,800.16 ± 1,126.97	13,581.51 ± 1,931.80
FIC	20,025.43 ± 2,876.94	13,851.69 ± 643..0	14,112.13 ± 2,486.91	15,049.75 ± 1,913.01	13,512.69 ± 1,813.55
C. Abiótico	18,479.96 ± 2,876.94	16,111.81 ± 1,311.29	13,720.98 ± 2,402.79	14,565.74 ± 1,696.27	16,633.97 ± 1,848.90

- Valores de recuento en placa de heterótrofos totales UFC/g_{ps} durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar de 6 datos (n=6).

Tratamiento	Evento de Muestreo				
	1	2	3	4	5
Control AN	45 ± 2.00 x 10 ⁵	37 ± 1.38 x 10 ⁵	49 ± 1.14 x 10 ⁵	46 ± 1.20 x 10 ⁵	12 ± 1.38 x 10 ⁵
SIS	58 ± 1.54 x 10 ⁵	30 ± 1.20 x 10 ⁵	86 ± 1.10 x 10 ⁴	79 ± 1.20 x 10 ⁵	42 ± 1.47 x 10 ⁴
FIC	60 ± 1.51 x10 ⁵	13 ± 1.58 x 10 ⁵	93 ± 1.44 x 10 ⁴	71 ± 1.25 x 10 ⁵	26 ± 1.77 x 10 ⁴
C. Abiótico	27 ± 1.62 x 10 ⁶	28 ± 1.04 x 10 ⁶	14 ± 0.98 x 10 ¹	11 ± 0.25 x 10 ⁵	3 ± 0.18 x 10 ¹

- Valores de bacterias degradadoras de HCs NMP/g_{ps} durante el estudio. Se presenta el valor promedio y la desviación estándar de 6 datos (n=6).

Tratamiento	Evento de Muestreo				
	1	2	3	4	5
Control AN	45 ± 1.62 x 10 ¹	22 ± 2.88 x 10 ²	86 ± 1.62 x 10 ²	33 ± 1.65 x 10 ¹	48 ± 1.77 x 10 ¹
SIS	11 ± 1.38 x 10 ³	20 ± 1.44 x 10 ²	80 ± 1.58 x 10 ²	40 ± 1.70 x 10 ¹	24 ± 1.77 x 10 ¹
FIC	70 ± 1.47 x 10 ²	32 ± 1.47 x 10 ²	46 ± 2.95 x 10 ²	50 ± 1.58 x 10 ¹	37 ± 1.38 x 10 ¹
C. Abiótico	81 ± 2.39 x 10 ¹	45 ± 1.58 x 10 ⁰	86 ± 3.54 x 10 ⁰	27 ± 1.23 x 10 ⁰	17 ± 1.08 x 10 ⁰

ANEXO S. Análisis estadístico

A- Test de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de los datos (Statistix 8.0, 2003).

Variable	N	W	P
Nitratos	120	0.8082	0.0000
Amonio	120	0.9021	0.0000
Fósforo	120	0.9499	0.0000
Heterótrofos	120	0.6893	0.0000
Degradadores de ACPM	120	0.8720	0.0000
TPH ASTM	120	0.7451	0.0002
TPH Gravimetría	120	0.8012	0.0006
Humedad	120	0.8782	0.0000
pH	120	0.9498	0.0000

$P \leq 0.05$ Los datos siguen una distribución normal.

B- Días Vs Tratamientos (Análisis de varianza: ANOVA de 2 factores con varias muestras por grupo). Variable pH.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	12,65	4	3,16	99,00	6,87E-34	2,46
Columnas	15,84	3	5,28	165,32	1,27E-38	2,70
Interacción	4,12	12	0,34	10,75	2,168E-13	1,85
Dentro del grupo	3,19	100	0,03			
Total	35,85	119				

Muestra: Variable Vs días, Columnas: Variable Vs tratamientos, interacción: Días Vs tratamientos.

