

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**COMPARACIÓN DE POTENCIAL BIODEGRADATIVO DE TÉCNICAS
DE BIORREMEDIACIÓN**

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por los Brs. Briceño H., Layling M.,
Méndez S., Leonardo E. G.
Para optar al Título
de Ingeniero Químico

Caracas, 2006

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**COMPARACIÓN DE POTENCIAL BIODEGRADATIVO DE TÉCNICAS
DE BIORREMEDIACIÓN**

TUTOR ACADÉMICO: Prof. Francisco Yánez

TUTORES INDUSTRIALES: Dr. Vladimir León,
Lic. Olaf Ilsins

Presentado ante la Ilustre
Universidad Central de Venezuela
Por los Brs. Briceño H., Layling M.,
Méndez S., Leonardo E. G.
Para optar al Título
de Ingeniero Químico



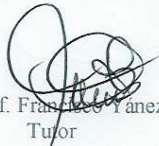
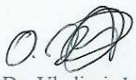
Caracas, 2006

Caracas, Agosto de 2006

Los abajo firmantes, miembros del Jurado designado por el Consejo de Escuela de Ingeniería Química, para evaluar el Trabajo Especial de Grado presentado por los Bachilleres Briceño L., Layling y Méndez S., Leonardo E. G., titulado:

“Comparación de potencial biodegradativo de técnicas de biorremediación”

Consideran que el mismo cumple con los requisitos exigidos por el plan de estudios conducente al Título de Ingeniero Químico, y sin que ello signifique que se hacen solidarios con las ideas expuestas por los autores, lo declaran APROBADO.

 Prof. Leonardo Oropeza Jurado	 Prof. Freddy Méndez Jurado
 Prof. Francisco Yáñez Tutor	 Dr. Vladimir León Tutor

Briceño L., Layling.

Méndez S., Leonardo E. G.

**COMPARACIÓN DE POTENCIAL BIODEGRADATIVO DE
TÉCNICAS DE BIORREMEDIACIÓN**

**Tutor Académico: Prof. Francisco Yáñez, Tutores Industriales: Dr. Vladimir
León, Lic. Olaf Ilsins**

**Tesis. Caracas, U.C.V. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería
Química. Año 2006, 135 p.**

Palabras Claves: Biorremediación, consorcio bacteriano, bioaumentación,
bioestimulación, hidrocarburos, suelos.

Resumen. En esta investigación, se aislaron cepas bacterianas autóctonas de suelos contaminados con hidrocarburos, mediante enriquecimiento en Naftaleno, Pireno, DBT y orimulsión (fuente de carbono). Se realizó una prueba piloto aplicando los tratamientos: Biorremediación, Bioaumentación con un cultivo del consorcio bacterial autóctono como foráneo y Bioestimulación. Durante esta experiencia, se analizaron en muestras los hidrocarburos totales de petróleo (HTP), saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA).

**COMPARATION OF THE BIODEGRADATIVE POTENCIAL FROM
BIORREMEDIATION TECNICS**

Key words: Bio-remediation, bacterial consortia, bioaugmentation,
bioestimulation, hydrocarbon, soils.

Abstract. In this study, endogenous bacterial strains were isolated from petroleum-contaminated soil by means of become wealthy with oil derivates (source of carbon). A pilot test will carry out applying treatments like Biorremediation with a native and a foreign bacterial consortia culture (Bioaugmentation) and Bioestimulation. During this test, samples was analyzed for total Petroleum hydrocarbon (TPH), saturated, aromatic, resin an asphalten hydrocarbon fractions (SARA).

