



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**

Título:

**Ensayos de tratabilidad en suelos
contaminados con petróleo**

**Tesis presentada en Opción al Título Académico de *Master* en Biotecnología.
Mención Ambiental**

Autora:

Ing. Janet Nápoles Álvarez

Tutoras:

Dra. Arelis Abalos Rodríguez

Dra. Alina Marañón Reyes

Consultante:

Dr. Manuel Valle Matos

Año 2005

“Año de la Alternativa Bolivariana para las Américas

RESUMEN

El suelo constituye la parte superficial de la tierra, proporciona los alimentos y sustento para la supervivencia. En este trabajo se caracterizó el suelo de tres estaciones contaminadas con hidrocarburos del área de Movimiento y Almacenaje de Productos de la Refinería "Hermanos Díaz". Los principales resultados obtenidos demostraron una contaminación por hidrocarburos entre 5 y 12 %, con un contenido de carbono orgánico variable entre 3 y 7 %. La actividad respirométrica del suelo tuvo un comportamiento diferente en las tres estaciones de muestreo, siendo el tratamiento con nutrientes más efectivo en la Estación 2. En el ensayo de tratabilidad en microcosmos para la Estación 2, el tratamiento con nutrientes logró el porcentaje de biodegradación más alto, con un 46,27 %, alcanzándose la estabilidad de los resultados desde la segunda semana de tratamiento.

ABSTRACT

The soil constitutes the superficial part of the earth, it provides food and sustenance for the survival. In this work the soil of three polluted stations with hydrocarbons, of the area of Products Movement and Storage of the Refinery "Hermanos Díaz", was characterized. The main obtained results demonstrated a contamination with hydrocarbons between 5 and 12%, with a content of organic carbon between 3 and 7%. The respirometric analysis of the soil had a different behavior in the three sampling stations, being the treatment with nutrients more effective in the Station 2. In the biotreatability assays in microcosms for the Station 2, the treatment with nutrients showed the higher percentage of biodegradation, with 46,27%, being reached the stability of the results since the second week of treatment.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
2.	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1	Suelo. Generalidades	5
2.1.1	Estructura y composición	5
2.1.2	Fracción inorgánica	5
2.2	Contaminación de los suelos por petróleo	6
2.3	Microorganismos del suelo degradadores de hidrocarburos	7
2.4	Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos	7
2.4.1	Estrategias de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos	7
2.4.2	Tecnologías de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	8
2.5	Fundamento bioquímico de la biodegradación de hidrocarburos	9
2.5.1	Metabolismo microbiano de los hidrocarburos	9
2.6	Factores que afectan la biodegradación de hidrocarburos en suelos	10
2.6.1	Tipo y concentración del contaminante	10
2.6.2	Concentración de nutrientes	11
2.6.3	Oxígeno	11
2.6.4	Condiciones ambientales	11
2.6.5	Presencia de inhibidores	12
2.6.6	Biodisponibilidad.....	12
2.6.7	Población microbiana y cometabolismo	12
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
3.1	Origen y toma de las muestras	14
3.2	Diseño experimental	14
3.3	Caracterización de los suelos	14
3.3.1	Ensayo rápido de aireación de suelos	14
3.3.2	Determinación de la capacidad de campo	14
3.3.3	Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles y contenido de humedad	15
3.3.4	Determinación del pH del suelo	15
3.3.5	Determinación del contenido de hidrocarburos	16
3.3.6	Determinación del Carbono Orgánico Total (COT)	16
3.3.7	Determinación de la conductividad eléctrica de las muestras de suelo	16
3.3.8	Determinación de nitratos	16
3.3.9	Determinación de fosfato.....	17
3.4	Determinación de población microbiana heterótrofa y degradadora de hidrocarburos	17
3.4.1	Determinación microbiológica de población microbiana heterótrofa	17
3.4.2	Determinación de población microbiana degradadora de hidrocarburo	17
3.5	Determinación de la actividad respirométrica del suelo (evolución de CO ₂).....	17
3.6	Ensayos de tratabilidad de suelos en microcosmos	18
3.7	Equipos. Materiales y reactivos	18
3.7.1	Equipos	18
3.7.2	Reactivos químicos y medios de cultivo	19
4.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	21
4.1	Evaluación del Impacto Ambiental (EIA) del Área de Movimiento y Almacenaje de Productos (MAP)	21

4.2	Caracterización físico – química de los suelos	22
4.3	Determinación de población microbiana heterótrofa y degradadora de hidrocarburos	24
4.4	Actividad respirométrica del suelo	25
4.5	Ensayo en microcosmos	26
5.	CONCLUSIONES	28
6.	RECOMENDACIONES	28
7.	BIBLIOGRAFÍA	29

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es una capa de espesor variable que recubre las rocas sobre la superficie terrestre y que evoluciona con el tiempo a velocidad y ritmos variables, para cada uno de los elementos que lo forman y sus interacciones. Tiene múltiples usos, el primero y esencial es el de soporte de toda actividad humana. Posee valor urbanístico y no urbanístico, entre este último se encuentra su valor agrícola como la principal fuente de alimentación del hombre; su valor forestal y ganadero; valor por sus recursos naturales; valor paisajístico, histórico, cultural y para preservar su flora, fauna y equilibrio ecológico (López y col., 2002).

La contaminación del suelo ocurre por los aportes de materia orgánica e inorgánica que rompen el equilibrio normal entre el medio físico, químico y biológico, compatible con la vida. Las causas principales de la contaminación de los suelos son el uso irracional de pesticidas agrícolas no biodegradables y de fertilizantes minerales; las lluvias ácidas; los desechos urbanos e industriales que contienen metales pesados, grasas, detergentes, sales, microorganismos patógenos y compuestos derivados del petróleo (Orozco y col., 2004).

Entre las distintas tecnologías disponibles para la descontaminación de un suelo, es importante diferenciar aquellas que suponen el traslado del problema a otros compartimentos ambientales (solución temporal), de aquellas que suponen una verdadera solución y que están basadas en la modificación de los contaminantes en productos menos tóxicos y que constituyen una solución definitiva. La biorremediación está en esta última categoría y se define como el uso combinado de la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias fundamentalmente) y sistemas ingenieriles para transformar y degradar contaminantes; acelerando el proceso de biodegradación natural (Viñas, 1999; Solanas, 2002).

El precio de recuperar los ecosistemas contaminados es incalculable. Por ello, los gobiernos, las industrias y la sociedad han reconocido la necesidad de utilizar alternativas más económicas a los métodos tradicionales físico – químicos. No es de extrañar que la biorremediación constituya una de las metodologías en expansión, configurándose como una tecnología muy competitiva, entre otras ventajas por su bajo costo (Viñas y col.; 2001).

Las malas prácticas en el manejo de los hidrocarburos, los accidentes durante el transporte de combustible y otros productos procesados, han traído como consecuencia problemas ambientales en los que se ha hecho evidente la contaminación de grandes extensiones de suelo superficial y la afectación de cuerpos de agua. (Viñas, 1999).

La Refinería de Petróleo “Hermanos Díaz” de Santiago de Cuba posee áreas extensas de suelo contaminadas por hidrocarburos debido a la actividad que se desarrolla en ellas y que comprende el almacenaje de los petróleos y derivados. El Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) ejecuta con la Refinería “Hermanos Díaz” un proyecto dentro del Programa de Medio Ambiente Recuperación de Ecosistemas (Bahía) con el objetivo de estudiar la degradación del petróleo y sus derivados, aplicando técnicas de biorremediación por la necesidad de sanear los ecosistemas impactados con hidrocarburos, respondiendo a un problema ambiental del territorio.

Problema

¿Es posible utilizar la capacidad metabólica de los microorganismos para biodegradar petróleo en suelos contaminados?

Hipótesis

La estimulación microbiana con nutrientes favorece la biodegradación de petróleo.

Objetivo general

Evaluar la degradación microbiana de hidrocarburos en suelos contaminados utilizando ensayos de tratabilidad.

Objetivos específicos

- Caracterizar el suelo del área de Movimiento y Almacenaje de Productos (MAP) de la Refinería “Hermanos Díaz”.
- Determinar población microbiana heterótrofa y degradadora de hidrocarburos en el suelo contaminado.
- Realizar la actividad respirométrica del suelo.
- Realizar ensayos de tratabilidad de suelos contaminados aplicando la bioestimulación en microcosmos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Suelo. Generalidades

El suelo es la parte superficial de la litosfera. Está constituido por una mezcla variable de partículas minerales, materia orgánica, aire y agua. Se forma a través de un conjunto de procesos físicos, químicos y biológicos sobre el medio rocoso original (meteorización), siendo el soporte material para el desarrollo de organismos vivos (Domènech, 2000). La cantidad de los constituyentes del suelo no es similar en todos, ya que varía con la localidad (Alonso y col., 1974; Atlas y Bartha, 2002).

2.1.1 Estructura y composición

Debido a la infiltración de agua edáfica, que produce una cierta meteorización química, así como a la actividad orgánica en el suelo, se desarrolla una estructura secuencial en capas u horizontes según la profundidad. El conjunto de horizontes, denominado perfil, da idea de la estructura global del suelo. Los horizontes tienen diferentes propiedades físicas y químicas, dependiendo del proceso de formación del suelo. Básicamente se distinguen tres horizontes; los cuales de menor a mayor profundidad se clasifican como:

Horizonte A: Está constituido de partículas minerales y materia orgánica fresca y parcialmente descompuesta. Es una zona del suelo donde se produce mucha lixiviación, principalmente de sales de hierro, aluminio y manganeso. Contrarrestando la acumulación de materia orgánica procedente de organismos vivos, tiene lugar una transferencia de compuestos orgánicos sencillos hacia horizontes más profundos. En este horizonte predominan los materiales silíceos.

Horizonte B: Se produce una acumulación de los compuestos de lixiviación procedentes del horizonte A. En esta zona tiene lugar una lixiviación moderada y la oxidación de materia orgánica. Contiene óxidos de hierro (III), que provocan una coloración amarillo - marrón. También, hay presencia de silicatos laminares.

Horizonte C: Es el más profundo y se caracteriza por la inexistencia de lixiviación. En esta zona de meteorización pobre, se observa la presencia de material poco particulado.

En los tres horizontes, a causa de los procesos de oxidación de la materia orgánica y de la formación de óxidos, hay un consumo neto de oxígeno edáfico, lo que conlleva a una reducción de este gas con la profundidad. Por el contrario, hay una mayor producción de CO₂ paralela a la disminución de materia orgánica que se observa al aumentar la profundidad (Domènech, 2000; Orozco y col., 2004).

2.1.2 Fracción inorgánica

La fracción inorgánica constituye el 45 % de la composición edáfica. Según el tamaño de las partículas minerales, se pueden distinguir tres fracciones: la fracción más gruesa (arena), con tamaño de partícula entre 2 y 0.05 mm, la fracción fina (limo) con tamaños comprendidos entre 0.05 y 0.002 mm, y la fracción muy fina (arcilla), con tamaños inferiores a 0.002 mm. La fracción con partículas de tamaño superior a 2 mm, se denomina arena gruesa o grava.

Comúnmente, en el suelo existe una mezcla de estas fracciones y la cantidad relativa de cada una determina la textura del suelo. A su vez, la textura de un suelo condiciona su porosidad, que es una medida del volumen de espacios por volumen de suelo. Normalmente, del 40 al 60 % del volumen del suelo son poros, por los cuales puede circular el aire y el medio acuoso edáfico. Por otra parte, el tamaño medio de los poros del suelo determina su permeabilidad, es decir, la velocidad con que el fluido acuoso y el aire se mueven de las capas altas del suelo a las más profundas. Otro parámetro que define la textura del suelo es su estructura, la cual indica cómo se unen las partículas edáficas entre sí. Tanto la textura, porosidad, permeabilidad y estructura del suelo en su conjunto, definen la capacidad del suelo de retener agua, airearse y poder cultivarse (Alonso y col., 1974; NC 30:1999; NC 31:1999; Atlas y Bartha, 2002). En la Tabla 1, se indican algunas propiedades de las distintas fracciones del suelo.

2.2 Contaminación de los suelos por petróleo

El suelo es el componente del medio ambiente que ha sufrido un mayor deterioro en menor tiempo si se compara con los factores: aire, agua y atmósfera, los cuales han tenido mayor atención tanto desde el punto de vista legislativo como técnico. Entre los contaminantes del suelo se encuentran los hidrocarburos utilizados en las industrias, específicamente en las refinerías (http://www.mejico.org/biorremediacion_de_suelos_y_aguas-contaminadas.html, marzo 2002; http://www.ceakumal.org/bcentro_de-manejo_integral_de_residuos_cemir.html, agosto 2002).

El petróleo es un líquido oleoso, bituminoso, de origen natural y composición compleja. Contiene básicamente hidrocarburos (50 – 98 %), compuestos que contienen oxígeno, nitrógeno y azufre y metales pesados como el vanadio. Los petróleos procedentes de diferentes depósitos e incluso de un mismo yacimiento se diferencian unos de otros por sus propiedades físicas y químicas. Las propiedades del petróleo determinan la orientación de su refinado e influyen de forma decisiva en la calidad de los productos de petróleo obtenidos (Bogomólov y col, 1984). Existen las más diversas clasificaciones químicas, genéticas, industriales y comerciales de los petróleos, entre ellas, según su densidad: ligeros $\tilde{n}_{15}^{15} < 0.828$, medios $\tilde{n}_{15}^{15} = 0.828 - 0.884$ y pesados $\tilde{n}_{15}^{15} > 0.884$; según el contenido de azufre: poco sulfuroso (contiene no más de 0.5 % de azufre), sulfuroso (contiene de 0.51 a 2.0 % de azufre) y altamente sulfuroso (contiene más de 2 % de azufre) (Sugiera y col., 1997; CPP, 2003).

Los compuestos del petróleo se dividen en tres grandes grupos por su estructura química: hidrocarburos alifáticos o parafinas (los átomos de carbono están organizados en forma de cadenas lineales o ramificadas (isoprenoides)); hidrocarburos alicíclicos o naftenos (los átomos de carbono forman un anillo o ciclo) y los hidrocarburos aromáticos (son anillos derivados del benceno sustituidos o no, simples o fusionados) (Young y Cerniglia, 1995; Breedveld y Karesen, 2000; <http://www.ingenieroambiental.com/informes/contaminacionhidrocarburos.htm>, julio 2003; <http://biblioweb.dgsca.unm.mx/libros/microbios/Cap2.htm>, enero 2004).