C- Días Vs tratamientos (Análisis de varianza de 2 factores con varias muestras por grupo). Variable % de humedad.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	390,36	4	97,59	12,65	2,30E-08	2,46
Columnas	327,84	3	109,28	14,16	9,20E-08	2,70
Interacción	522,75	12	43,56	5,64	2,54E-07	1,85
Dentro del grupo	771,71	100	7,72			
Total	2012,66	119				

Muestra: Variable Vs días, Columnas: Variable Vs tratamientos, interacción: Días Vs tratamientos.

D- Días Vs tratamientos (ANOVA). Variable nitratos.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	175631,42	4	43907,35	53,06	6.56E-24	2,46
Columnas	3339814,56	3	1113271,52	1345,52	1.16E-80	2,70
Interacción	451985,32	12	37665,44	45,52	4.60E-35	1,85
Dentro del grupo	82738,83	100	827,39			
Total	4050170,13	119				

Muestra: Variable Vs días, Columnas: Variable Vs tratamientos, interacción: Días Vs tratamientos.

E- Días Vs tratamientos (ANOVA). Variable amonio.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	24837,80	4	6209,45	32,85	1.77E-17	2,46
Columnas	673332,83	3	224444,28	1187,48	5.13E-78	2,70
Interacción	106219,13	12	8851,59	46,83	1.41E-35	1,85
Dentro del grupo	18900,83	100	189,01			
Total	823290,60	119				

Muestra: Variable Vs días, Columnas: Variable Vs tratamientos, interacción: Días Vs tratamientos.

F- Días Vs tratamientos (ANOVA). Variable TPHs por el método de EAMG (Schawab et al., 1999; EPA, 1994).

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	0.49	4	0.12	41.48	1.86E-20	2.46
Columnas	0.01	3	0.00	1.38	0.25	2.70
Interacción	0.12	12	0.01	3.44	0.084	1.85
Dentro del grupo	0.29	100	0.00			
Total	0.91	119				

Muestra: Variable Vs días, Columnas: Variable Vs tratamientos, interacción: Días Vs tratamientos.

G- Días Vs tratamientos (ANOVA). TPHs por el método D-5831 (ASTM, 1995).

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	3,132.16	4	783.04	44.33	2.33E-21	2,46
Columnas	11,722.09	3	3907.36	221.20	5.83E-44	2,70
Interacción	3,076.07	12	256.33	14.51	4.80E-17	1,85
Dentro del grupo	1,766.36	100	17.66			
Total	19,696.70	119				

Muestra: Variable Vs días, Columnas: Variable Vs tratamientos, interacción: Días Vs tratamientos.

H- Días Vs tratamientos (ANOVA). Variable fósforo.

ANÁLISIS DE VARIANZA						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	GL	Promedio de cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Muestra	3,132.16	4	783.04	44.33	2.33E-21	2,46
Columnas	11,722.09	3	3907.36	221.20	5.83E-44	2,70
Interacción	3,076.07	12	256.33	14.51	4.80E-17	1,85
Dentro del grupo	1,766.36	100	17.66			
Total	19,696.70	119				

Muestra: Variable Vs días, Columnas: Variable Vs tratamientos, interacción: Días Vs tratamientos.

I- Test de Scheefé, variable: NMP para degradadores de HCs.

Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Dif.medias	Error típico	Significancia
Control AN	SIS	0,077	0,151	0,96
	FIC	0,244	0,151	0,37
	Control abiótico	1,770*	0,151	0,00
SIS	Control AN	-0,077	0,151	0,97
	FIC	0,168	0,151	0,75
	Control abiótico	1,701*	0,151	0,00
FIC	Control AN	-0,244	0,151	0,46
	SIS	-0,168	0,151	0,75
	Control abiótico	1,525*	0,151	0,00
Control abiótico	Control AN	-1,769*	0,151	0,00
	SIS	-1,692*	0,151	0,00
	FIC	-1,525*	0,151	0,00

Basado en las medias observadas,

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

J- Test de Scheefé, variable: Nitrato.

Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Dif.medias	Error típico	Significancia
Control AN	SIS	-387.60*	17.90	0,96
	FIC	-229.43*	17.90	0,37
	Control abiótico	11.46	17.90	0,00
SIS	Control AN	387.60*	17.90	0,97
	FIC	158.16*	17.90	0,75
	Control abiótico	399.06*	17.90	0,00
FIC	Control AN	229.43*	17.90	0,00
	SIS	-158.16*	17.90	0,00
	Control abiótico	240.90*	17.90	0,00
Control abiótico	Control AN	-11.46	17.90	0,938
	SIS	-399.06*	17.90	0,00
	FIC	-240.90*	17.90	0,00

Basado en las medias observadas,

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

K- Test de Scheefé, variable: Amonio.

Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Dif.medias	Error típico	Significancia
Control AN	SIS	-108.50*	8.66	0.00
	FIC	-185.70*	8.66	0.00
	Control abiótico	-16.10	8.66	0.33
SIS	Control AN	108.50*	8.66	0.00
	FIC	-77.20*	8.66	0.00
	Control abiótico	92.40*	8.66	0.00
FIC	Control AN	185.70*	8.66	0.00
	SIS	77.20*	8.66	0.00
	Control abiótico	169.60*	8.66	0.00
Control abiótico	Control AN	16.10	8.66	0.33
	SIS	-92.40*	8.66	0.00
	FIC	-169.60*	8.66	0.00

Basado en las medias observadas,

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

L- Test de Scheefé, variable: Fósforo.

Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Dif.medias	Error típico	Significancia
Control AN	SIS	-8.40*	6.01	0.58
	FIC	-54.90*	6.01	0.00
	Control abiótico	35.50	6.01	0.00
SIS	Control AN	8.40	6.01	0.58
	FIC	-46.50*	6.01	0.00
	Control abiótico	43.90*	6.01	0.00
FIC	Control AN	54.90*	6.01	0.00
	SIS	46.50*	6.01	0.00
	Control abiótico	90.40*	6.01	0.00
Control abiótico	Control AN	-35.50*	6.01	0.00
	SIS	-43.90*	6.01	0.00
	FIC	-90.40*	6.01	0.00

Basado en las medias observadas,

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

M- Test de Scheefé, variable: TPHs por el método EAGM (Schawab et al., 1999; EPA, 1994).

Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Dif.medias	Error típico	Significancia
Control AN	SIS	0.017	-0.06	0.757
	FIC	0.025*	-0.06	0.036
	Control abiótico	0.007	-0.06	0.979
SIS	Control AN	-0.017	-0.06	0.757
	FIC	-0.007	-0.06	0.972
	Control abiótico	-0.010	-0.06	0.936
FIC	Control AN	0.025*	-0.06	0.036
	SIS	0.007	-0.06	0.972
	Control abiótico	-0.055*	-0.06	0.002
Control abiótico	Control AN	-0.007	-0.06	0.979
	SIS	-0.010	-0.06	0.936
	FIC	-0.055*	-0.06	0.002

Basado en las medias observadas,

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

N- Test de Scheefé, variable: TPHs por el método D-5831 (ASTM, 1995).

Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Dif.medias	Error típico	Significancia
Control AN	SIS	0.015	0.0158	0.685
	FIC	0.045*	0.0158	0.045
	Control abiótico	-0.0093	0.0158	0.951
SIS	Control AN	-0.0193	0.0158	0.685
	FIC	0.0263	0.0158	0.432
	Control abiótico	-0.0286	0.0158	0.355
FIC	Control AN	-0.0456*	0.0158	0.045
	SIS	-0.0263	0.0158	0.432
	Control abiótico	-0.0550	0.0158	0.009
Control abiótico	Control AN	0.0093	0.0158	0.951
	SIS	0.0286	0.0158	0.355
	FIC	0.0550*	0.0158	0.009

Basado en las medias observadas,

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

O- Test de Scheefé, variable: Humedad.

Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Dif.medias	Error típico	Significancia
Control AN	SIS	4.073*	1.12	0.006
	FIC	0.8110	1.12	0.913
	Control abiótico	3.537*	1.12	0.022
SIS	Control AN	-4.073*	1.12	0.006
	FIC	-3.262*	1.12	0.042
	Control abiótico	-0.536	1.12	0.973
FIC	Control AN	-0.8110	1.12	0.913
	SIS	3.262*	1.12	0.042
	Control abiótico	2.726	1.12	0.122
Control abiótico	Control AN	-3.537*	1.12	0.022
	SIS	0.536	1.12	0.973
	FIC	-2.726	1.12	0.122

Basado en las medias observadas,

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

O- Test de Scheefé, variable: pH.

Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Dif.medias	Error típico	Significancia
Control AN	SIS	0.856*	0.0628	0.000
	FIC	0.562*	0.0628	0.000
	Control abiótico	-0.0173	0.0628	0.993
SIS	Control AN	-0.856*	0.0628	0.000
	FIC	-0.293*	0.0628	0.000
	Control abiótico	-0.873*	0.0628	0.000
FIC	Control AN	-0.562+	0.0628	0.000
	SIS	0.293*	0.0628	0.000
	Control abiótico	-0.580*	0.0628	0.000
Control abiótico	Control AN	0.0173	0.0628	0.993
	SIS	0.8733*	0.0628	0.000
	FIC	0.5800*	0.0628	0.000

Basado en las medias observadas,

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

P- Test de Scheefé, variable: Recuento de heterótrofos totales.

Tratamiento (I)	Tratamiento (J)	Dif.medias	Error típico	Significancia
Control AN	SIS	0.3923	0.3676	0.768
	FIC	0.510	0.3676	0.589
	Control abiótico	2.9763*	0.3676	0.000
SIS	Control AN	-0.3923	0.3676	0.768
	FIC	0.1180	0.3676	0.991
	Control abiótico	2.584*	0.3676	0.000
FIC	Control AN	-0.5103	0.3676	0.589
	SIS	-0.1180	0.3676	0.991
	Control abiótico	2.466*	0.3676	0.000
Control abiótico	Control AN	-2.976*	0.3676	0.000
	SIS	-2.584*	0.3676	0.000
	FIC	-2.466*	0.3676	0.000

Basado en las medias observadas,

*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

ANEXO T. Determinación de humedad (IGAC, 1994)

Pesar 10 g de suelo en una cápsula metálica, o bandeja de aluminio, y colocar en horno a 105°C durante 24 horas; dejar enfriar la cápsula en el desecador y pesarla nuevamente. La humedad se calcula sobre la base de suelo seco y se presenta por Pw.

Pw = gramo de agua por 100 g de muestra.

$$P_w = \frac{\text{g de muestra húmeda} - \text{g de muestra seca}}{\text{g de muestra húmeda}} * 100$$

ANEXO U. Determinación de pH (EPA 9045c).

Pesar 20 g de suelo y adicionarlo en un beaker de 50 ml. Adicionar 20 ml de agua desionizada. Agitar continuamente la suspensión a 120 rpm durante 5 min. Transcurrido este tiempo, dejar la suspensión de suelo quieta durante 1 hora o fíltrela. Introduzca el electrodo en el beaker en el sobrenadante. Reporte el resultado como: pH de suelo en agua (°C)