INDICE

	Página
CONSTANCIA DE APROBACIÓN	iii
RESUMEN	iv
INDICE GENERAL	v
INDICE DE FIGURAS	vii
INTRODUCCION	1
CAPÍTULO I	3
Planteamiento del problema	3
Interrogantes de la investigación	6
Justificación de la investigación	6
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
HIPÓTESIS	8
Definición de hipótesis	8
CAPÍTULO II	9
MARCO REFERENCIAL	9
Antecedentes de la investigación	9
Bases teóricas	11
Hidrocarburos	11
Composición del petróleo	14
Características determinantes de los hidrocarburos en el ambiente	16
Hidrocarburos en el suelo	20
Naturaleza y Propiedades del Suelo	23
Parámetros ambientales que afectan a los contaminantes	27
Transporte y Transformación de los Contaminantes en el Suelo	27
Biorremediación	31
Las tecnologías de biorremediación	32
Biodegradación del petróleo	34
Suelos contaminados e intemperizados y biodisponibilidad	39
Adición de surfactantes y biosurfactantes	40
Medición de la biodegradación de HTP	41
Tolueno	41
CAPÍTULO III	49
METODOLOGÍA	49
Modalidad del Trabajo de Grado	49
Tipo y diseño de la investigación	49

FUENTES Y TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	50
Reactivos	51
Medios de cultivo	51
CONSORCIO MICROBIANO	52
Obtención y conservación	52
Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	52
Realización de pases de enriquecimiento bacteriano	52
Concentración de bacterias	52
Caracterización del suelo intemperizado	53
Unidad experimental	54
Unidad experimental de Bioaumentación autóctona	54
Unidad experimental de Bioestimulación	54
Unidad experimental de Bioaumentación alóctona	55
Unidad experimental de Control	55
Unidad experimental de Biosurfactante	55
Determinación de Grasas y Aceites y HTP	56
Cuantificación de HTP por gravimetría	57
Métodos Analíticos	57
pH del suelo	57
Determinación de humedad	58
Cuenta microbiana	59
Caracterización de los HTP mediante Separación S.A.R.A.	59
Cuantificación de asfaltenos:	59
Obtención de fracciones Saturadas:	60
Obtención de fracciones Aromáticas:	61
Obtención de Resinas:	61
Análisis de Placas Líticas	61
Fases de la investigación	62
CAPÍTULO IV	64
RESULTADO Y DISCUSIÓN	64
Caracterización del suelo desde el punto de vista de humedad	
Aplicación de la técnica de cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo en un suelo intemperizado	64
Seguimiento de la degradación de HTP en las unidades experimentales.	65
Seguimiento de las fracciones S.A.R.A. en las unidades experimentales.	73
Seguimiento del crecimiento de UFC en las unidades experimentales.	77
CAPÍTULO V	85
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	85
Conclusiones	85
Sumario de Contribuciones	86
Recomendaciones	86
GLOSARIO	88
BIBLIOGRAFÍA	97
ANEXOS	102

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

		Página
FIGURA 1	MODELOS TRIDIMENSIONALES PARA LOS ASFALTENOS, MODELO BIDIMENSIONAL	16
TABLA 1	PARÁMETROS DEL COMPUESTO QUÍMICO, SUELO Y AMBIENTE QUE INFLUYEN EN EL TRANSPORTE A TRAVÉS DEL SUELO	20
TABLA 2	GÉNEROS MÁS COMUNES DE LEVADURAS, HONGOS Y BACTERIAS QUE TIENEN LA CAPACIDAD DEGRADADORA DEL PETRÓLEO	35
FIGURA 2	OXIDACIÓN DE HIDROCARBUROS DE CADENA LARGA	36
FIGURA 3	OXIDACIÓN DE HIDROCARBUROS DE CADENA CORTA	37
FIGURA 4	CATECOL, PROTOCATECUATO Y GENTISATO	38
FIGURA 5	CENTRIFUGADORA MARCA BECKMAN	53
FIGURA 6	TIPOS DE TIERRA: BAJO, MEDIO Y ALTO IMPACTO DE PETRÓLEO	54
FIGURA 7	FOTO DE MONTAJE DE UNIDADES EXPERIMENTALES	56
FIGURA 8	SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE SOLVENTE PARA HTP	57
FIGURA 9	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS TIEMPOS MUESTRALES	63
TABLA 3	PORCENTAJE DE HUMEDAD PROMEDIO EN LA TIERRA	64
TABLA 4	PORCENTAJE DE HTP EN LA TIERRA: BAJO, MEDIO Y ALTO IMPACTO DE PETRÓLEO OBTENIDO POR GRAVIMETRÍA.	65
TABLA 5	PORCENTAJE DE HTP EN LA TIERRA: BAJO, MEDIO Y ALTO IMPACTO DE PETRÓLEO	65