Los hidrocarburos aromáticos se consideran los contaminantes naturales de origen antropogénico de mayor interés, ya que por su estructura molecular son los más difíciles de degradar, permaneciendo durante largos períodos de tiempo sin sufrir modificaciones estructurales, causa directa de su recalcitrancia y resistencia a la degradación microbiana. Dentro de los hidrocarburos aromáticos se incluyen los arenos o aromáticos sustituidos,

heterocíclicos y poliaromáticos (Harayama y col., 1999; Yeonghee y col., 1999; Golobocanin y col., 2004).

2.3 Microorganismos del suelo degradadores de hidrocarburos

Existe una gran diversidad microbiana en el suelo, entre bacterias (varios miles de millones por gramo de suelo), actinomicetos, hongos y protozoos. El número y tipo de microorganismos presentes en el suelo depende de varios factores ambientales como nutrientes, humedad, aireación, temperatura, pH, prácticas agrícolas, entre otros (Alexander, 1977). En la Tabla 2 se muestran los principales microorganismos degradadores de hidrocarburos. Entre los géneros de bacterias más citados se encuentran *Pseudomonas* y *Bacillus*, entre los hongos destacan los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Phanerochaete* y *Pleurotus*. Estos dos últimos se agrupan en los conocidos hongos de pudrición blanca.

Para que ocurra el proceso de biodegradación es muy importante que exista población microbiana y que esté adaptada al sustrato, es decir, poseer los enzimas necesarios que catalicen las reacciones de degradación de los hidrocarburos. Las poblaciones individuales pueden metabolizar un número limitado de hidrocarburos y son las poblaciones mixtas las que pueden degradar compuestos hidrocarbonados complejos y mezclas de ellos en suelos y aguas (Cerniglia, 1992).

2.4 Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

La creciente demanda de energía en el mundo moderno ha determinado el uso intensivo del petróleo y sus derivados como fuente energética. Muchos de sus componentes son empleados como materia prima en las industrias químicas y petroquímicas. Este aumento en la explotación del petróleo ha determinado la aparición de continuas fuentes de contaminación ya sea por derrames de buques petroleros, en el proceso de extracción, refinación o transporte

(<http://www.ingenieroambiental.com/informes/contaminacionhidrocarburos.htm>, julio 2003; <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microois/Cap2/htm>, enero 2004).

La biorremediación es una tecnología que utiliza la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas) y/o sistemas biológicos (enzimas) para producir una transformación parcial o total de contaminantes orgánicos. La transformación parcial es la obtención de un compuesto menos tóxico que el parental, mientras que la mineralización o transformación total es la degradación hasta dióxido de carbono, agua (procesos aerobios) y metano en condiciones anaerobias. El objetivo principal de la biorremediación es estimular los procesos biodegradativos que de forma natural tienen lugar en los sistemas acuáticos y terrestres (Maier y col., 2000).

2.4.1 Estrategias de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Las estrategias de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se agrupan en dos tipos: intrínseca o atenuación natural y dirigida. La primera se basa en la capacidad de las poblaciones microbianas autóctonas para llevar a cabo, de forma natural y, simultánea los procesos físicos – químicos de la transformación de los contaminantes. En este caso la participación del hombre es de seguimiento y control del proceso. La biorremediación dirigida

consiste en provocar la bioestimulación o bioaumentación de las poblaciones microbianas (Viñas y col, 2001; Solanas, 2002).

La biorremediación por bioestimulación se basa en estimular el crecimiento de los microorganismos indígenas por la adición de nutrientes (NO_3^- y PO_4^{3-} fundamentalmente) (Solanas, 2002), oxígeno y agua (en forma de H_2O_2 o por agitación) (Trejo, 1997; Cabrerizo y col., 1999). La biorremediación por bioaumentación consiste en inocular microorganismos exógenos con actividad biodegradativa, ya sea por adaptación (Bossert y Bartha, 1984; Kerr y Capone, 1998) o manipulación genética (Hada y Sizemore, 1981; Leahy y Colwell., 1990; Ford y col., 1999). Se aplica cuando la microbiota indígena está muy deprimida o no existe (Viñas y col, 2001). Los microorganismos son introducidos en formulaciones liofilizadas mezcladas con nutrientes minerales (Kaushanskii y col, 1994) y PUTIDOIL, cultivo puro liofilizado de *P. putida* más nutrientes (Kaushanskii y col, 1994; Fonseca, 1998). La bioaumentación ha sido utilizada comúnmente en la biorremediación de aguas contaminadas y tiene la ventaja, en principio, de que no introduce nuevos elementos; sin embargo la proliferación de microorganismos trae consigo un aumento del consumo de nutrientes y oxígeno, pudiendo ser necesario la utilización combinada de la bioaumentación y la bioestimulación (Solanas, 2002; Pérez, 2003).

La biorremediación, según el modo de aplicación de las técnicas, puede ser *in situ* si se realiza el tratamiento en el lugar donde se encuentra la contaminación sin excavación del suelo; *ex situ* si el suelo contaminado se traslada a una instalación para su tratamiento u *on site* cuando el tratamiento se realiza en la zona afectada con excavación del suelo (Trejo, 1997; LaGrega y col., 2001; Atlas y Bartha, 2002; Solanas, 2002).

2.4.2 Tecnologías de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Las principales tecnologías de biorremediación para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos son la Bioventilación, Biolabranza y Biopilas.

Bioventilación (Bioventing): La técnica de bioventilación es un tratamiento de biorrecuperación “*in situ*”. Se fundamenta en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección a presión de oxígeno (aire) en la zona no saturada del suelo a través de pozos de inyección. La aireación va a favorecer la degradación de los hidrocarburos por volatilización, facilitando la migración de la fase volátil de los contaminantes, y por la actividad microbiana (Bossert y Bartha, 1984; Trejo, 1997; Atlas y Bartha, 2002; Solanas, 2002; Orozco y col., 2003).

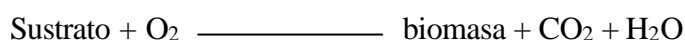
Biolabranza (Landfarming): Es una técnica “*ex situ*” que se basa en la remediación superficial que consiste en esparcir los suelos contaminados excavados en una capa delgada sobre una superficie, estimulando la actividad microbiana aerobia mediante aireación y/o adición de minerales, nutrientes y humedad (Bossert y Bartha, 1984; Trejo, 1997; Solanas, 2002; Orozco y col., 2004).

Biopilas (Biopiles): La técnica de biopilas es un tratamiento de recuperación “*ex situ*” en condiciones no saturadas. La técnica se basa en la formación de pilas no mayor de 2 metros de altura de material biodegradable, formadas por suelo contaminado y materia orgánica en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes. Estas pilas pueden ser aireadas de forma activa, volteando la pila, o de forma

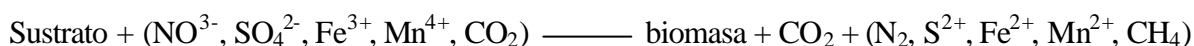
pasiva, mediante tubos perforados de aireación. Se estimula la actividad microbiana por adición de minerales, nutrientes y humedad (Bossert y Bartha, 1984; Trejo, 1997; Jorgensen y col., 2000; Solanas, 2002).

2.5 Fundamento bioquímico de la biodegradación de hidrocarburos

El fundamento bioquímico de la biodegradación son las reacciones de óxido – reducción de la cadena respiratoria cuyo fin es la obtención de energía. La cadena la inicia el sustrato orgánico (hidrocarburos) que es externo a la célula y que actúa como donador de electrones. Los aceptores de electrones comúnmente utilizados por los microorganismos son oxígeno, nitrato, el hierro (III), sulfato y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor final de electrones los procesos de biodegradación son de tipo aerobio.



Si se utiliza otro diferente del oxígeno los procesos de biodegradación son de tipo anaerobio (Madigan y col., 1999; [http://www.mejico.org/biorremediacion de suelos y agua s-contaminadas.html](http://www.mejico.org/biorremediacion_de_suelos_y_agua_s-contaminadas.html), marzo 2002)



2.5.1 Metabolismo microbiano de los hidrocarburos

2.5.1.1 Hidrocarburos alifáticos

Los hidrocarburos alifáticos son los que se degradan con mayor rapidez. Existen tres vías metabólicas fundamentales: la oxidación terminal, la oxidación subterminal y la ω -oxidación (que se deriva de la oxidación terminal). En todas las rutas se oxida la molécula para incrementar la solubilidad. La mayoría de los microorganismos emplean la oxidación terminal (Figura 1) donde convierten el n -alcano al correspondiente alcohol terminal por medio de una monooxigenasa, que hidroliza el carbono terminal. Los pasos posteriores convierten el n -alcohol en aldehído (alcohol-deshidrogenasa), y finalmente en un ácido graso (aldehído-deshidrogenasa), el cual entra en la ruta de la β -oxidación. También puede producirse una oxidación terminal del ácido graso produciéndose un diácido (ω -oxidación) que también se incorpora en la β -oxidación, mediante una descarboxilación previa. (Parés y Juaréz, 1997; Romantschuck y col, 2000). La formación de alcoholes secundarios es un proceso poco frecuente y está descrito en hongos del género *Aspergillus* y *Fusarium* y en géneros bacterianos como *Bacillus sp.* (Viñas, 1999).

2.5.1.2 Hidrocarburos aromáticos y poliaromáticos

La metabolización oxidativa de los hidrocarburos aromáticos, poliaromáticos (HPA) y sus derivados conducen a compuestos que se incorporan fácilmente al ciclo de Krebs (Figura 1). A excepción del naftaleno, el fenantreno y el antraceno, se conoce muy poco del metabolismo microbiano de los HPA. En el caso de los monoaromáticos la ruta del tolueno es una de las más conocidas (Kästner, 2000). La mayor información sobre la degradación bacteriana de compuestos aromáticos se ha derivado del estudio en especies del género *Pseudomonas*, pero también puede ser llevada a cabo por microorganismos corineformes, actinomicetos y

posiblemente por miembros del género *Spirillum* y bacilos esporógenos facultativos (Pérez, 2003).

La degradación aerobia de un compuesto aromático implica la acción de monooxigenasas y dioxigenasas que oxidan el anillo a un fenol dihidrico (Figura 1). El número de este tipo de moléculas es relativamente pequeño en comparación con la amplia variedad de sustratos susceptibles de degradar. Se trata, por tanto, de vías catabólicas convergentes. Entre los intermediarios a los que convergen tales vías hay que considerar tres como los más frecuentes: el catecol (o-hidroxifenol), el protocatecuato (ácido 3,4 dihidroxibenzoico) y el gentisato (ácido 2,5 dihidroxibenzoico) (Parés y Juárez, 1997). A diferencia de la degradación aerobia, en ambientes anaerobios la degradación de compuestos aromáticos implica la reducción de los dobles enlaces del núcleo aromático. Anaeróbicamente los compuestos aromáticos pueden ser oxidados a CO₂ por cultivos puros de bacterias fermentativas o por bacterias fototófricas. En cambio, las bacterias metanogénicas degradan los compuestos aromáticos en cultivos mixtos (Parés y Juárez, 1997; Pérez, 2003).

El ataque microbiano en HPA es mayor cuanto mayor es el número de anillos y sustituyentes en la molécula. (Alexander, 1981; Dagher y col., 1997).

2.6 Factores que afectan la biodegradación de hidrocarburos en suelos

La biodegradación de hidrocarburos y contaminantes en general depende de factores abióticos y bióticos (Solanas 2002; Ercoli y col., 2002) y es un proceso que puede durar horas, días, meses o años según las condiciones (Atlas, 1991). Los factores a considerar en un tratamiento biológico a suelos contaminados con hidrocarburos son: tipo y concentración del contaminante; concentración de nutrientes; oxígeno; condiciones ambientales; presencia de inhibidores; biodisponibilidad del contaminante; población microbiana y cometabolismo (Young y Cerniglia, 1995).

2.6.1 Tipo y concentración del contaminante

La biodegradabilidad de un compuesto orgánico se debe a que es utilizado por los microorganismos como fuente de carbono (Solanas, 2002). Si el “sitio de acción o ataque” del enzima degradativo se encuentra bloqueado (isoprenoides o moléculas sustituidas con grupos voluminosos (COOH, CH₃), la reacción no tendrá lugar, disminuyendo entonces la actividad biodegradativa. (Ercoli y col., 2002). Los compuestos alifáticos se degradan fácilmente, pero cuando se incluyen como sustituyentes alcanos de cadena larga, se forman estructuras ramificadas estéricamente inaccesibles a la degradación. De la misma forma, los compuestos alifáticos insaturados se degradan más lentamente que los saturados. Los compuestos aromáticos simples se degradan por la ruptura del anillo. La incorporación de halógenos disminuye la degradabilidad por estabilización del anillo aromático (Leahy y Colwell., 1990; Viñas, 1999). El orden decreciente en biodegradación es, generalmente, en n-alcanos > isoprenoides > aromáticos de bajo peso molecular > cicloalcanos > poliaromáticos > moléculas polares (Leahy y Colwell, 1990).

Cuando la concentración de contaminante es alta puede ocurrir inhibición de la actividad microbiana por toxicidad de la fuente de carbono (LaGrega y col., 2001). Se han registrado en

ensayos de campo procesos biológicos a concentraciones de contaminantes de hasta 30 %. Por encima del 30 % la velocidad de degradación es muy baja pero no nula. Utilizando la técnica de bioaumentación se ha aumentado la velocidad (Ercoli y col., 2002).

Con el tiempo se va modificando la composición de los hidrocarburos por acción de los agentes ambientales, la actividad microbiana y los diferentes procesos físicos químicos que tienen lugar. Como resultado de ello el contaminante se enriquece en compuestos pesados, más difíciles de degradar; por lo que la velocidad de transformación disminuye con el envejecimiento de la contaminación (Fonseca, 1998).

2.6.2 Concentración de nutrientes

El metabolismo exige fuente de carbono, nitrógeno y fósforo fundamentalmente. La fuente de carbono es el hidrocarburo y aporta el carbono necesario para producir compuestos celulares y biomasa. La fuente de nitrógeno interviene en la síntesis de aminoácidos y enzimas. Dado que la utilización de estos compuestos es muy rápida, los suelos no alcanzan a cubrir todas las necesidades metabólicas y deben ser incorporados en fertilizantes agrícolas en forma de urea o sulfato de amonio, no obstante en algunos estudios se ha utilizado nitrato (Solanas, 2002). La fuente de fósforo actúa en la formación de los compuestos energéticos celulares que se utilizan en los procesos de síntesis y degradación. La dosificación de nitrógeno y fósforo se realiza en función de la concentración de carbono con una relación C:N:P 100:10:1 (Viñas y col., 2001; Juteau y col., 2003).