ANEXO V. Datos crudos de todas las variables evaluadas durante los 5 EM

Anexo V. Datos crudos de todas las variables evaluadas durante los 5 EM

Muestreo	ID	FPS	Log UFC/g _{ps}	Log NMP/g _{ps}	N-NO ₃	N-NH ₃	Pmg/Kg _{ps}	TPHmg/Kg _{ps}	Log TPH	TPHmg/Kg _{ps}	Log	%Humedad	pH		
			HETEROTROFOS	DEGRADADORES	mg/Kg _{ps}	mg/Kg _{ps}		gravimetria	/Kg _{ps}	ASTM	TPH/Kg _{ps}				
1	I	A	1	0,66	6,26	2,19	27	17	38,4	18943,94	4,28	25898,31	4,41	34,33	5,70
1			2	0,66	6,90	2,03	27	17	36,2	23594,31	4,37	21765,61	4,34	33,79	5,94
1		B	1	0,69	6,48	2,16	29	10	36,1	20967,75	4,32	21409,51	4,33	30,73	5,88
1			2	0,70	6,67	2,35	28	15	38,8	25569,13	4,41	22526,28	4,35	30,28	5,79
1		C	1	0,69	6,54	2,30	28	17	42,2	21944,42	4,34	23513,50	4,37	31,24	5,88
1			2	0,70	6,07	2,36	29	14	40,0	20166,02	4,30	19813,18	4,30	30,24	5,75
1	II	A	1	0,68	6,46	3,24	400	109	51,2	21493,47	4,33	20678,46	4,32	31,78	5,26
1			2	0,68	6,72	3,90	375	112	56,0	24278,11	4,39	22153,81	4,35	31,95	5,14
1		B	1	0,70	6,61	3,82	425	119	50,0	23683,36	4,37	21990,49	4,34	30,34	5,13
1			2	0,71	6,94	3,98	400	110	45,4	25639,10	4,41	22087,31	4,34	28,82	5,05
1		C	1	0,69	6,95	2,66	400	190	57,3	24260,77	4,38	24904,32	4,40	31,03	4,98
1			2	0,68	6,70	2,77	425	165	61,4	16011,92	4,20	25816,30	4,41	31,51	5,31
1	III	A	1	0,65	6,94	2,43	39	313	78,4	17333,83	4,24	15450,15	4,19	34,69	5,34
1			2	0,66	6,78	2,32	43	320	70,3	20430,30	4,31	24132,56	4,38	34,40	5,20
1		B	1	0,62	6,93	2,67	44	265	74,4	19992,53	4,30	19967,46	4,30	37,68	5,25
1			2	0,63	6,74	2,38	40	240	76,9	23437,67	4,37	22315,62	4,35	36,78	5,22
1		C	1	0,66	6,54	3,02	45	241	68,8	18992,29	4,28	20256,17	4,31	34,42	5,48
1			2	0,66	6,53	2,66	44	282	75,4	19965,94	4,30	22933,38	4,36	33,53	5,36