	OBTENIDO POR EXTRACCIÓN LIQ-LIQ.	
TABLA 6	CANTIDAD DE TIERRA POR UNIDAD EXPERIMENTAL	65
TABLA 7	ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LAS MUESTRAS PRINCIPALES Y DUPLICADOS	66
TABLA 8	ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	67
TABLA 9	ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES BIOSURFACTANTE Y BIOAUMENTACIÓN ALÓCTONA	67
TABLA 10	PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE CRUDO EN CADA UNIDAD EXPERIMENTAL	67
FIGURA 10	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN HTP TOTAL EN UNIDAD EXPERIMENTAL DE CONTROL EN EL TIEMPO	68
FIGURA 11	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN HTP TOTAL EN CADA UNIDAD EXPERIMENTAL EN EL TIEMPO	69
FIGURA 12	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN HTP NETA EN CADA UNIDAD EXPERIMENTAL EN EL TIEMPO	72
FIGURA 13	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN OBSERVADA EN LAS FRACCIONES S.A.R.A. DE HIDROCARBUROS EN LAS UNIDADES DE EXPERIMENTALES.	73
FIGURA 14	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN OBSERVADA	75

	EN LAS FRACCIONES S.A.R.A. DE HIDROCARBUROS EN LAS UNIDADES DE EXPERIMENTALES.	
TABLA 11	COMPARACIÓN DE LOS PORCENTAJES DE DEGRADACIÓN EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	76
FIGURA 15	FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DEL CONTROL	77
FIGURA 16	FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DE BIOESTIMULACION	78
FIGURA 17	FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DE BIOAUMENTACION AUTOCTONA	78
FIGURA 18	FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DE BIOAUMENTACION ALOPTONA	79
FIGURA 19	FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DE BIOSURFACTANTE	79
FIGURA 20	REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL CONTEO DE UFC EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	80
FIGURA 21	AMPLIACIÓN DE LA REGIÓN MÁS IMPORTANTE DE LA REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL CONTEO DE UFC EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES (FIG. 20)	81
TABLA 12	TITULOS DEL CRECIMIENTOS DE CADA UNA DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	83

INTRODUCCIÓN

La demanda de petróleo a escala mundial es de aproximadamente 75 millones de barriles por día con un crecimiento inter-anual estimado, entre 1.5 y 2 %.

El crecimiento progresivo de la demanda de petróleo trae consigo la expansión de las superficies de la tierra bajo la influencia de la actividad petrolera y como consecuencia un incremento de los riesgos de deterioro del ambiente y de las comunidades humanas aledañas.

La industria petrolera es la actividad económica más importante de Venezuela. Gran proporción de la superficie del país se encuentra afectada de una u otra forma por los diferentes procesos que genera la actividad petrolera tales como: exploración, explotación, producción, refinación y transporte.

Los derrames de petróleo generan problemas ambientales como la contaminación de aguas y suelos, daños a la vegetación y a la fauna asociada. Otros problemas son pérdidas económicas debido a daño a la actividad agropecuaria e industrial, así como el riesgo de afectar la salud humana.