2.6.3 Oxígeno

La mayoría de los procesos de biodegradación de hidrocarburos ocurre por vía aerobia. En los procesos de campo la aireación se produce por remoción del suelo con herramientas agrícolas o por inyección de aire (Viñas, 1999; Atlas y Bartha, 2002).

2.6.4 Condiciones ambientales

2.6.4.1 pH, humedad y temperatura

El pH del suelo es importante para el desarrollo de los microorganismos degradadores, siendo los más adecuados los comprendidos entre 6 y 8 unidades. Cuando el pH excede de 8 unidades se debe disminuir el mismo mediante adición de azufre al suelo (Ercoli y col., 2002). Si es menor de 6 se puede incrementar mediante la incorporación de carbonato o hidróxido de calcio (Leahy y Colwell, 1990; Young y Cerniglia, 1995; Maier y col., 2000; Solanas, 2002; http://www.mejico.org/biorremediacion_de_suelos_y_aguas-contaminadas.html, marzo 2002).

El agua, al formar parte del protoplasma bacteriano, actúa como medio de transporte a través del cual los nutrientes y oxígeno son movilizados hasta el interior de las células (Schlegel, 1997). Es conveniente mantener una humedad del orden del 70 % de la capacidad de campo. Un exceso de humedad reduce la concentración de oxígeno en el suelo e impide el desarrollo adecuado de los microorganismos (Viñas, 1999; Ercoli y col., 2002).

La temperatura influye en la velocidad de degradación, dependiendo del tipo de microorganismo. Comúnmente las temperaturas más adecuadas se encuentran entre 15 °C y 45 °C, (microorganismos mesófilos). La velocidad de degradación aumenta con la temperatura, por lo que un incremento de la misma es útil. Sin embargo cuando supera los 40 °C ocurre una disminución de la actividad microbiana por desnaturalización de los enzimas, o se produce una rotación poblacional hacia especies más resistentes a las altas temperaturas (Semple y col., 2001). Durante el cambio de poblaciones disminuye la actividad microbiana (Young y Cerniglia, 1995; [http://www.mejico.org/biorremediacion de suelos y aguas contaminadas.html](http://www.mejico.org/biorremediacion_de_suelos_y_aguas_contaminadas.html), marzo 2002).

2.6.5 Presencia de inhibidores

Los metales pesados y las sales inorgánicas a altas concentraciones son tóxicas a los microorganismos y actúan como inhibidores, disminuyendo la velocidad de degradación significativamente, a menos que se disponga de microorganismos tolerantes en el lugar de tratamiento o se haya producido una bioaumentación de la población con consorcios resistentes. En el caso de los metales se puede aumentar el pH del suelo para inmovilizarlos y así reducir la toxicidad sobre los microorganismos (Pérez, 2003).

2.6.6 Biodisponibilidad

El término biodisponibilidad se refiere al contacto entre el compuesto químico y el sistema biológico para inducir cualquier efecto (Mahro, 2000).

La metabolización y biodegradación de las diferentes moléculas de hidrocarburos está condicionada a su disponibilidad como sustrato por parte de la célula microbiana; es decir, que la molécula pueda penetrar hacia el interior de las células. Un requisito indispensable para que las moléculas estén más accesibles a las células microbianas es su solubilización en el sistema acuoso de cultivo. La solubilidad de los hidrocarburos disminuye con el aumento del peso molecular, números de anillos en los HPAs, sustituyentes y ramificaciones en las cadenas carbonadas (Leahy y Colwell, 1990; Klein, 2000). Una estrategia muy utilizada para aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de los hidrocarburos es la utilización de tensoactivos sintéticos (etoxilados, bencenosulfonatos) y microbianos (ramnolípidos, lipopéptidos y emulsanos) (Thiem, 1994; Abalos, 2004).

2.6.7 Población microbiana y cometabolismo

Los microorganismos pueden degradar hidrocarburos en forma de cultivos puros, mixtos o consorcios (Viñas, 1999; Fonseca, 1998). Cuando se trata de los últimos, se establece una compleja interacción de las especies microbianas. En una mezcla de poblaciones microbianas los consumidores primarios inician el proceso de degradación y los consumidores secundarios utilizan los productos metabólicos de los primeros para degradarlos. Además pueden facilitar el crecimiento de los primarios, suministrándoles productos metabólicos (como factores de crecimiento), eliminando tóxicos mediante cometabolismo y produciendo intercambio de material genético (Alexander, 1994; LaGrega y col., 2001). El cometabolismo es el proceso a través del cual algunos componentes orgánicos, que los microorganismos no pueden degradar si se hallan como única fuente de carbono, son transformados en presencia de otro sustrato (co –

sustrato) natural adicional, por ejemplo azúcares. En hábitats naturales puede suceder la co – utilización simultánea por bacterias aerobias heterótrofas, de muchos sustratos diversos (Bordons y Constantin, 1999; LaGrega y col., 2001). El solvente tricloroetano (TCE), compuesto carcinogénico y resistente a la biodegradación, puede ser degradado cometabólicamente por bacterias metanogénicas que crecen en metano (CH₄) como única fuente de carbono (Alexander, 1994). El tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos requiere una concentración mínima de microorganismos hidrocarbonoclastas de 10³ a 10⁴ UFC/g suelo y de microorganismos heterótrofos totales de 10⁵ a 10⁶ UFC/g de suelo. Si esta masa crítica no fuera suficiente se pueden incorporar microorganismos al suelo mediante inoculación o bioaumentación. También se puede lograr un incremento importante estimulando la población microbiana existente por incorporación de nutrientes (Solanas, 2002).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Origen y toma de las muestras

Las muestras proceden de suelos contaminados con hidrocarburos del Área Movimiento y Almacenaje de Productos (MAP) de la Refinería de Petróleo “Hermanos Díaz”. Las estaciones de muestreo (Figura 2 y 3) seleccionadas son las siguientes:

- Estación 1: Levy del tanque 12
- Estación 2: Levy del tanque 5
- Estación 3: Levy del tanque 4

La toma de muestras se realizó entre las 9:00 y 11:00 am, aplicando la técnica de cuarteo (Alexeiev, 1978), tomadas a una profundidad de 5.0 cm. Las muestras se homogenizan en un tamiz 0.42 mm

3.2 Diseño experimental

Se realizan 4 tratamientos: suelo natural (B), suelo con glucosa (G), suelo con nutrientes (N) y suelo con glucosa y nutrientes (G + N). El tratamiento se realiza durante 8 semanas, evaluando la Materia Orgánica Extraíble (MOE) del suelo cada semana. Los datos se procesan usando el software estadístico STATGRAPHICS Plus 5.1. Cada tratamiento fue evaluado por triplicado.

3.3 Caracterización de los suelos

La tierra fue sometida a un análisis granulométrico realizado en el Laboratorio de Geología Elio Trincado de la Empresa Geominera Oriente.

3.3.1 Ensayo rápido de aireación de suelos

Para realizar el ensayo se dobla un papel de filtro a lo largo de sus diámetros y se colocan dos muestras de suelo (punta de una espátula) en los extremos opuestos del papel. Se añaden dos gotas de $\text{HCl}(x/Z^*)=0.1 \text{ N}$ a cada una de las muestras y una gota de la disolución de Tiocianato de potasio (KCNS) y otra de Hexacianoferrato (III) de potasio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) en las zonas húmedas. La aparición de coloración roja con KCNS indica la presencia de hierro férrico. La aparición de color azul con $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, indica la presencia de hierro ferroso.

3.3.2 Determinación de la capacidad de campo

Se dispone de una cantidad de tierra conocida, secada previamente a 105 °C, sobre un embudo con papel de filtro para impedir el paso de la tierra (el peso del papel de filtro debe tenerse en cuenta). Se riega el sistema con agua destilada hasta quedar completamente empapado. Cuando cesa el goteo de agua por el embudo se pesa el conjunto del papel con la tierra húmeda. Descontando de este valor el peso de la tierra seca y el peso del papel de filtro (realizando todo el proceso sin tierra) se obtiene el peso del agua que retiene la muestra de tierra. La capacidad

de campo en porcentaje se obtiene al dividir el peso de agua retenida entre la cantidad de tierra seca dispuesta por 100.

3.3.3 Determinación de sólidos totales, fijos y volátiles y contenido de humedad

Se pesa la cápsula vacía en balanza analítica y se le añade 1 g de tierra, tomando este valor. Se coloca la muestra en la estufa a 105 °C por 1 hora para eliminar el contenido de agua, hasta peso constante. Enfriar en desecadora y pesar, anotando el valor. Determinar sólidos totales. Luego se coloca la muestra en la mufla a 550 °C durante 1 hora hasta peso constante para eliminar la materia orgánica. Anotar el resultado. Determinar sólidos totales fijos.

Los cálculos se realizan según las siguientes fórmulas:

Sólidos totales

$$\% ST = \frac{Ps(105^\circ C)}{Pmuestra} \times 100$$

Sólidos totales fijos

$$\% STF = \frac{Ps(550^\circ C)}{Ps(105^\circ C)} \times 100$$

Sólidos volátiles

$$\% SV = \frac{Ps(105^\circ C) - Ps(550^\circ C)}{Ps(105^\circ C)} \times 100$$

Contenido de humedad

$$\% \text{ humedad} = 100 - \% ST$$

Donde:

Ps(105°C) es el peso seco de la muestra en la estufa (g)

Ps(550°C) es el residuo de la muestra en la mufla (g)

Pmuestra es el peso inicial de la muestra de tierra (g)

3.3.4 Determinación del pH del suelo

Se pesan 10 g de suelo y se vierten en un matraz de 50 mL. Se añaden 25 mL de agua destilada. Se agitan de 20 a 30 minutos a intervalos regulares. Se mide el pH de la suspensión acuosa.

3.3.5 Determinación del contenido de hidrocarburos

El contenido de hidrocarburos se determina como materia orgánica extraíble (MOE) mediante extracción en Soxhlet con n-hexano. El solvente se evapora y se calcula la MOE como:

$$\% \text{ MOE} = (P_{b+m} - P_{bv}) \times 100$$

Donde:

P_{b+m} es el peso del balón con materia orgánica luego de la destilación (g)

P_{bv} es el peso del balón vacío (g)

3.3.6 Determinación del Carbono Orgánico Total (COT)

Se realiza por el método de Walkley – Black (Jackson, 1979). El COT se determina:

- Porcentaje de carbono orgánico

$$\% \text{ COT} = 10 \left(1 - \frac{T}{S} \right) 1.34$$

Donde:

T mL de Sal de Mohr consumidos en la valoración de la muestra

S mL de Sal de Mohr consumidos en la valoración del blanco

1.34 es un factor que relaciona la concentración del dicromato de potasio con la masa de muestra y la masa atómica del carbono (Jackson, 1979).

3.3.7 Determinación de la conductividad eléctrica de las muestras de suelo

La conductividad se determina mediante celdas conductimétricas en un extracto de suelo con una relación suelo/agua 1/5 (m/V). Se pesan 10 g de suelo y se colocan en un erlenmeyer de 100 mL. Se añaden 50 mL de agua destilada y se agita fuertemente cada 10 minutos durante 1 hora. Se deja reposar 10 minutos para que el suelo sedimente y posteriormente se filtra sin perturbar la suspensión a través de un papel. Los primeros mL de filtrado se desprecian si están turbios y se determina la conductividad del extracto con el conductímetro.

3.3.8 Determinación de nitratos

La determinación de nitrógeno como nitrato por el método espectrofotométrico UV es rápida ($\lambda = 220 \text{ nm}$). En caso de que exista materia orgánica en las muestras se lee a 220 nm y 275 nm, lo que permite que se realice la corrección de las lecturas (APHA, 1998). En el análisis se utiliza $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5:1000) como solución extractora, la técnica se desarrolla según Jackson, 1979.

3.3.9 Determinación de fosfato

Se determina empleando el método espectrofotométrico por formación de un complejo coloreado heteropoliácido molibdofosfórico conocido como azul de molibdeno, formado con el reactivo molibdato de amonio en medio neutro, el cual presenta un máximo de absorción a 590 nm. La estabilidad del complejo se alcanza a partir de los 30 minutos (APHA, 1998). En el análisis se utiliza H_2SO_4 $c(x/Z^*)=0.002$ N como solución extractora (Jackson, 1979).

3.4 Determinación de población microbiana heterótrofa y degradadora de hidrocarburos

3.4.1 Determinación microbiológica de población microbiana heterótrofa

1 g de suelo se añade en 9 mL de solución salina NaCl 0,9 %; se agita vigorosamente en vortex durante 2 minutos. 1 mL de la fase acuosa se añade a 9 mL de caldo nutriente. Incubar de 24 a 48 horas. La aparición de turbidez respecto al tubo control (caldo sin inocular) es prueba positiva de existencia de población microbiana heterótrofa. Con las muestras positivas se prepara el banco de diluciones para el recuento de viables en placas de Agar Triptona Soja, Agar Saboreaud y Agar Czapeck para determinar bacterias, levaduras y hongos respectivamente (Madigan y col., 1999).

3.4.2 Determinación de población microbiana degradadora de hidrocarburo

La población degradadora de hidrocarburos se determina a partir de los resultados positivos en el ensayo anterior.

1 mL de la fase acuosa se añade en 9 mL de medio nitrogenado (Rice and Hemmingsen, 1997). Se añade 1 mL de fuente de carbono (petróleo, diesel, kerosina, nafta) y se incuba durante 24 a 48 horas. La aparición de turbidez indica presencia de microorganismos degradadores del hidrocarburo usado como fuente de carbono. Con las muestras positivas se prepara el banco de diluciones para el recuento de viables en placas de Agar Triptona Soja, Agar Saboreaud y Agar Czapeck para determinar bacterias, levaduras y hongos respectivamente (Madigan y col., 1999).

3.5 Determinación de la actividad respirométrica del suelo (evolución de CO₂)

En un recipiente de vidrio con cierre hermético se disponen 10 g de tierra contaminada. Se proceden a hacer los siguientes tratamientos:

Tratamiento I. Muestra natural (B).