1	IV	A	1	0,62	7,48	2,45	22	5	31,1	22.940,74	4,36	16451,17	4,22	37,74	5,52
1			2	0,66	7,35	2,47	23	10	34,4	16.880,11	4,23	18769,49	4,27	33,97	5,28
1		B	1	0,72	7,58	2,70	21	13	29,2	17.006,23	4,23	19513,10	4,29	27,53	5,24
1			2	0,71	7,45	2,50	24	12	28,8	17.882,88	4,25	18501,37	4,27	28,84	5,19
1		C	1	0,68	6,99	3,20	15	14	32,7	19.705,87	4,29	16809,44	4,23	31,87	5,21
1			2	0,70	7,51	3,27	13	11	35,4	16.463,94	4,22	22158,74	4,35	29,74	5,18
2	I	A	1	0,653	6,34	3,26	8	6	34,3	18331,26	4,26	15461,06	4,19	34,73	5,91
2			2	0,614	6,41	4,19	10	4	32,4	16822,20	4,23	12656,86	4,10	38,60	5,96
2		B	1	0,665	6,69	4,11	18	4	36,8	16195,75	4,21	15177,80	4,18	33,52	5,52
2			2	0,676	6,55	4,18	20	5	36,2	16912,55	4,23	13402,55	4,13	32,36	5,42
2		C	1	0,679	6,66	3,71	16	8	35,4	15306,44	4,18	16097,89	4,21	32,10	5,29
2			2	0,689	6,64	3,18	17	9	38,1	15577,04	4,19	11507,11	4,06	31,15	5,38
2	II	A	1	0,719	6,47	3,15	275	118	52,5	15108,42	4,18	15500,29	4,19	28,07	4,91
2			2	0,713	6,44	4,08	250	110	47,2	16140,15	4,21	14850,23	4,17	28,65	4,62
2		B	1	0,75	6,42	3,25	300	124	43,7	15096,57	4,18	15139,31	4,18	25,02	4,71
2			2	0,765	6,40	3,32	250	118	51,5	17854,31	4,25	18150,36	4,26	23,48	4,86
2		C	1	0,766	6,46	3,65	275	128	31,7	15102,43	4,18	13891,06	4,14	23,37	4,76
2			2	0,736	6,62	3,49	325	133	30,4	17880,68	4,25	16893,52	4,23	26,44	4,77
2	III	A	1	0,77	6,29	2,23	325	261	71,3	14057,04	4,15	15051,95	4,18	23,02	5,33
2			2	0,747	6,25	2,18	275	259	63	13440,41	4,13	12405,08	4,09	25,29	5,36
2		B	1	0,746	6,09	2,75	250	263	63,4	14682,40	4,17	16042,04	4,21	25,36	5,20
2			2	0,761	5,84	3,13	300	261	60,2	14474,07	4,16	14058,27	4,15	23,92	5,06
2		C	1	0,757	6,04	3,44	300	251	73,3	13208,31	4,12	14998,74	4,18	24,32	5,14