Debido a ello se han planteado numerosas técnicas para la recuperación de estos innumerables espacios que se encuentran sin uso, debido a la contaminación presente. Entre esas técnicas se encuentra la biodegradación, la cual es una técnica innovadora y adecuada para este tipo de problemas ya que los efectos secundarios sobre el ambiente son mínimos ó casi nulos a diferencia de otros tratamientos como lo es el tratamiento químico.

La biorremediación es una técnica muy segura, ya que depende de microorganismos que existen normalmente en los suelos. Esos microorganismos son útiles y no representan un peligro para las personas en el sitio o la comunidad. Además, no se emplean sustancias químicas peligrosas. Los nutrientes que se añaden

para que las bacterias crezcan son fertilizantes de uso corriente en el césped o el jardín. La biorremediación transforma las sustancias químicas dañinas en agua y gases inofensivos en la mayoría de los casos y, por lo tanto, las destruye totalmente.

Como principales ventajas de esta técnica se pueden indicar las siguientes: Es una técnica *in situ*, lo que evita la necesidad de extraer el suelo, e incluso el contacto de los trabajadores con el suelo o agua contaminados, Evita la liberación de gases dañinos al aire y se generan muy pocos residuos y generalmente esta técnica no requiere tanto equipamiento ni trabajo como la mayoría de los métodos alternativos. Por lo tanto, suele resultar más económica.

El objetivo de este proyecto es el de realizar un estudio comparativo entre las principales vías de biorremediación conocidas las cuales son: Bioaumentación alóctona (utilizando colonias bacterianas activadas para biodegradar solamente y otras colonias activadas para biodegradar y producir biosurfactantes), Bioaumentación autóctona y Bioestimulación.

La bioaumentación alóctona consiste en tomar consorcios bacterianos ajenos al sitio impactado e introducirlos para lograr la limpieza del sitio, la bioaumentación autóctona toma las bacterias autóctonas se inoculan en un ambiente rico hasta aumentar su concentración y posteriormente introducido nuevamente en su ambiente de origen. Por último se tiene la bioestimulación que consiste en que conociendo la existencia de bacterias capaces de tratar las sustancias nocivas del ambiente, se agregan los nutrientes necesarios para aumentar la actividad bacteriana en el sitio a tratar.

CAPÍTULO I

PROBLEMA

Planteamiento del problema

La industria del petróleo es la principal fuente de ingreso para Venezuela y constituye una de las empresas más importantes del mundo, desde la iniciación de la perforación para la búsqueda del petróleo en 1913 (Salas, 1980). El país cuenta con una producción del orden de 2,75 mil millones de barriles diarios (MMBD) de crudo, más de 15.000 yacimientos y 17.000 pozos activos, con una capacidad de refinación de 1,3 MMBD (Gabaidón, 2001).

En Venezuela, la industria petrolera en su conjunto ha tenido un gran impacto negativo en materia ambiental. Por la amplia gama de productos derivados del petróleo, no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los petroquímicos básicos (Duarte, 1995).

En general, los procesos que involucra la industria petrolera a lo largo de su cadena de productiva están constituidos por áreas de prospección, explotación, producción, refinación y procesamiento de gas. Es una de las industrias más importantes del país por el volumen de producción, generación de empleos y necesidades que satisface, entre ellas la obtención de gasolina y lubricantes para la industria y el transporte.

La industria petroquímica surge de la necesidad de obtener una serie de derivados del petróleo, y básicos para otras industrias. Su importancia deriva de la gran variedad de las industrias a las que abastece, entre ellas la de fertilizantes, fibras sintéticas, plásticos, llantas, jabones y detergentes, artículos para el hogar, empaques, etc.

La extracción, transporte y procesamiento del crudo, generan grandes volúmenes de desechos como ripios, lodos petrolizados, aguas de formación y petróleo crudo, constituidos básicamente por compuestos orgánicos aromáticos, poliaromáticos, derivados de hidrocarburos, compuestos inorgánicos y metales, los cuales son difíciles de degradar de manera natural por la complejidad de su estructura y pueden actuar como contaminantes si no se manejan de manera adecuada (Eweis y otros, 1999).