Tratamiento II. Se añade a la tierra 2 mL de solución de glucosa al 1 % (G)

Tratamiento III. Se añade a la tierra 2 mL de nutrientes (3.4 g NaNO₃ y 0.56 g K₂HPO₄ / 100 mL agua) (N)

Tratamiento IV. Se añade a la tierra 2 mL de solución de glucosa con nutrientes (1 g de glucosa, 3.4 g NaNO₃ y 0.56 g K₂HPO₄ / 100 mL agua)(G + N)

Cada tratamiento se realiza por triplicado. En el recipiente se dispone un vial con 10 mL de NaOH $c(x/Z^*)=0.2$ N para absorber el CO₂ producido por la actividad microbiana del suelo. Semanalmente, durante 5 semanas, se valora la cantidad de NaOH remanente con HCl $c(x/Z^*)=0.1$ N y se reemplaza por otro vial con 10 mL de NaOH. Previo a la valoración se añaden 10 mL de BaCl₂ $c(x/Z^*)=0.2$ N para precipitar los carbonatos (Alexeiev, 1978) y 3 gotas de fenolftaleína como indicador. Los moles de CO₂ se calculan según la siguiente ecuación:

$$n(\text{CO}_2) = [V(\text{OH}^-) \times c(\text{OH}^-)] - [V(\text{H}^+) \times c(\text{H}^+)]$$

Donde:

$n(\text{CO}_2)$ son los mol de CO₂ producidos

$V(\text{OH}^-)$ es el volumen de NaOH que contiene el vial (L)

$c(\text{OH}^-)$ es la concentración de NaOH (mol/L)

$V(\text{H}^+)$ es el volumen de HCl consumido en la valoración (L)

$c(\text{H}^+)$ es la concentración de HCl (mol/L)

3.6 Ensayos de tratabilidad de suelos en microcosmos

Se añaden 400 g de tierra en bandejas de aluminio (Figura 4) y se procede a realizar los cuatro tratamientos ya descritos en el ensayo de actividad respirométrica del suelo (Materiales y Métodos 3.5). Se riegan las bandejas con 100 mL de las soluciones de glucosa, nutrientes y glucosa con nutrientes. Semanalmente se procede a determinar la materia orgánica extraíble como se describe en la técnica de determinación del contenido de hidrocarburos. Los ensayos se realizan por triplicado durante 8 semanas.

3.7 Equipos. Materiales y reactivos

3.7.1 Equipos

Estufa	LABORGERÄTE BERLIN
Balanza analítica	Sartorius BP 121 S
Mufla	SELECTA. Made in E.E.C.
pHmetro	PRACITRONIC Dresden. Made in GDR
Balanza técnica	LB – 1050 Made in Hungary
Vortex	Heido / ph Made in Germany
Plancha de calentamiento	Veb Beban Alemania
Conductímetro	EC 215 Hanna instruments Made in Italy

Espéctrofotómetro

PHARMACIA LKB – ULTROSPEC III

Materiales utilizados

Espátula

Espátula de Drigalski

Tubos de ensayo con tapa de rosca

Placas Petri

Matraces aforados

Cápsulas de porcelana

Vidrio reloj

Pinzas

Embudos de gravedad

Papel de filtro

Equipo de destilación Soxhlet

Balones de destilación

Micropipetas Eppendorf

Pipetas graduadas

Buretas

Vasos de precipitado

Matraces erlenmeyers

Tamiz 0.42 mm OGAWA SEIKI CO. LTD. Japón

Bandejas de aluminio

Envases de cristal con cierre hermético

3.7.2 Reactivos químicos y medios de cultivo

Ácido clorhídrico HClp.a.

Quinsa. Unión Química. Cuba

Ácido fosfórico H₃PO₄ p.a

Merk. Alemania

n- Hexano C_6H_{14} p.a	BDH AnalaR. Inglaterra
Hidróxido de sodio NaOH p.a	Quinsa. Unión Química. Cuba
Hidróxido de calcio $Ca(OH)_2$ p.a	REACHIM. Rusia
Sulfato de cobre pentahidratado $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ p.a	BDH AnalaR. Inglaterra
Carbonato de magnesio $MgCO_3$ p.a	REACHIM. Rusia
Ácido sulfúrico H_2SO_4 p.a	Quinsa. Unión Química. Cuba
Tiocianato de potasio KCNS p.a	Merk. Alemania
Hexacianoferrato (III) de potasio $K_3Fe(CN)_6$ p.a	Merk. Alemania
Dicromato de potasio $K_2Cr_2O_7$ p.a	BDH AnalaR. Inglaterra
Cloruro de bario $BaCl_2$ p.a	Merk. Alemania
Nitrato de sodio $NaNO_3$ p.a	REACHIM. Rusia
D (+) Glucosa anhidra p.a	BDH AnalaR. Inglaterra
Hidrogenofosfato de potasio K_2HPO_4 p.a	REACHIM. Rusia
Difenilamina Indicador	
Ferroína Indicador	
Fenolftaleína Indicador	
Agar Triptona Soja (TSA)	BIOCEN. Cuba
Agar Saboreaud	BIOCEN. Cuba
Agar Czapeck	BIOCEN. Cuba

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El impacto ambiental que sobre el suelo está ejerciendo el hombre, ha originado que la contaminación del mismo sea uno de los problemas medioambientales que está recibiendo una mayor atención en los últimos años. Esto es debido a los riesgos directos que los suelos contaminados pueden ejercer sobre la salud humana, y a razones económicas derivadas de su limitación de uso y devaluación del terreno contaminado. Se denomina suelo contaminado a una porción de terreno, superficial o subterránea, cuya calidad ha sido alterada como consecuencia del vertido, directo o indirecto, de residuos o productos peligrosos (NC 30:1999). Por ejemplo el vertido accidental de hidrocarburos o su fuga de tanques subterráneos (Orozco y col., 2004).

4.1 Evaluación del Impacto Ambiental (EIA) del Área de Movimiento y Almacenaje de Productos (MAP)

La evaluación del impacto ambiental (EIA) es uno de los instrumentos para materializar la política ambiental en Cuba. Tiene carácter fundamentalmente preventivo ya que se propone desde los primeros momentos de una actividad económica que modifique el medio ambiente. La información que brinda una EIA permite realizar una proyección de las consecuencias de un proyecto sobre el medio ambiente, lo que unido a una valoración social y económica definen las decisiones sobre la viabilidad del mismo (García-Cuellar y col., 2004). Entre los diferentes métodos de EIA están las matrices causa – efecto, las cuales son matrices de interacción, donde se cruzan las acciones humanas con los indicadores de impacto ambiental y son muy útiles para identificar el origen de diferentes impactos (Orozco y col., 2004). La EIA se realizó en tres etapas: identificar los impactos o acciones y los factores del medio que son afectados por ellos (Tabla 3); Valoración de los impactos (Tabla 4) y Cálculo de la importancia de los impactos (Tabla 5). Considerando que el deterioro de los suelos es uno de los problemas ambientales de Cuba identificados en la Estrategia Ambiental Nacional de 1997, se confeccionó la matriz causa – efecto para evaluar el funcionamiento del área de MAP. La matriz causa – efecto (Tabla 3) obtenida evidenció que los impactos que más afectan a los diferentes factores del medio en el funcionamiento del área de MAP son suelos, aguas subterráneas, calidad del aire y salud e higiene; siendo el suelo el factor del medio que recibe el mayor efecto de todos los impactos. En relación a la valoración de los impactos (Tabla 4), todos poseen naturaleza negativa, lo cual significa que disminuyen la calidad de los suelos, aguas subterráneas, salud e higiene y aire. El resto de los atributos (Intensidad, Extensión, Persistencia, Momento, Reversibilidad, Acumulación, Efecto, Percepción social, Probabilidad, Periodicidad e Importancia) oscilan en un rango de 1 a 4. Por otra parte puede decirse que los impactos identificados en la matriz causa efecto (Tabla 3) son irrelevantes para los factores del medio aguas subterráneas, aire, salud e higiene, pero no significa que no contaminan ya que poseen naturaleza negativa. Para el factor suelo los cuatro impactos son moderados (Tabla 4) determinado fundamentalmente por los atributos acumulación, periodicidad y percepción social. El desbordamiento de los tanques es el impacto que mayor daño ocasiona al suelo.

De la matriz de importancia (Tabla 5) se evidencia que el suelo es el factor del medio que mayor alteración percibe seguido del aire. El desbordamiento de tanques y roturas en tuberías y

válvulas son los impactos del funcionamiento del área MAP que más disminuyen la calidad de los factores aire, suelo, aguas subterráneas y salud e higiene.

4.2 Caracterización físico – química de los suelos

Las muestras se tomaron a 5.0 cm de profundidad en las estaciones de muestreo y se tamizaron hasta 0.42 mm para eliminar las piedras y fracciones más gruesas de la tierra. En todas las estaciones las muestras tienen un fuerte olor a hidrocarburos, aspecto lodoso y compacto por la cantidad de petróleo derramado en ellas. Las muestras de la estación 3 son ligeramente más claras con respecto a las otras dos estaciones. La ubicación de las tres estaciones de muestreo se muestra en la Figura 3.

Análisis granulométrico de los suelos

El análisis granulométrico (Tabla 6) permitió evaluar las propiedades de las fracciones de los suelos. En las tres estaciones el porcentaje de arena es mayor que el de arcilla, siendo la Estación 1 la que mayor contenido de arena posee. La Estación 3 contiene un porcentaje de arcilla similar al de arena. Los suelos arenosos poseen baja retención de nutrientes y de agua, y la aireación es buena (Tabla 1). La distancia entre los puntos de muestreo tiene un valor medio de 371.6 m (Figura 3), sin embargo los suelos difieren en sus características, esto puede deberse a que la ubicación de los tanques del área es en forma escalonada para facilitar el drenaje del suelo en caso de derrames.

Aireación de los suelos

El ensayo de aireación de suelos (Jackson, 1979), detectó que las Estaciones 1 y 3 poseen baja oxigenación ya que se observó prueba positiva para hierro ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}). La Estación 2 evidenció una deficiencia de oxígeno severa al resultar positiva la prueba para hierro ferroso y negativa para hierro férrico. En las tres estaciones de muestreo se observó que la tierra tiene una tonalidad parda muy intensa, estos matices oscuros predominan si hay insuficiencia de oxígeno (Alonso y col., 1974).

Si en las tres estaciones predomina el contenido de arena (Tabla 6) era de esperar que los suelos presentaran una buena aireación (Tabla 1); no obstante el déficit de oxígeno observado está muy relacionado con el impacto con petróleo que poseen los suelos (Figura 2), situación que impide la circulación de aire y medio acuoso edáfico.

Materia Orgánica Extraíble y determinación de sólidos

La Materia Orgánica Extraíble (MOE) en los estudios de biodegradación es la cantidad de hidrocarburos que se extrae con n-hexano o diclorometano (Viñas, 1999). El n-hexano extrae las diferentes fracciones de petróleo que destilan entre 60 y 500 °C (naftas, kerosinas, diesel, fuel oil y gasoil de vacío ligero y pesado); por ello los compuestos con más de 40 átomos o más de carbono y los HPAs no se cuantifican en estos ensayos ya que son fracciones más pesadas y destilan por encima de 500 °C. Los compuestos muy volátiles y que destilan a temperaturas inferiores a la del n-hexano (60 °C) tampoco son determinados en el solvente. El porcentaje más alto de Materia Orgánica Extraíble se obtuvo la Estación 2 con un valor de 11.6 % (Tabla 7), lo que significa que es la estación con mayor grado de contaminación. A su vez el contenido de

sólidos volátiles en esta estación es fundamentalmente hidrocarburos con 10.1 % (Tabla 7). Una situación similar se observó en las Estaciones 1 y 3 (Tabla 7). Durante el tratamiento a 105 °C para la determinación de los sólidos totales se volatilizan parafinas, isoparafinas y naftenos de bajo peso molecular con temperatura de ebullición entre 20 y 150 °C; desapareciendo el olor a hidrocarburos. El contenido de sólidos totales en las tres estaciones no difiere mucho (Tabla 7), los valores oscilan entre 5.7 y 10.1 %. La fracción inorgánica, expresada por los sólidos totales fijos, fue mayor en la Estación 3 con 94.3 % (Tabla 7).

El comportamiento de los parámetros analizados en la caracterización de los suelos del área de MAP en las tres estaciones de muestreo es diferente (Tabla 7). Considerando que el MOE es el contenido de hidrocarburos que poseen los suelos se realizó un análisis de varianza (Tabla 9) para este parámetro obteniéndose que para un 95 % de confiabilidad la probabilidad de que los suelos de las estaciones estudiadas posean el mismo impacto de hidrocarburos es de 0.71%.

Las aportaciones de materia orgánica al suelo provienen generalmente del reino vegetal, si bien no son despreciables las que tienen su origen en el animal (Alonso y col., 1974); aunque en este caso la materia orgánica que se extrae procede del contaminante. El Carbono Orgánico Total (COT) oscila entre 4 y 6 % en las estaciones de muestreo (Tabla 7).

Capacidad de campo

Mantener la humedad del suelo es fundamental para la evolución y desarrollo de los microorganismos presentes en él, ya que favorece el transporte de los nutrientes y oxígeno que necesitan para vivir (Schlegel, 1997; Ercoli y col., 2002). La capacidad de campo es una medida del contenido de agua que es capaz de retener el suelo, es decir marca el límite entre el agua capilar y la gravitacional (la máxima cantidad de agua que puede retener el suelo después de tres días de aporte de agua) (<http://www.fortunecity.es/expertos/profesor/171/suelos.html>, enero 2005).

El suelo de las Estaciones 1 y 2 poseen un 12 % de capacidad de campo, no así la Estación 3 donde se incrementa el porcentaje de retención de agua hasta un 20 % (Tabla 7). Esto se debe a que el porcentaje de arcilla y arena que contiene el suelo es del 40 % aproximadamente (Tabla 6) y entonces con respecto a las otras dos estaciones este valor es bastante alto (Tabla 7). Las partículas de arcilla se compactan muy fácilmente, con lo que su capacidad de retención es buena, pero su capacidad de infiltración baja, efecto contrario ocurre con los suelos arenosos debido al gran tamaño de los poros que los caracteriza (Domènech, 2000).

pH y conductividad eléctrica de los suelos

Al analizar los valores de pH se puede apreciar que en el suelo están presentes iones que aportan características básicas (CO_3^{2-} , HCO_3^- y otros), ya que todos son superiores a 7 (Tabla 7). En las técnicas de tratamiento biológico que se emplean en la descontaminación de suelos es necesario mantener el pH entre 6 a 8 porque es el óptimo para que los microorganismos degradadores de hidrocarburos desarrollen su actividad metabólica (Leahy y Colwell, 1990; Maier, 2000). El pH disminuye a medida que decrece la relación agua:suelo y puede variar también con cambios de la concentración de CO_2 y con el proceso de nitrificación del suelo (Alonso y col, 1974).