Muestreo	ID		FPS	Log UFC/g _{ps}	Log NMP/g _{ps}	N-NO ₃	N-NH ₃	Pmg/Kg _{ps}	TPHmg/Kg _{ps}	Log TPH	TPHmg/Kg _{ps}	Log	%Humedad	pH	
				HETEROTROFOS	DEGRADADORES	mg/Kg _{ps}	mg/Kg _{ps}		gravimetria	/Kg _{ps}	ASTM	TPH/Kg _{ps}			
2		2	0,758	5,82	3,04	275	258	72,7	13247,89	4,12	13091,64	4,12	24,21	5,07	
2	IV	A	1	0,649	7,44	2,26	10	36	31,2	18483,55	4,27	16913,20	4,23	35,07	5,90
2		2	0,714	7,46	1,88	12	39	34,5	16562,76	4,22	18703,41	4,27	28,62	5,67	
2		B	1	0,75	7,47	1,72	13	35	32,5	16107,56	4,21	18090,69	4,26	24,80	5,56
2		2	0,77	7,35	1,77	14	36	29,2	15159,25	4,18	19909,55	4,30	23,49	5,55	
2		C	1	0,80	7,45	1,94	16	41	29,7	14933,11	4,17	15144,65	4,18	20,39	5,61
2		2	0,78	7,43	1,81	10	44	28,6	15424,65	4,19	16355,12	4,21	21,55	5,51	
3	I	A	1	0,67	6,70	3,25	18	34	39,6	17375,23	4,24	17800,06	4,25	32,92	5,90
3		2	0,67	6,62	3,36	21	40	35,1	12934,47	4,11	16438,94	4,22	32,58	5,98	
3		B	1	0,68	6,74	2,94	36	33	44,7	15864,43	4,20	14931,57	4,17	32,31	5,83
3		2	0,68	6,72	3,38	41	29	45,0	14831,61	4,17	17476,38	4,24	31,68	5,85	
3		C	1	0,69	6,60	3,55	39	26	45,8	15514,03	4,19	14451,55	4,16	30,64	5,53
3		2	0,71	6,74	3,37	44	42	34,0	16429,52	4,22	13139,46	4,12	29,47	5,64	
3	II	A	1	0,69	5,81	2,09	525	158	33,9	16606,75	4,22	13327,40	4,12	31,35	4,98
3		2	0,71	5,92	2,07	500	160	42,0	15956,35	4,20	16156,71	4,21	28,91	4,68	
3		B	1	0,68	5,98	2,22	650	164	35,4	13732,76	4,14	15726,75	4,20	31,67	4,51
3		2	0,70	5,92	2,16	575	159	38,3	16992,93	4,23	17858,31	4,25	29,57	4,73	
3		C	1	0,70	5,93	2,28	525	166	41,0	16084,54	4,21	14413,71	4,16	29,53	4,61
3		2	0,72	5,98	2,19	575	171	36,2	11176,55	4,05	14753,46	4,17	28,30	4,66	
3	III	A	1	0,69	5,91	2,24	300	197	44,7	13195,27	4,12	15402,67	4,19	30,56	5,54
3		2	0,70	5,99	2,16	275	201	56,0	10436,96	4,02	13686,44	4,14	29,59	5,31	
3		B	1	0,70	5,64	2,69	300	194	52,8	16565,30	4,22	13377,47	4,13	29,72	5,11
3		2	0,68	5,99	2,56	350	189	60,1	12470,42	4,10	13433,88	4,13	32,39	5,25	
3		C	1	0,71	6,05	2,52	325	199	44,6	16600,94	4,22	10713,19	4,03	29,50	5,14
3		2	0,68	6,09	2,39	250	206	52,7	15403,86	4,19	14090,50	4,15	31,96	5,09	
3	IV	A	1	0,72	0,14	1,22	9	48	33,8	17882,35	4,25	17761,48	4,25	28,14	5,68
3		2	0,72	0,14	0,95	13	39	32,6	14196,23	4,15	16560,85	4,22	27,60	5,88	
3		B	1	0,70	0,16	0,00	14	32	29,9	14381,71	4,16	13030,60	4,11	30,17	5,75
3		2	0,71	0,15	0,00	17	41	27,8	11586,38	4,06	15311,21	4,19	29,49	5,66	
3		C	1	0,70	0,16	0,16	19	46	38,6	11324,22	4,05	13568,54	4,13	30,46	5,54
3		2	0,69	0,16	0,00	15	43	35,0	12955,01	4,11	11340,80	4,05	31,33	5,52	
4	I	A	1	0,70	6,67	2,40	28	22	40,5	11548,37	4,06	13561,33	4,13	30,30	5,30
4		2	0,66	6,60	2,45	16	28	54,6	13.597,47	4,13	18704,69	4,27	33,56	5,23	
4		B	1	0,62	6,80	2,69	14	27	64,9	12832,37	4,11	16591,10	4,22	37,56	5,39
4		2	0,66	6,65	2,53	19	24	54,2	13973,78	4,15	15179,22	4,18	34,30	5,11	
4		C	1	0,69	6,55	2,45	26	29	43,4	12538,47	4,10	11628,22	4,07	30,57	4,95
4		2	0,70	6,67	2,51	29	26	47,2	15493,27	4,19	11449,62	4,06	29,92	4,99	
4	II	A	1	0,77	5,79	2,12	300	107	42,5	12333,73	4,09	13561,33	4,13	23,27	4,27
4		2	0,77	5,83	2,52	400	110	48,6	11369,22	4,06	11469,71	4,06	22,70	4,22	
4		B	1	0,78	5,95	2,18	475	116	32,7	12265,44	4,09	16591,10	4,22	21,60	4,26
4		2	0,75	5,96	2,40	425	124	36,5	13393,20	4,13	15179,22	4,18	25,36	4,17	