La contaminación se produce como consecuencia de accidentes durante la producción y transporte del petróleo; esta situación ha causado daños ecológicos de gran importancia en el mundo, por lo que recuperación de terrenos y aguas contaminadas se ha convertido en una importante industria en todo el mundo, incluyendo a Venezuela (Levin y Gealt 1997, Eweis y otros, 1999).

Los derrames petroleros causan daños de grandes magnitudes y duraderos a ríos, lagos, estuarios marinos, manglares, pantanos, ciénegas, y orillas. Mientras que los métodos de limpieza manuales pueden ser utilizados en algunos casos, algunos derrames no pueden ser limpiados o controlados manualmente sin destruir el ecosistema de los sitios mencionados anteriormente.

Durante mucho tiempo y hasta hace poco, nadie se preocupaba por el destino de los residuos generados, dando por hecho que la naturaleza limpiaba el ambiente, pero según fue cambiando la naturaleza y composición de los residuos, y al aumentar su cantidad y complejidad, esta capacidad degradativa y amortiguadora empezó a alterarse (Gutiérrez, 1990).

Afortunadamente, en casos de derrames de hidrocarburos o combustibles, la naturaleza tiene la habilidad de limpiarse por sí sola a través de la evaporación, oxidación y la biodegradación natural de hidrocarburos. Estos métodos son de hecho confiados a contratistas encargados de la recolección del residuo.

Durante la primera mitad del siglo XX, se desarrollaron métodos sofisticados para el tratamiento de contaminantes, tales como los lechos bacterianos, lodos activados o la fermentación anaerobia (Eweis y otros, 1999), y desde 1960, se han seguido incluyendo nuevos métodos de aplicación a los terrenos y procesos para la

degradación de determinados tipos de compuestos bajo la categoría de procesos de tratamiento biológico (Ryan y otros, 1991).

En los últimos años, la mayor parte de los estudios publicados se han referido al tratamiento de terrenos contaminados por compuestos derivados del petróleo, utilizando con éxito la biorremediación (Ryan y otros, 1991).

Esta técnica utiliza la capacidad de los microorganismos para transformar compuestos químicos con la finalidad de disminuir o eliminar su toxicidad, y se ha convertido en una alternativa prometedora para la recuperación de suelos contaminados con crudo (Atlas 1981,1984; Bartha 1986, Ryan y otros, 1991). El objetivo de la presente investigación consiste en determinar la biodegradación de Hidrocarburos totales de petróleo (HTP) de suelos contaminados con ripsos de perforación, mediante un consorcio bacteriano, y las técnicas de bioaumentación alóctona, bioaumentación autóctona y bioestimulación.

Sin embargo, la biodegradación natural de los contaminantes, requiere de una serie de factores vitales y condiciones para el crecimiento de la bacteria, así como humedad, nutrientes, oxígeno, temperaturas razonables, pH, etc. En muchos casos, una o varias de estas condiciones no se encuentran presentes, causando por tal razón una biodegradación lenta y pobre. Como resultado, algunos ecosistemas pueden tomar décadas para recuperarse naturalmente de un derrame.

Afortunadamente, muchos derrames de petróleo pueden ser tratados con el fin de optimizar las condiciones favorables de la biodegradación natural, se considera que esto puede lograrse por medio de la aplicación de técnicas de biotratamiento consideradas en este trabajo.

Interrogantes de la investigación

Entre las interrogantes que se planea el investigador están en primer lugar ¿Cuál es la diferencia entre técnicas de remediación de suelos conocidas como bioaumentación autóctona, bioestimulación y bioaumentación alóctona?; de esta interrogante se derivan las siguientes: ¿cómo se aplica la técnica de cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo en un suelo impactado con crudo?; ¿Cómo se selecciona un soporte para la unidad experimental y la cuantificación de la sorción de hidrocarburos totales del petróleo?; y ¿Cuál sería la definición de una unidad experimental para la evaluación de la biodegradación a partir del conteo de hidrocarburos totales del petróleo?