La conductividad, que no es más que la capacidad de conducir la corriente eléctrica, fue mayor en la Estación 2 con 203 μS , incremento que puede ser debido a la cantidad de sólidos presentes en la solución (Tabla 7).

El suelo es un medio receptivo por excelencia, puesto que interacciona químicamente con la litosfera, hidrosfera, y la atmósfera, y sobre todo, recibe el impacto de los seres vivos que, directa o indirectamente, pueden romper el equilibrio químico establecido en su seno. El medio edáfico posee una cierta capacidad de autodepuración, sobre todo en sus horizontes superficiales, lo que le permite asimilar una cierta cantidad de contaminantes. La actividad de autodepuración natural del suelo puede aumentar por estimulación de la actividad microbiana, es por esta razón que se adicionan nutrientes (nitrato y fósforo) para estimular el crecimiento y la capacidad biodegradadora de las poblaciones autóctonas (Tajahuerce, 1997).

Contenido de nitrato y fosfato en los suelos

El contenido de nitrato y fosfato de las diferentes estaciones son muy bajos y casi iguales, no superando los 3.5 mg/L y 0.4×10^{-3} mg/L respectivamente (Tabla 7). Esto indica que no existe una concentración suficiente de nitrógeno y fósforo en los suelos para que la población pueda asimilar y degradar los componentes del petróleo; siendo necesaria la bioestimulación con nutrientes para el proceso de biorremediación. Frecuentemente los suelos impactados con hidrocarburos y otros xenobióticos están deprimidos en fuentes nitrogenadas y fosfatadas (Tajahuerce, 1997). La relación óptima C/N/P es 100/10/1 (Sabaté y col., 2004).

4.3 Determinación de población microbiana heterótrofa y degradadora de hidrocarburos

Posiblemente el efecto más importante de la pobre aireación del suelo sobre los procesos microbiológicos es la disminución del coeficiente de oxidación de la materia orgánica, disminución que parece estar asociada más con una carencia de oxígeno que con un exceso de gas carbónico. Los organismos aerobios son incapaces de sobrevivir en ausencia de oxígeno. Por ejemplo, las bacterias responsables de la oxidación de los elementos de nitrógeno (nitrificantes) y azufre (*Thiobacillus*) son casi inactivas en suelos poco aireados. Solo los organismos anaerobios y facultativos se desarrollan bajo condiciones de pobre aireación (Alonso y col., 1974; Madigan y col., 1999).

Se determinó la existencia de población microbiana heterótrofa y degradadoras de hidrocarburos. Para hongos se obtuvo la misma población en todas las Estaciones (1×10^6 UFC/g de suelo). En bacterias, se encontró mayor población en la Estación 2 (Tabla 7) con un valor de 3.1×10^6 UFC/g de suelo. Es más frecuente encontrar bacterias adaptadas a hidrocarburos como fuente de carbono que hongos en el suelo (Alexander, 1977). Sabaté y col., 2004 observaron una población heterótrofa del orden de 10^7 UFC/g en suelos contaminados con aceite mineral.

Considerando que las bacterias son el grupo microbiano fundamentalmente responsable de la biodegradación de hidrocarburos y que la mayor población heterótrofa detectada fue en la Estación 2 se realizó la determinación de la población microbiana degradadora de hidrocarburos en esta estación, utilizando como única fuente de carbono diferentes fracciones de petróleo que representan varios tipos de hidrocarburos (Tabla 8).

La población degradadora de hidrocarburos obtenida osciló entre 10^6 y 10^9 UFC/g. Para petróleo fue 1.5×10^9 UFC/g (Tabla 8). Los microorganismos degradadores de esta fuente de carbono pueden asimilar los diferentes compuestos y mezclas de hidrocarburos del petróleo. Son microorganismos capaces de metabolizar n – alcanos, aromáticos y poliaromáticos, y poseen los genes *alk*, *tol* y *nah* que codifican los diferentes enzimas de la ruta de degradación de n – alcanos, aromáticos y poliaromáticos respectivamente (Grimm y Harwood, 1997; Johnson y Olsen, 1997; Whyte y col., 1997). Para el diesel, los degradadores de hidrocarburos están en el orden de 4.2×10^7 UFC/g, en este caso los microorganismos son capaces de degradar n-alcanos de cadena larga con más de 16 átomos de carbono (Van Gestel y col., 2003). La población encontrada para la kerosina fue de 4.8×10^6 UFC/g (Tabla 8), la misma degrada n-alcanos de cadenas cortas y hasta C_{18} átomos. Contienen los genes *alk* que codifica la activación de las rutas metabólicas de degradación de n-alcanos (Vomberg y Klinner, 2000; Smits y col., 2002). En el caso de la nafta los microorganismos detectados son capaces de degradar benceno y alquilbencenos como el tolueno, generalmente contienen los genes *tol* que codifican los enzimas de degradación del tolueno (Kellogg y col., 1981). El valor de población microbiana obtenido fue de 7.6×10^8 UFC/g de suelo (Tabla 8).

La presencia de una población microbiana suficiente, activa y capaz de asimilar diferentes sustratos hidrocarbonados condiciona la aplicación de técnicas de biorremediación por bioestimulación, la cual siempre es mejor que introducir población exógena al sitio contaminado (Alexander, 1994; Solanas, 2002).

4.4 Actividad respirométrica del suelo

Conocidas las características del emplazamiento y el contaminante a tratar, es necesario realizar ensayos de tratabilidad a nivel de laboratorio, para obtener la mayor información sobre los pasos a seguir durante la biorremediación. El objetivo de los ensayos de tratabilidad es evaluar la actividad de las poblaciones microbianas presentes y la biodegradabilidad de los hidrocarburos, además de las condiciones medioambientales que permitan optimizar la actividad metabólica de los microorganismos responsables de su eliminación o transformación (Viñas y col, 2001; Solanas, 2002).

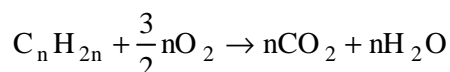
Uno de los ensayos de tratabilidad que se le realizan a los suelos contaminados se evalúa la actividad respirométrica del mismo, donde a través de la evolución de dióxido de carbono (CO_2), producto final de la mineralización, se conoce si tiene lugar la transformación total del contaminante.

Los resultados obtenidos en las estaciones de muestreo con suelos contaminados con hidrocarburos durante 5 semanas se muestran en las Figuras 5, 6, 7, 8. En los suelos sin tratar (B) se observó que la actividad respirométrica aumentaba en las tres estaciones (Figura 5), siendo más evidente la evolución de CO_2 en la Estación 3. No obstante en todos los casos esta producción no excedió de 0.5 mmol. En la Estación 2 se detectó el incremento en la cuarta semana. Esta diferencia en el comportamiento de la actividad respirométrica en las tres estaciones puede atribuirse a la ausencia de fuentes asimilables de carbono y energía o a la presencia de compuestos tóxicos. Por otra parte la baja producción de CO_2 se debe al bajo crecimiento de los microorganismos en el suelo sin tratar, ya que los procesos de biodegradación natural de hidrocarburos y compuestos xenobióticos son muy lentos y en ellos

participan diferentes enzimas e influyen varios factores que condicionan la velocidad de degradación (Alexander, 1994).

El tratamiento con glucosa (G) (Figura 6), nutrientes (N) (Figura 7) y glucosa más nutrientes (G+N) (Figura 8) estimuló el metabolismo microbiano hacia una mayor acumulación de CO₂, aumentando la actividad respirométrica en las primeras dos semanas de tratamiento en las tres estaciones. A partir de la segunda semana se observó en todos los casos una disminución del CO₂ acumulado. Esta reducción de la actividad respirométrica no se manifestó igual en todas las estaciones para los diferentes tratamientos (Figuras 6, 7 y 8); ni es característico el comportamiento observado. La evolución de CO₂ en los suelos debe incrementarse progresivamente (Sabaté y col., 2004), sin embargo en las estaciones de muestreo analizadas es posible que en la población microbiana degradadora de hidrocarburos y heterótrofa existente en ellas se establezca una competencia por los nutrientes para llevar a cabo el metabolismo, lo cual condiciona el rápido agotamiento de nutrientes y la disminución de la actividad respirométrica. Los microorganismos de crecimiento más rápido serán los más favorecidos y por tanto los responsables del proceso de transformación de los hidrocarburos. Otro factor a considerar es la aparición de intermediarios metabólicos tóxicos o en concentraciones inhibitorias para los microorganismos y se refleje en la reducción de CO₂ acumulado. La producción de CO₂ solo ocurre cuando tiene lugar la oxidación total de la molécula orgánica que se utiliza como fuente de carbono y energía (Madigan y col, 1999).

Durante el tratamiento con glucosa más nutrientes en la Estación 2 se observó que el contenido de CO₂ acumulado era muy alto, e insuficiente el hidróxido de sodio utilizado para absorberlo, evaluándose entonces la actividad respirométrica en esta estación diariamente durante 12 días (Figura 8b). Los resultados obtenidos evidenciaron que en este punto la actividad respirométrica se favorece con la presencia de glucosa y nutrientes, acumulándose hasta 2 mmol de CO₂ en los 12 días, lo cual coincide con los estudios realizados por otros investigadores del tema (Viñas y col, 2001; Sabaté y col., 2004). La cantidad de CO₂ producida está determinada por la ecuación de oxidación:



El ANOVA realizado para analizar estadísticamente los resultados (Tabla 10) demostró que los tratamientos realizados no son equivalentes para evaluar la actividad respirométrica como evolución de CO₂.

4.5 Ensayo en microcosmos

Los ensayos en microcosmos se realizaron en bandejas de aluminio con 400 g de suelo contaminado. Se analizó el suelo de la Estación 2, teniendo en cuenta la población microbiana heterótrofa, el contenido de Materia Orgánica Extraíble (Tabla 7) y la actividad respirométrica en esta estación.

Se determinó la materia orgánica extraíble durante 8 semanas para evaluar la biodegradación del petróleo. La materia orgánica inicial fue de 73,7 g de MOE / kg de suelo, la cual disminuye en las primeras semanas de tratamiento (Figura 9) para estabilizarse en 42 g de MOE / kg de suelo

aproximadamente. En el tratamiento control (Figura 9) se observó que la materia orgánica extraíble disminuye rápidamente en las primeras dos semanas, tiempo a partir del cual la reducción de materia orgánica es más lenta; estabilizándose el porcentaje de biodegradación entre la quinta y la sexta semana en 41 %.

La biodegradación de hidrocarburos en suelos arenosos es difícil para las poblaciones microbianas ya que el proceso está influenciado por fenómenos de transporte además de los factores bióticos y abióticos. En estos hay que diferenciar entre las causas que dependen del sustrato (baja solubilidad en agua y pobre difusión) y las que dependen de la matriz (adsorción, inclusión en poros y distribución no homogénea del contaminante) de pobre biodisponibilidad. La degradación de alquitrán de petróleo en suelos arenosos, pobres en materia orgánica no fue significativa en 8 semanas de tratamiento. Kästner en 1995 describió que la adición de compost favoreció el incremento de residuos no extraíbles a un suelo contaminado con antraceno (Löser y col, 1999).

Los tratamientos con nutrientes (Figura 10) y nutrientes con glucosa (Figura 11) mostraron una reducción de la Materia Orgánica Extraíble (MOE) del 58 % aproximadamente en la primera semana de experimentación, tiempo a partir del cual se estabiliza el porcentaje de biodegradación en un 40 %. La respuesta de los microorganismos a la adición de nutrientes es muy variable, y aunque los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con Steffensen y Alexander en 1995, es notable la rapidez de la respuesta (porcentaje de biodegradación) con la fertilización del suelo, situación que elimina el período de adaptación de la población microbiana. Las formas inorgánicas de nitrógeno y fósforo, nitrato y fosfato respectivamente, en los microcosmos fertilizados son fácilmente asimilables y por tanto pueden usarse inmediatamente los hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Leahy y Colwell, 1990). Se ha descrito que la biodegradación del crudo Arabian Ligth 250 por un cultivo mixto marino se incremento al emplear nitrógeno y fósforo como fertilizantes (Lacotte y col, 1995).

Sabaté y col, 2004 observaron que la fertilización con nutrientes más glucosa fue más eficiente que la fertilización únicamente con nutrientes para el tratamiento de un suelo contaminado con aceite mineral. En esta misma experiencia se detectó que otro suelo contaminado con petróleo respondía de forma similar en todos los tratamientos aplicados. Por otra parte la degradación de hidrocarburos por comunidades microbianas dependa de la composición de la comunidad y su respuesta de adaptación a la presencia de hidrocarburos.

En los ensayos de tratabilidad practicados en la Estación 2 del área MAP de la Refinería “Hermanos Díaz” la adición de glucosa al suelo fertilizado con nutrientes (Figura 11) no modificó significativamente la respuesta de la población microbiana a la biodegradación de hidrocarburos (Tabla 11). Independientemente de que los tratamientos empleados en el trabajo son equivalentes en cuanto a respuesta de población microbiana (medida como porcentaje de biodegradación) (Tabla 11) el conocido “Palo de Hockey” típico de procesos de biorremediación de suelos contaminados con petróleo y derivados no se obtiene al mismo tiempo, siendo más rápida la estabilización de la biodegradación cuando se fertiliza el suelo con nutrientes. Esta estabilización en la biodegradación se debe a que los compuestos más recalcitrantes son menos desorbibles y por tanto se requiere de otros tratamientos para eliminarlos (Solanas, 2002).

5. CONCLUSIONES

Los suelos del área de MAP de la Refinería “Hermanos Díaz” son predominantemente arenosos, con materia orgánica extraíble que osciló entre 4 y 12 % y la población heterótrofa entre $1,5 \times 10^6$ y $3,1 \times 10^6$ UFC/g de suelo.