Muestreo	ID	FPS	Log UFC/g _{ps}	Log NMP/g _{ps}	N-NO ₃	N-NH ₃	Pmg/Kg _{ps}	TPHmg/Kg _{ps}	Log TPH	TPHmg/Kg _{ps}	Log	%Humedad	pH	
			HETEROTROFOS	DEGRADADORES	mg/Kg _{ps}	mg/Kg _{ps}		gravimetria	/Kgps	ASTM	TPH/Kgps			
4		C 1	0,75	5,83	2,31	375	120	38,7	11348,42	4,05	11628,22	4,07	24,74	4,10
4		2	0,74	5,98	2,20	300	129	41,4	10090,92	4,00	11449,62	4,06	25,68	4,19
4	III	A 1	0,71	5,98	2,15	225	102	42,0	13830,11	4,14	14309,48	4,16	29,36	4,53
4		2	0,71	5,82	2,35	250	98	50,3	14960,16	4,17	16316,85	4,21	29,30	4,44
4		B 1	0,72	5,93	2,37	250	112	57,2	16212,01	4,21	12353,90	4,09	27,84	4,48
4		2	0,71	5,72	2,39	300	117	47,9	12453,35	4,10	11015,38	4,04	28,56	4,44
4		C 1	0,66	5,80	2,65	225	95	56,2	14848,65	4,17	15432,33	4,19	34,07	4,45
4		2	0,67	5,78	2,42	275	106	50,0	17994,22	4,26	11032,17	4,04	33,32	4,43
4	IV	A 1	0,68	0,17	0,00	9	46	24,6	14654,29	4,17	16565,03	4,22	31,68	5,64
4		2	0,69	1,31	0,00	12	57	23,1	12947,57	4,11	19833,04	4,30	30,56	5,55
4		B 1	0,66	0,18	0,00	14	51	20,6	17050,62	4,23	18148,23	4,26	33,93	5,69
4		2	0,65	1,19	0,22	10	44	17,9	14429,73	4,16	15247,25	4,18	35,47	5,81
4		C 1	0,72	1,38	0,00	14	40	15,7	12538,77	4,10	17019,08	4,23	27,58	5,77
4		2	0,70	0,16	0,00	12	53	18,4	15773,47	4,20	17334,27	4,24	30,15	5,60
5	I	A 1	0,766	6,04	2,46	11	32	36,1	16482,31	4,22	16220,31	4,21	29,18	4,95
5		2	0,783	5,95	2,39	13	41	33,4	17537,22	4,24	13839,91	4,14	26,20	4,99
5		B 1	0,752	5,90	2,26	20	30	30,7	13691,82	4,14	16941,65	4,23	31,34	4,71
5		2	0,76	6,07	2,16	21	33	29,8	12490,31	4,10	14461,66	4,16	30,36	4,92
5		C 1	0,756	6,12	2,17	24	29	34,2	14158,47	4,15	17058,65	4,23	30,90	4,76
5		2	0,757	6,30	2,21	20	26	31,7	11842,21	4,07	16024,68	4,20	30,39	4,75
5	II	A 1	0,811	5,63	2,17	500	152	40,9	12998,20	4,11	16989,86	4,23	22,46	4,15
5		2	0,741	5,65	2,13	450	121	39,5	16534,56	4,22	13226,97	4,12	33,11	4,05
5		B 1	0,753	5,33	2,16	475	145	37,2	13356,41	4,13	15021,48	4,18	32,52	4,19
5		2	0,77	5,59	2,20	400	114	28,9	13809,54	4,14	13415,10	4,13	28,67	4,02
5		C 1	0,767	5,33	2,27	425	133	40,6	14222,90	4,15	10532,81	4,02	28,73	4,1
5		2	0,784	5,28	2,11	350	121	39,4	10567,46	4,02	16225,23	4,21	26,44	4,11
5	III	A 1	0,741	5,65	2,36	270	193	42,4	14776,65	4,17	12709,39	4,10	32,97	4,19
5		2	0,75	5,54	2,63	280	227	40,7	15311,68	4,19	13463,30	4,13	31,47	4,27
5		B 1	0,743	5,15	2,48	300	254	46,9	14388,72	4,16	14231,87	4,15	32,21	4,12
5		2	0,785	4,99	2,71	350	201	44,3	12402,02	4,09	15993,51	4,20	25,76	4,2
5		C 1	0,797	5,32	2,45	250	198	48,5	10359,51	4,02	15339,20	4,19	23,96	4,13
5		2	0,744	5,20	2,67	230	219	40,3	13837,57	4,14	12634,41	4,10	32,76	4,15
5	IV	A 1	0,825	4,23	0,08	12	62	26,8	14600,10	4,16	17715,44	4,25	20,10	4,71
5		2	0,8	2,25	0,00	10	57	30,1	16677,16	4,22	17899,46	4,25	23,73	4,88
5		B 1	0,741	0,13	0,00	11	66	19,7	19028,50	4,28	16644,82	4,22	32,57	4,81
5		2	0,81	2,09	0,09	11	73	22,6	15463,80	4,19	12836,30	4,11	22,40	4,9
5		C 1	0,826	2,32	0,00	10	79	20,2	15350,24	4,19	14811,97	4,17	20,10	5,65
5		2	0,824	0,08	0,00	9	61	28,4	18684,02	4,27	11179,64	4,05	20,43	5,53