Justificación de la investigación

En Venezuela, al igual que en muchos de los países productores de hidrocarburos, durante los procesos de extracción, refinación, transporte y uso del petróleo, suelen ocurrir accidentes en los cuales pueden producirse derrames que, en la mayoría de los casos, pasan al medio ambiente donde se espera su natural degradación o absorción, lo cual en la mayoría de los casos es insuficiente o imposible por medios naturales. Obviamente, esto representa una problemática que es necesario atender y resolver, debido a que actualmente existen suelos contaminados con petróleo que permanecen largos periodos de tiempo a la intemperie, llamados suelos intemperizados, porque la fracción más volátil del petróleo se evaporó, lo soluble lixivió a suelo más profundo o aguas subterráneas, y lo fácilmente degradable ha sido biodegradado por los microorganismos nativos. De este modo, se genera un suelo que contiene contaminantes más recalcitrantes que los originales, en donde también se presenta una baja biodisponibilidad tanto de contaminantes como de nutrientes (Meléndez, 1994).

Cuando un compuesto ha permanecido por un largo periodo de tiempo en el suelo tiende a migrar hacia los poros y microporos del suelo, sitios a los cuales no tienen acceso los microorganismos.

En este contexto la biodisponibilidad se entiende como la facilidad relativa con la que un compuesto puede ser usado por los microorganismos nativos del suelo y se puede interpretar como la suma del efecto neto entre la desorción y la biodegradación. Así la biodisponibilidad de los compuestos sorbidos es inversamente proporcional a la tasa de desorción. (Meléndez, 1994)

Para que éstos compuestos estén disponibles para los microorganismos (biodisponibles) deben difundir para llegar a la superficie del suelo.

En los suelos intemperizados los problemas difusionales de transferencia de masa llegan a controlar los procesos de biodegradación, es decir, los contaminantes no se encuentran accesibles para los microorganismos nativos para su biodegradación, en otras palabras, el contaminante no esta biodisponible.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Evaluación del potencial de biodegradación del crudo en tierra proveniente de fosas de desecho, empleando diferentes técnicas de aplicación ex situ.

Objetivos específicos

- 1- Caracterización del suelo a tratar en términos de humedad, densidad y cantidad de contaminante contenido.
- 2- Seleccionar técnicas adecuadas para la cuantificación del porcentaje de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo impactado, de acuerdo a criterios como viabilidad económica y de exactitud de resultados.
- 3- Establecer una metodología a seguir, para la evaluación de la biodegradación de crudo en el suelo a través del tiempo.
- 4- Realizar un estudio comparativo entre los resultados obtenidos de cada una de las técnicas de biorremediación aplicadas.

HIPÓTESIS

Definición de hipótesis

Los tratamientos biológicos aumentan la capacidad y disminuyen el tiempo de degradación de los HTP en suelos impactados con hidrocarburos.

CAPÍTULO II

MARCO REFERENCIAL

Antecedentes de la investigación

De acuerdo al estudio realizado por Ercoli, Di Paola, y otros (2001) en el Laboratorio de Bioprocesos de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza en Argentina, titulado “Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo”. En este trabajo se presentan algunos criterios para monitorear y controlar variables de proceso críticas en degradación en sistemas de fase sólida, es decir, en condiciones de contenido de agua libre mínima. Dichos criterios son de aplicación genérica a los diversos métodos de tratamiento biológico en suelo tales como landfarming, acumulación aireada, biorrestauración, etc. La selección de técnicas de muestreo y técnicas analíticas también resulta de fundamental importancia, pues los sistemas en fase sólida son sistemas intrínsecamente heterogéneos y por tanto no siempre fáciles de evaluar. La experiencia realizada en tratamiento de diversos tipos de residuos de hidrocarburos en suelos distintos, bajo condiciones climáticas muy variadas, nos permite presentar algunos criterios de carácter general. El *tratamiento biológico de suelos* contaminados involucra el uso de microorganismos y/o vegetales para la degradación de los contaminantes orgánicos. La actividad biológica altera la estructura molecular del contaminante y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. Los *parámetros críticos* a considerar en un tratamiento biológico son: tipo y concentración de contaminante, concentración de microorganismos, concentración de nutrientes, aireación, condiciones macroambientales, presencia de inhibidores y biodisponibilidad del contaminante.