La actividad respirométrica fue más alta en el tratamiento con nutrientes para los suelos analizados; alcanzándose un porcentaje de biodegradación en microcosmos de aproximadamente 46,27 %.

6. RECOMENDACIONES

Realizar el estudio cromatográfico para evaluar los hidrocarburos o fracciones de estos que son transformados durante el tratamiento.

Estudiar la influencia de la adición de tensoactivos en la tratabilidad en suelos contaminados con hidrocarburos a partir de la estabilización en el porcentaje de biodegradación.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abalos, A.; Viñas, M.; Sabaté, J.; Manresa & Solanas, A. M. 2004. Enhanced biodegradation of casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of a rhomnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15:249 – 260.
- Alexander, M. 1977. Introduction to the soil microbiology. Second edition. John Wiley & Sons. USA pp 467
- Alexander, M. 1981. Biodegradation of Chemicals of Environmental Concern. *Science*. 211:132-138
- Alexander, M. 1994. Bioremediation technologies. In *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press. New York. pp 302
- Alexeiev, V. N. 1978. Análisis cuantitativo. 2^{da} Edición. Editorial MIR Moscú. pp 517.
- Alonso, C.; Durán, J. L.; Frómata, E.; Martín, N.; Gutiérrez, C. 1974. Compendio de suelos. Edición revolucionaria. Instituto Cubano del Libro. Primera parte. pp 472
- APHA. 1998. Standard Methods for the examination of water and wastewater. 20th edition. American Press. Health Association. USA
- Atlas, R. M. 1991. Microbial hydrocarbon degradation – bioremediation of oil spills. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 52:149 – 156
- Atlas, R. y Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Education, SA. Madrid. pp 329 – 380, 553 – 593.
- Bezalel, L.; Hadar, V.; Cerniglia, C. 1998. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbon by the white – rot fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Advance in Biotechnol.* pp 405 – 421.
- Bogomólov, A. I.; Gaile, A. A.; Grómová, V. V.; Drabkin, A. E.; Proskuriakov, V. A.; Rosental, D. A.; Rudin, M. G.; Syroezhko, A. M. 1984. Química del petróleo y del gas. Editorial MIR Moscú. pp 407.
- Bordons, A.; Constantin, M. 1999. Introducción a la biotecnología ambiental. ED Universitat Rovira Virgill. Tarragona. España. pp 111.
- Bossert, I.; Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soils ecosystem. *Petroleum Microbiology*. Mac Millan Publishing Co, New York. pp 435 – 474
- Breedveld, G. D.; Karesen, D. A. 2000. Estimating the availability of polycyclic aromatic hydrocarbons for bioremediation of creosote contaminated soils. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 54:255-261

- Cabrerizo, P.; Expósito, H. y Fabra, A. 1999. Biorremediación de vertidos petrolíferos. pp 6
- Centro Politécnico del Petróleo (CPP).2003. Petróleo, origen y procesos. Curso de Preparación Básica para trabajadores de CUPET. pp 37
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatics hydrocarbon. Biodegradation. 3:351 – 368
- Dagher, F.; Déziel, E.; Lirette, P.; Paquette, G. ; Bisaaillon, J. G. ; Villemer, R. 1997. Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. Microbio l. 43:368-377
- Domènech, X. 2000. Química del suelo. El impacto de los contaminantes. 3^{ra} Edición. Miraguano S. A. Madrid. pp 190..
- Eggen, T. 1999. Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi. Tesis Doctoral. Agricultural University of Norway.
- Ellis, B.; Harold, P.; Komber, H. 1991. Bioremediation of areostate contaminated site. Environ. Technol. 12. pp 447 – 459.
- Ercoli, G.; Gálvez, J.; Di Paola, P. ; Cantero, J.; Videla, S.; Medaura, M.; Bauzá, J. 2002. Análisis y evaluación de parámetros críticos en la biodegradación de hidrocarburos en suelo. Apuntes. Estudio realizado en laboratorio de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. pp 10
- Fonseca, F. 1998 Bioil: Bioproducto para combatir derrames de petróleo en el mar. Tesis de Master. Universidad de la Habana. Cuba.
- Ford, C.; Sayler, G. ; Burlage, R. 1999. Containment of a genetically engineered microorganism during a field bioremediation application. Appl. Microbial. Biotechnol. 151:397 – 400.
- García-Cuellar, J. A.; Arreguin-Sánchez, F.; Hernández, S y LLuch-Cota, D. 2004. Impacto económico de la industria petrolera en la sonda de Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. Interciencia. Vol. 29 N° 6 pp 311 – 319.
- Golobocanin, D. D.; Skrbic, B. D.; Miljevic, N. R. 2004. Principal component analysis for soil contaminations with PAHs. Chemometrics and intelligent laboratory systems 20:1 – 5.
- Grimm, A.; Harwood, C. 1997. Chemotaxis of *Pseudomonas sp* to the polyaromatic hydrocarbon naphthalene. Applied and Environmental Microbiology. pp 4111-4115
- Hada, H. S.; Sizemore, R. K. 1981. Incidence of plasmids in marine *Vibrio sp*. Isolated from an oil field in the Northwestern Gulf of Mexico. Appl. Environ. Biotechnol. 41: 199 – 202
- Harayama, S.; Kishira, H.; Kasai, Y.; Kasuaki, S.1999. Petroleum biodegradation in marine environments. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 1:63 – 70

- Jackson, M. L. 1979. Análisis químico de los suelos. Edición Revolucionaria. Instituto del Libro. Cuba. pp 70 – 481.
- Johnson, G.; Olsen, R. 1997. Multiple pathways for Toluene degradation in *Burkholderia* sp.strain JS150. Applied and Environmental Microbiology. pp 4047-4052
- Jorgensen, K.; Puustinen, J.; Sourtti, A. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon – contaminated soil by composting in biopiles. Environ. Pol. 107:245 – 254
- Juteau, P.; Bisailon, J.; Lépine, F.; Rateau, V. ; Beaudet, R. ; Villemur, R. 2003. Improving the biotreatment of hydrocarbons – contaminated soils by addition of activated sludge taken from the wastewater treatment facilities of an oil refinery. Biodegradation 14:31 – 40.
- Kästner, M. 1995. Citado en Löser, C.; Seidel, H.; Hoffman, P.; Zehnsdorf, A. 1999. Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. Appl. Microbiol. Biotchnol. 51:105-111.
- Kästner, M. 2000. Bioavailability of Contaminants. En Biotechnology. Environmental Processes II. Soil Descontamination. Wiley-VCH. Volume 11b. pp 91 - 141.
- Kaushanskii, D; Demayanoskii, V. ; Stupakova, T. 1994. Removing petroleum products from reservoir water petroleum degradation using immobilized microorganisms on a quinine and polyacrylamide gel – support for reservoir aquifer descontamination. U. S. patent R. U. 20.25466.
- Kellogg, S. T.; Chatterjee, D. K.; Chakrabarty, A. M. 1981. Science 214:1133-1135
- Kerr, R. P.; Capone, D. G. 1998. The effect of salinity on microbial mineralization of two polycyclic aromatic hydrocarbons in estuaries sediments. Mar. Environ. Res. 26 pp 181 – 198
- Klein, J. 2000. Bioavailability of Contaminants. En Biotechnology. Environmental Processes II. Soil Descontamination. Wiley-VCH. Volume 11b. pp 145 - 160.
- Lacotte, D. J.; Mille, G.; Acquaviva, M. ; Bertrand, J. C. 1995. In vitro biodegradation of Arabian Light 250 by a marine mixed culture using fertilizers as Nitrogen and Phosphorous sources. Chemosphere, Vol. 31 pp 4351 -4358.
- LaGrega, M. D.; Buckingham, P. L.; Evans, J. C. and Environmental Resources Management. 2001. Hazardous waste management. Mc Graw-Hill. pp 7-23
- Leahy, J. G.; Colwell. R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. 54 pp 305 – 315
- López, C. M y col. 2002. Introducción al conocimiento del medio ambiente. Editorial Academia. Cuba. pp 31.

- Löser, C.; Seidel, H.; Hoffman, P.; Zehnsdorf, A. 1999. Bioavailability of hydrocarbons during microbial remediation of a sandy soil. *Appl. Microbiol. Biotchnol.* 51:105-111.
- Madigan, M.; Martinko, J.; Parker, J. 1999. Brock. *Biología de los microorganismos*. Octava edición revisada. Prentice Hall Iberia. Madrid pp 986.
- Mahro, B. 2000. Bioavailability of Contaminants. En *Biotechnology. Environmental Processes II. Soil Descontamination*. Wiley-VCH. Volume 11b. pp 63-87
- Maier, R. M. 2000. Bioavailability and its importance to bioremediation. Chapter in: *Bioremediation*, Kluwer. Academic Publishers, Norwell, MA, pp 59 – 78
- Maier, R.; Pepper, I.; Gerba, C. 2000. Microorganisms and organic pollutants. In *Environmental Microbiology*. Academic Press, ed (Canada) pp 363 – 400
- Mueller, J.; Lantz, S.; Blatt Mann, B.; Cahpman, P. 1991. Bench – scale evolution of alternative biological treatment processes for the remediation of PCPs and creosote – contaminated materials: slurry phase bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* 25: 1055 – 1061.
- NC 30:1999 Calidad del suelo. Tierras alteradas. Requisitos generales para la restauración.
- NC 31:1999 Calidad del suelo. Requisitos para la protección de la capa fértil del suelo al realizar trabajos de movimientos de tierra.
- Noordman, W.; Ji, W.; Bruseau, M.; Jassen, D. 1998. Effects of rhamnolipid biosurfactants on removal of phenanthrene from soil. *Environ. Sci. Technol.* 32:1806 – 1812.
- Olivera, N.; Commendatore, M.; Morán, A.; Estevez, I. 2000. Biosurfactant enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge waste. *J. Industrial Microbiology and Biotechnology.* 25:70 – 73.
- Orozco, C.; Pérez, A.; González, M. N.; Rodríguez, F.; Alfayate, J. M. 2004. Contaminación ambiental: una visión desde la química. Primera edición. Thomson. Madrid. España pp 453 – 450.
- Parés, R. y Juaréz, A. 1997. *Bioquímica de los microorganismos*. Compuestos aromáticos. Edición en Español. Editorial Reverté S.A. Cap. 17: 229 – 231
- Pérez, R. 2003. Aislamiento y selección de cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos. Tesis en opción al título de Máster en Biotecnología. Mención ambiental. Universidad de Oriente
- Rice, L.; Hemmingsen, B. 1997. Enumeration of hydrocarbon – degrading bacteria. *Methods in Biotechnology*, 2. Bioremediation protocols, Humana Press. pp 99-107

- Romanstchuk, M.; Sarand, I.; Petänen, T.; Peltola, R.; Jonsson – Vihanne; Koivula, T.; Yrjälä, K.; Haahtela, K. 2000. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution* 107: 179 – 185.
- Sabaté, J.; Viñas, M.; Solanas, A. M. 2004. Laboratory – scale bioremediation experiments on hydrocarbon – contaminated soils. *International Biorremediation & Biodegradation* 54:19-25.
- Schlegel, H. G. 1997. *Microbiología General*. Edición Omega S. A. Barcelona. pp 654.
- Semple, K.; Cain, R.; Schmidt, S. 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiology letters*. 170:291-300
- Semple, K. T.; Reid, B. J.; Femor, T. R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soil contaminated with organic pollutants. *Environmental pollution* 112:269-283
- Smits, T; Balada, S.; Witholt, B.; Van Beilen, J. 2002. Functional analysis of alkane hydroxylases from Grand-negative and Grand-positive bacteria. *Journal of Bacteriology*, pp 1733-1742.
- Solanas, A. M. 2002. Biodegradación y biorremediación: aspectos básicos aplicados a la transformación microbiana de contaminantes orgánicos. Apuntes del curso de postgrado. Universidad de Barcelona. España.
- Steffensen y Alexander, 1995. Citado en Lacotte, D. J.; Mille, G.; Acquaviva, M. ; Bertrand, J. C. 1995. In vitro biodegradation of Arabian Light 250 by a marine mixed culture using fertilizers as Nitrogen and Phosphorous sources. *Chemosphere*, Vol. 31 pp 4351-4358.
- Stringfellow, N.; Aitken, M. 1994. Comparative physiology of phenanthrene degradation by two dissimilar *Pseudomonas* isolated from a creosote-contaminated soil. *J. Microbiol* 40:432-438
- Sugiera, K.; Ishihara, M; Shimauchi, T; Harayama, S.1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. *Environ. Sci. Technol.* 31:45 – 51.
- Tajahuerce, T. A. 1997. Estudio de la degradación de aceite lubricante residual por un cultivo mixto bacteriano productor de tensoactivos. Master en Biología Experimental. Universidad de Barcelona.
- Thiem, A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* pp 258-263
- Trejo, M. 1997. *Biorremediation principles*. Mc Graw – Hill, Boston. pp 1-170

- Van Gestel, K.; Mergaert, J.; Swings, J.; Coosemans, J.; Ryckeboer, J. 2003. Bioremediation of diesel oil-contaminated soil by composting with biowaste. *Environmental pollution* 125:361-368
- Viñas, M. 1999. Biorremediación de aguas contaminadas por hidrocarburos. Master en biología experimental. Departamento de biología. Facultad de biología. Universidad de Barcelona.
- Viñas, M.; Sabaté, J.; Grifoll, M. y A.M. Solanas. 2001. Ensayos de tratabilidad en la recuperación de suelos contaminados por la tecnología de la biorremediación. *Residuos. Revista técnica.* 59:78 – 82
- Vomberg, A. ; Klinner, U. 2000. Distribution of *alk B* genes within n – alkane – degrading bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 89:339 – 348.
- Whyte, L.; Bourbonnière, L.; Greer, C. 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotropic *Pseudomonas* strain possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathways. *Applied and Environmental Microbiology.* pp 3719-3723
- Yonghee, A.; Sanseverino, J.; Sayler, G.1999. Analyses of polycyclic aromatic hydrocarbon – degrading bacteria isolated from contaminated soils. *Biodegradation* 10:149 – 157.
- Young, L.; Cerniglia, C. 1995. Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals. Wiley & Liss. New York. pp 629
- Zheng, Z.; Obbard, J. 2000. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil using surfactant and the white rot fungus *Phanaerochaete chrysosporium*. *J. Chem. Tech. Biotechnol* 75:1183-1189

Tabla 1: Propiedades de las fracciones del suelo (Doménech, 2000).

Fracción	Retención de nutrientes	Infiltración del agua	Retención del agua	Aireación	Capacidad de ser cultivado
Arcilla	***	*	***	*	*
Limo	**	**	**	**	**
Arena	*	**	*	***	***

*bajo, ** normal, *** bueno

Tabla 2: Principales microorganismos degradadores de hidrocarburos.

GRUPO	GENERO	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA
Bacterias	<i>Acinetobacter sp.</i>	Cerniglia, 1992; Schlegel, 1997
Bacterias	<i>Actinomyces sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990
Bacterias	<i>Alcaligenes sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Schlegel, 1997
Bacterias	<i>Arthrobacter sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Schlegel, 1997
Bacterias	<i>Bacillus sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Olivera y col., 2000; Schlegel, 1997
Bacterias	<i>Beijerinckia sp.</i>	Ellis y cols., 1991
Bacterias	<i>Corynebacterium sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990
Bacterias	<i>Flavobacterium sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990
Bacterias	<i>Micrococcus sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990
Bacterias	<i>Mycobacterium sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990
Bacterias	<i>Nocardia sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990
Bacterias	<i>Pseudomonas sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Mueller y col., 1990; Cerniglia, 1992; Stringfellow y Aitken, 1994; Dagher y col., 1997; Schlegel, 1997; Noordman y col., 1998
Bacterias	<i>Rhodococcus sp.</i>	Leahy y col., 1990
Bacterias	<i>Streptomyces sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Cerniglia, 1992
Hongos	<i>Aspergillus sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Cerniglia, 1992
Hongos	<i>Penicillium sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Cerniglia, 1992
Hongos	<i>Rhizopus sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Cerniglia, 1992
Hongos	<i>Phanerochaete sp.</i>	Zheng y Obbard, 2000
Hongos	<i>Pleurotus sp.</i>	Bezalel y col, 1998; Eggen, 1999
Hongos	<i>Tricoderma sp.</i>	Cerniglia, 1992
Hongos	<i>Mortierella sp.</i>	Cerniglia, 1992
Hongos	<i>Cunninghamella sp.</i>	Cerniglia, 1992
Hongos	<i>Aureobacidium sp.</i>	Cerniglia, 1992
Levaduras	<i>Sacharomyces sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990
Algas	<i>Chlorella sp.</i>	Semple y col, 1999
Algas	<i>Oscillatoria sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990
Algas	<i>Dunaliella sp.</i>	Leahy y Colwell., 1990; Cerniglia, 1992
Algas	<i>Chlamydomonas sp.</i>	Semple y col, 1999

Tabla 3: Matriz causa – efecto. Etapa de funcionamiento del área de MAP.

Factores del medio	Impactos			
	Desbordamiento de tanques (I ₁)	Roturas en tuberías y válvulas (I ₂)	Ponche en tanques (I ₃)	Limpieza de tanques (I ₄)
Suelos (M ₁)	x	x	x	x
Aguas subterráneas (M ₂)	x	x	x	-
Calidad del aire (M ₃)	x	x	x	-
Salud e higiene (M ₄)	x	x	x	-

Tabla 4: Matriz de valoración de los impactos en la etapa de funcionamiento del área de MAP

Factores	Impactos												I	
	Nat	In	Ex	Mo	Pe	Rv	Ac	Pb	Ef	Pr	Ps	I		
M ₁ I ₁	-	4	2	4	2	2	1	2	4	1	1	-35	Moderado	
M ₁ I ₂	-	2	2	4	2	2	1	2	4	1	1	-27	Moderado	
M ₁ I ₃	-	2	1	4	2	2	1	2	4	1	1	-25	Moderado	
M ₁ I ₄	-	2	1	4	2	2	1	2	4	1	1	-25	Moderado	
M ₂ I ₁	-	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	-15	Irrelevante	
M ₂ I ₂	-	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	-15	Irrelevante	
M ₂ I ₃	-	1	1	1	1	2	1	2	1	1	1	-15	Irrelevante	
M ₃ I ₁	-	1	1	4	2	2	1	2	4	1	1	-22	Irrelevante	
M ₃ I ₂	-	1	1	4	2	2	1	2	4	1	1	-22	Irrelevante	
M ₃ I ₃	-	1	1	4	2	2	1	2	4	1	1	-22	Irrelevante	
M ₄ I ₁	-	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	-15	Irrelevante	
M ₄ I ₂	-	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	-15	Irrelevante	
M ₄ I ₃	-	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	-15	Irrelevante	

Clave: Nat (Naturaleza), In (Intensidad), Ex (Extensión), Mo (Momento), Pe (Persistencia), Rv (Reversibilidad), Ac (Acumulación), Pb (Probabilidad), Ef (Efecto), Pr (Periodicidad), Ps (Percepción social), I (Importancia).

Tabla 5: Matriz de importancia de los impactos en la etapa de funcionamiento del área de MAP

Factores del medio	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	Total
M ₁	-35	-27	-25	-25	-112
M ₂	-15	-15	-15	-	-45
M ₃	-22	-22	-22	-	-66
M ₄	-15	-15	-15	-	-45
Total	-87	-79	-77	-25	-268

Tabla 6: Análisis granulométrico del suelo de las estaciones de muestreo del área MAP de la Refinería “Hermanos Días”.

Estaciones	Grava (%)	Arena (%)	Arcilla (%)
1	6.9	76.7	16.4
2	11.2	53.8	35.0
3	17.6	42.4	40.0

Tabla 7: Resultados de la caracterización de los suelos en las tres estaciones de muestreo.

Parámetros		Estación 1	Estación 2	Estación 3
Capacidad de campo (%)		12.4 ± 0.22	12.5 ± 1.41	20.1 ± 1.16
Sólidos totales (%)		93.7 ± 0.41	92.3 ± 0.23	91.0 ± 0.48
Sólidos totales fijos (%)		91.9 ± 0.52	89.9 ± 0.08	94.3 ± 0.11
Sólidos volátiles (%)		8.1 ± 0.52	10.1 ± 0.08	5.7 ± 0.11
pH		7.8	9.6	8.6
Conductividad (µS)		127	203	151
Existencia de microorganismos heterótrofos (UFC/g * 10 ⁶)	Bacterias	1.7	3.1	1.6
	Hongos	1	1	1
Materia Orgánica Extraíble MOE (%)		8.2 ± 0.70	11.6 ± 0.23	4.8 ± 0.59
Carbono Orgánico Total COT (%)		6.5 ± 0.49	5.3 ± 0.23	4.3 ± 0.25
Nitrato (mg/L)		2.94 ± 0.06	3.10 ± 0.05	3.17 ± 0.07
Fosfato (mg/L) x 10 ⁻³		3.7	3.8	3.9

Tabla 8: Población degradadora de hidrocarburo para la Estación 2.

Producto	Población degradadora bacteriana (UFC/g)
Petróleo	1.5×10^9
Diesel	4.2×10^7
Kerosina	4.8×10^6
Nafta	7.6×10^8

Tabla 9: ANOVA para Materia Orgánica Extraíble (MOE) según la estación de muestreo

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	45,835	2	22,9175	38,94	0,0071
Intra grupos	1,7657	3	0,588567		
Total (Corr.)	47,6007	5			

Tabla 10: ANOVA para mmol de CO₂

Fuente	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Estaciones	1,55891	2	0,779454	8,74	0,0003
B:Tratamientos	8,92737	2	4,46369	50,04	0,0000
RESIDUOS	11,5971	130	0,0892085		
TOTAL (CORREGIDO)	22,0834	134			

Tabla 11: ANOVA para g de MOE/kg de suelo según los tratamientos aplicados para la Estación 2 (B, G, N y G+N)

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	399,227	3	133,076	1,02	0,3860
Intra grupos	11829,8	91	129,998		
Total (Corr.)	12229,0	94			

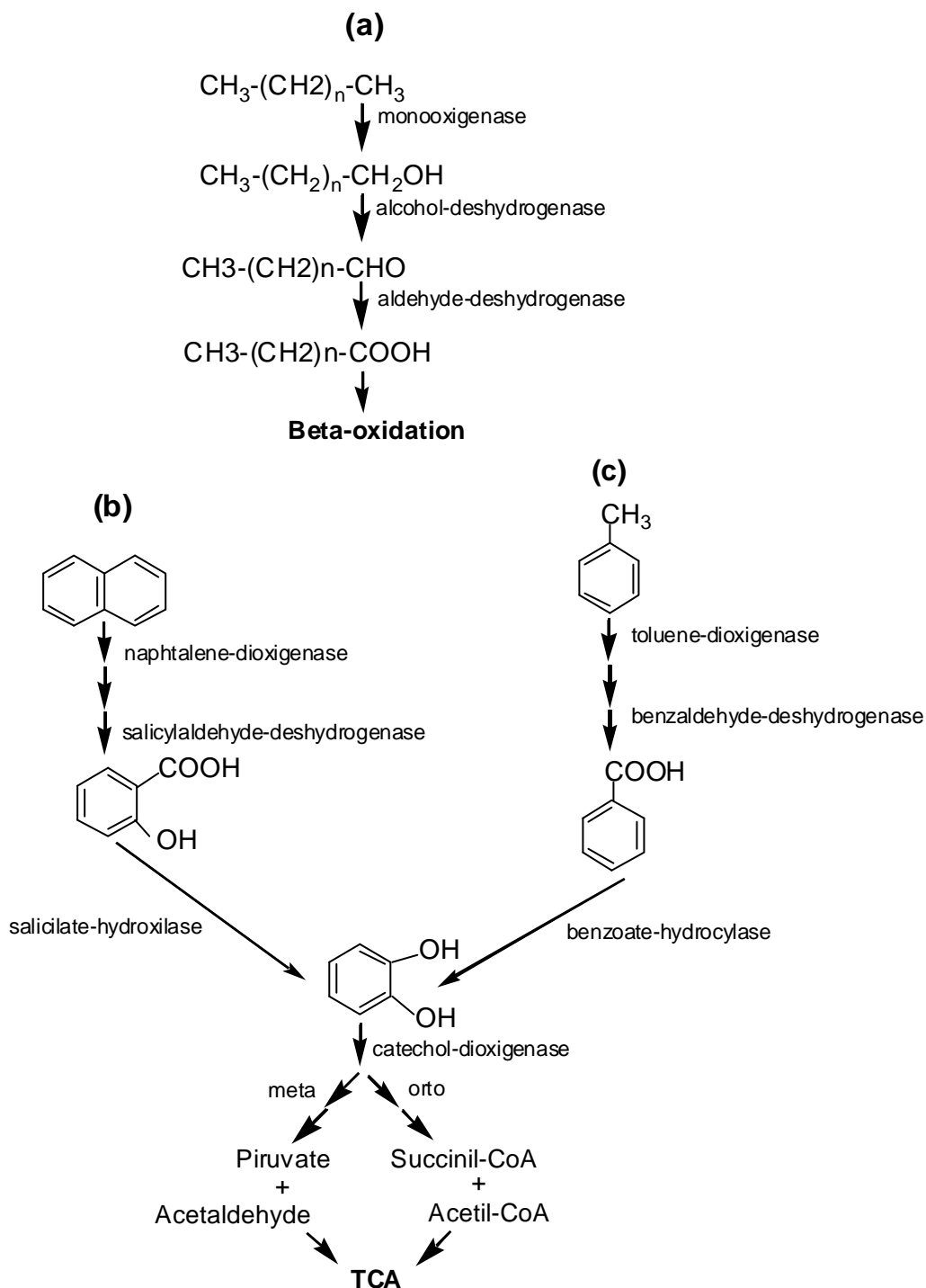


Figura 1: Vías catabólicas de degradación de los hidrocarburos: a) n – alcanos, b) aromáticos y c) poliaromáticos. (Pérez, 2003)

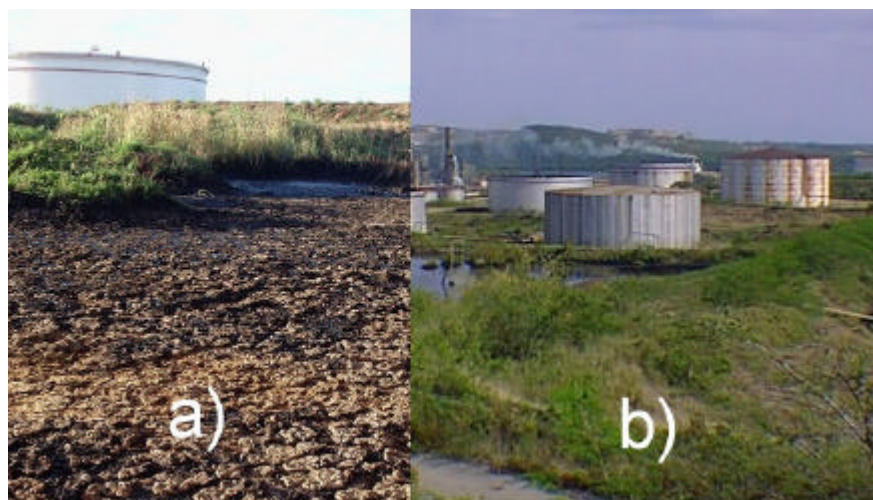


Figura 2: a) Suelo contaminado con petróleo, b) Tanques del área de MAP.