En el estudio de Lopolito, Molina, Corbella y otros (1996) titulado “Biodegradación de hidrocarburos de petróleo y compuestos relacionados”, cuyo

objetivo fue encontrar herramientas que permitan aumentar la velocidad de biodegradación de este tipo de compuestos, por ejemplo, a partir de la generación de biomasa aclimatada a sustratos relacionados relativamente fáciles de biodegradar. Los investigadores establecen que con la finalidad de degradar hidrocarburos se llevaron a cabo ensayos de biodegradación, empleado diferentes sustratos orgánicos (crudo de petróleo, kerosén, aceite lubricante y benceno). Se ensayaron tres inóculos diferentes desarrollados a partir de una muestra de agua superficial con alto grado de contaminación, y reactores por lotes (batch) alimentados con crudo de petróleo y aceite lubricante para vehículos. Como nutrientes se utilizaron medio mínimo, salino (MM) y fertilizante foliar comercial. Los ensayos se realizaron en fiolas tipo erlenmeyers de 1000 ml., con agitación continua y en condiciones de esterilidad, de manera tal que sólo pudieran desarrollarse aquellos microorganismos con capacidad para utilizar los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía. La biodegradación fue evaluada a través de la estimación de la biomasa microbiana (recuento de bacterias viables en placa y consumo de oxígeno) y la concentración de hidrocarburos totales en la fase disuelta (DQO y lectura infrarrojo). Proteínas totales e hidratos de carbono se determinaron con el fin de observar la posible liberación de biosurfactantes. Entre los resultados obtenidos se tiene que:

- Los ensayos realizados permitieron afirmar que los microorganismos capaces de degradar estos compuestos, estarían presentes en el mismo sustrato, pero en cantidades mínimas, por lo que el proceso de degradación comenzaría en el caso del aceite, dos o tres semanas después de iniciado el ensayo, y en el kerosén, una semana después.
- Los resultados obtenidos indicarían que la inoculación previa aceleraría el proceso de biodegradación, tanto para el aceite como para el kerosén.
- En los sistemas inoculados, el 'plateau' (fase estacionaria) correspondiente a la biomasa se alcanza más rápidamente, y la concentración de microorganismos, medidos como UFC/ml., es de dos a tres órdenes de magnitud mayor que en los sistemas sin inocular.

- Se observó que la concentración de hidrocarburos totales en la fase acuosa aumenta con el tiempo de incubación. Esto ocurriría por la liberación a la fase acuosa de surfactantes generados por los microorganismos presentes en el sistema. Estos surfactantes no serían de naturaleza protéica, dado que se obtuvieron resultados negativos aplicando el método de Lowry.
- La presencia de hidratos de carbono, medidos con la técnica de Antrona, indicaría la posibilidad de que estos compuestos sean los responsables del aumento de la solubilidad de los hidrocarburos en la fase líquida.
- Los primeros resultados de los ensayos respirométricos, indicarían que en el agregado de estos microorganismos permitirían aumentar la velocidad de degradación del benceno.

Bases teóricas

Hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno, de gran abundancia en la naturaleza, presentes principalmente en el petróleo (PDVSA, 1988).

Se considera a los hidrocarburos de petróleo como una mezcla líquida compleja de gases, líquidos y sólidos, existiendo pequeñas cantidades de mezclas de nitrógeno, oxígeno y azufre, además de contener compuestos de hierro, níquel, vanadio y otros metales (INTEVEP, 1998).