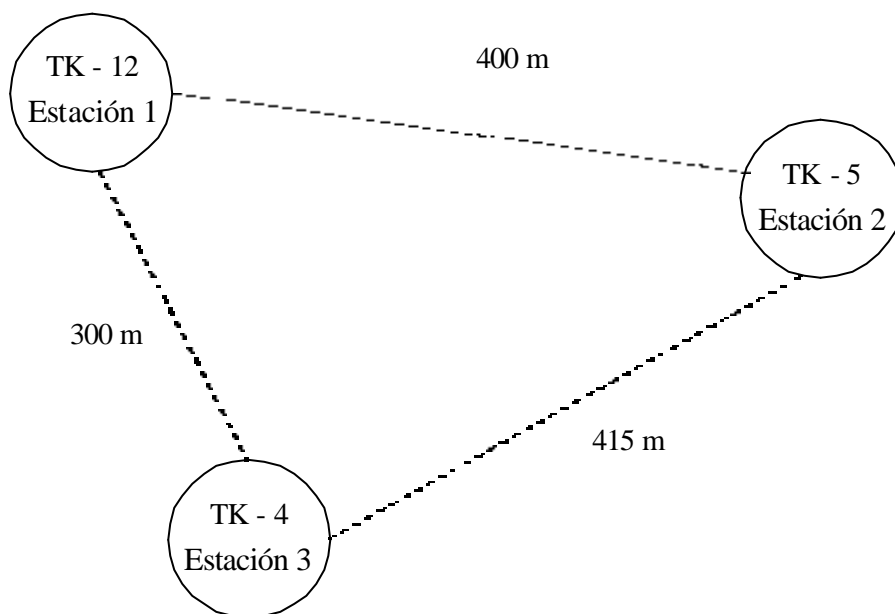


Figura 3: Vista superior de los puntos de muestreo

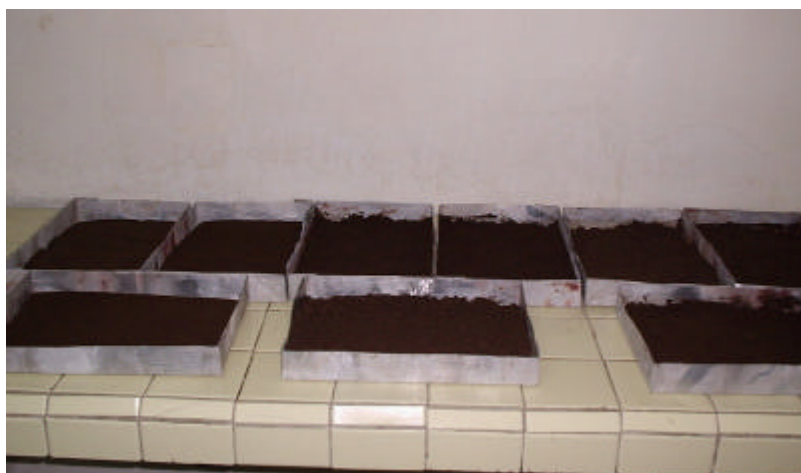


Figura 4: Microcosmos

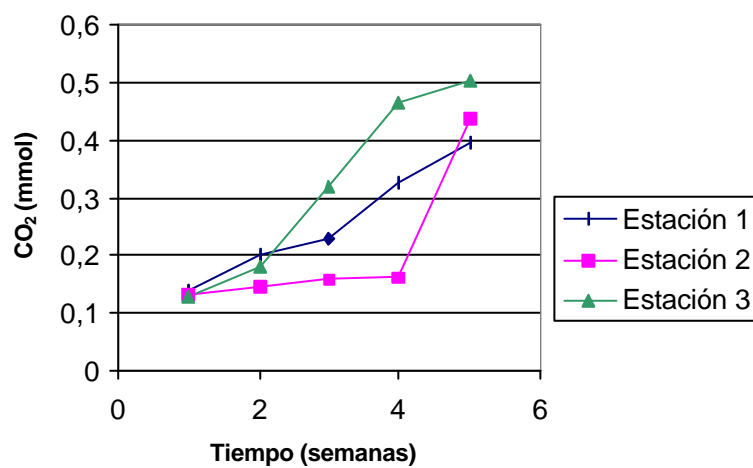


Figura 5: mmol de CO₂ en función del tiempo para el blanco (B) de la actividad respirométrica del suelo.

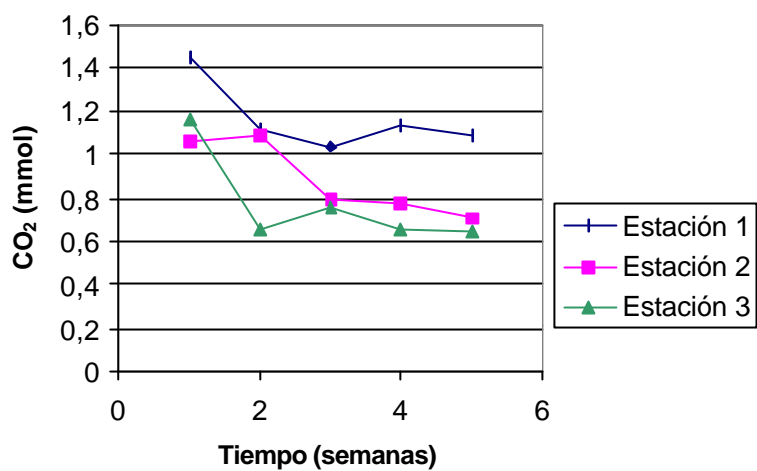


Figura 6: mmol de CO₂ en función del tiempo para el tratamiento con glucosa (G) de la actividad respirométrica del suelo.

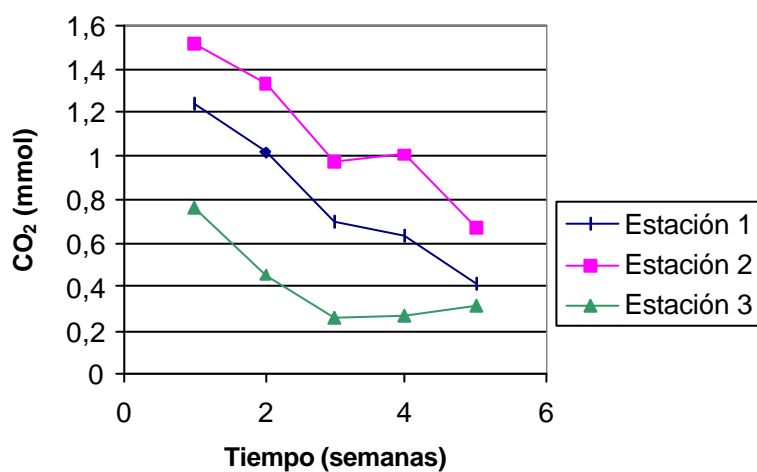


Figura 7: mmol de CO₂ en función del tiempo para el tratamiento con nutrientes (N) de la actividad respirométrica del suelo.

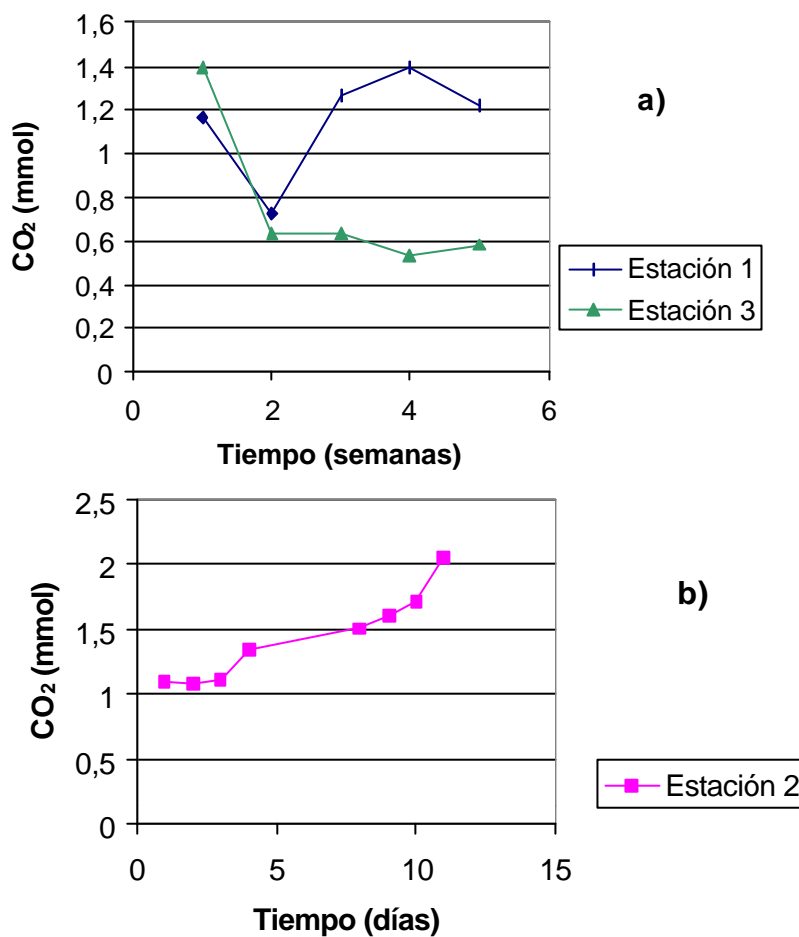


Figura 8: mmol de CO₂ en runcion del tiempo para el tratamiento con glucosas y nutrientes (G + N) de la actividad respirométrica del suelo: a) Estación 1 y 3, b) Estación 2.

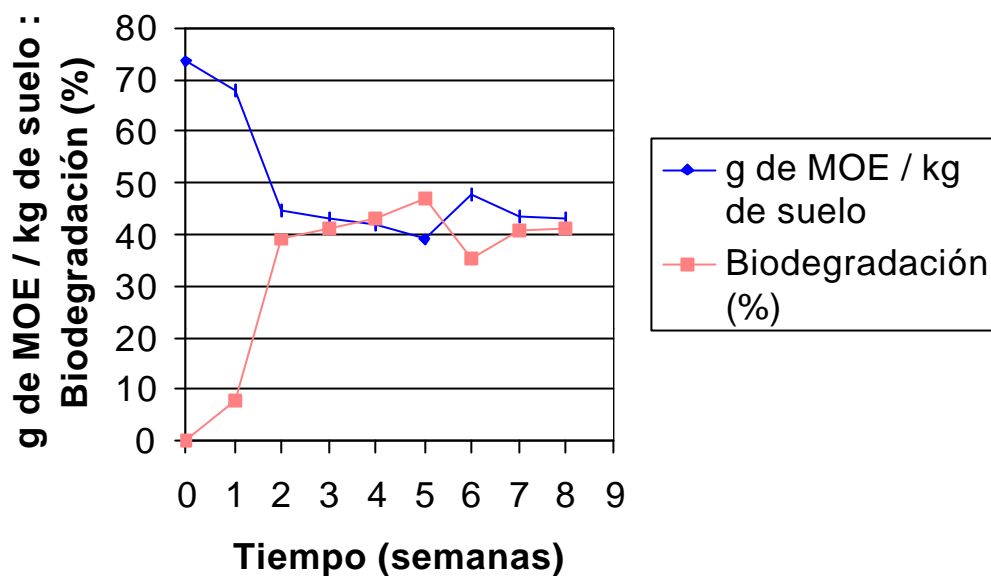


Figura 9: Relación entre g de MOE/kg de suelo y biodegradación (%) para el tratamiento en blanco de la Estación 2.

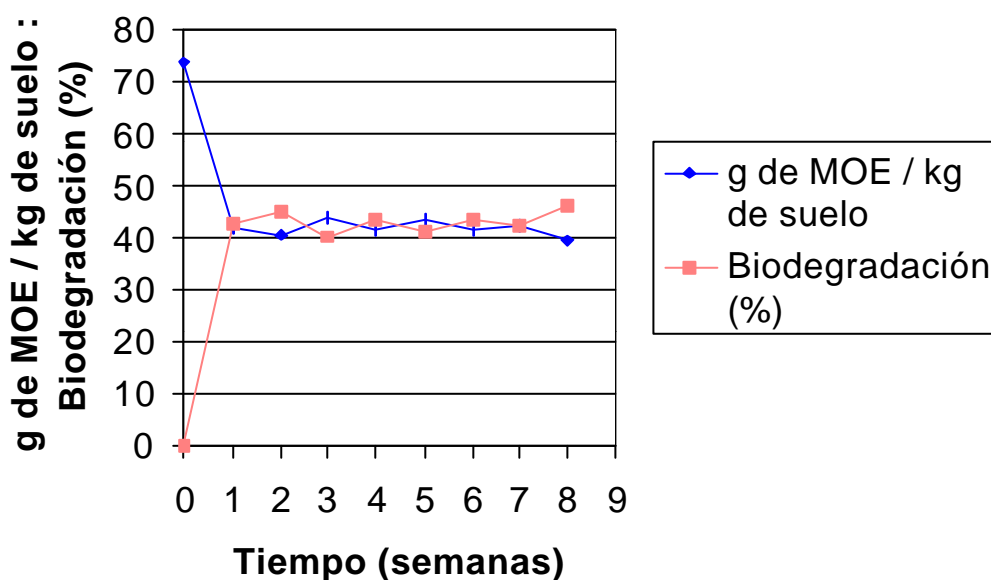


Figura 10: Relación entre g de MOE/kg de suelo y biodegradación (%) para el tratamiento con nutrientes de la Estación 2.

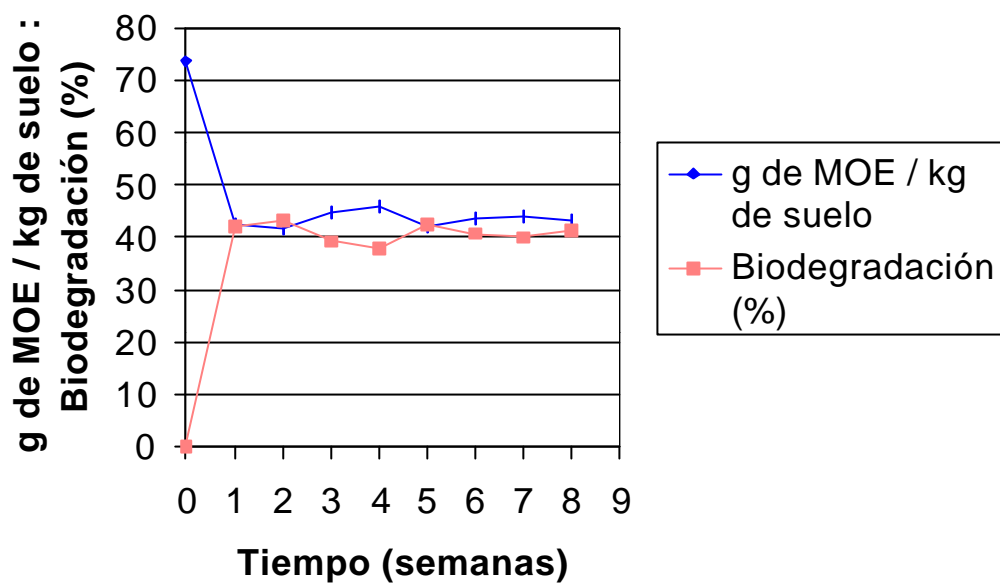


Figura 11: Relación entre g de MOE/kg de suelo y biodegradación (%) para el tratamiento con glucosa y nutrientes de la Estación 2.