De manera general, el petróleo tiene una proporción de 76 a 86 por ciento de carbono, e hidrógeno de 10 a 14 por ciento. Los hidrocarburos se clasifican de la siguiente forma:

1. Hidrocarburos Biogénicos

Estos son sintetizados por casi todas las plantas, animales terrestres y marinos, incluyendo la microbiota, bacterias, plancton marino, diatomeas, algas y plantas superiores (Bedair y AlSaad, 1992). La síntesis de este tipo de hidrocarburos está controlada por rutas metabólicas, lo cual trae como resultado

mezclas de compuestos de limitada complejidad estructural relacionada directamente con la función biológica específica.

Las características de los hidrocarburos biogénicos son (Bedair y AlSaad, 1992):

- Los formados recientemente exhiben un alto nivel de n-alcenos de número impar
- Los aportes por detritus de plantas terrígenas se caracterizan por n-alcenos de número impar en la región de $C_{23} - C_{33}$
- Los aportes de origen marino se ven marcados por la presencia de los alcanos C_{15} , C_{17} y C_{19}
- Las contribuciones biogénicas notan el predominio del isoprenoide pristano.
- Compuestos de tipo aromático no se presentan frecuentemente o al menos en proporciones significativas.

Los hidrocarburos biogénicos pueden ser biosintetizados por los organismos o bien pueden ser ingeridos con el alimento y alterados después de su ingestión. El fitano y el pristano son compuestos que se encuentran comúnmente en el petróleo, en los organismos sólo se conoce el pristano que al parecer ingresa con el alimento. (Padilla, 1989)

La formación de compuestos aromáticos y alifáticos de bajo peso molecular es dada conforme al tiempo de la descomposición de la materia orgánica, estos compuestos pueden ser condensados para dar lugar a sustancias de mayor peso molecular como lo explican Blumer y Youngblood (1975) como parte de la teoría de la biosíntesis confirmada por un gran número de compuestos de bajo peso molecular que es un buen indicador de la presencia microbiana en el suelo.

2. *Hidrocarburos Antrópicos*

Son aquellos que son introducidos como resultado de cualquier tipo de actividad humana. Los procesos de combustión industrial que contribuyen con niveles mucho más altos debido principalmente al humo generado por carbón, combustibles fósiles y petróleo refinado, las descargas de aguas municipales, las actividades de transporte y los derrames son algunas de las principales fuentes de estos contaminantes. (Bidleman y otros, 1990)

3. *Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP)*

Los HAP's constituyen contaminantes orgánicos relacionados con las actividades humanas (principal fuente de introducción a los ecosistemas intervenidos) y la quema natural de bosques. Los compuestos que más conciernen de los hidrocarburos del petróleo y de la pirólisis de combustibles son los hidrocarburos aromáticos policíclicos, sus homólogos alquil y los HAP's sustituidos con sulfuro o nitrógeno. Muchos de esos compuestos son estables y altamente tóxicos, algunos son potentes carcinógenos y otros mutagénicos. Se ha reportado que los HAP's son producidos a altas temperaturas de 400 á 500°C, mientras los homólogos alquil sustituidos se producen a bajas temperaturas de 100 a 150° C. (Lesser, 1995)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) están formados por dos o más anillos de benceno fusionados, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático. (Lesser, 1995)

Según Lesser (1995) hay dos clases de hidrocarburos aromáticos:

- Los de bajo peso molecular que tienen de 2 a 3 anillos aromáticos como el naftaleno, fluoreno, fenantreno y antraceno y derivados,
- Los de alto peso molecular que tienen de 4 a 7 anillos aromáticos como el criseno. Sus características físicas y químicas varían de acuerdo a su peso molecular y, en consecuencia, en su distribución y conducta del ambiente, lo mismo sus efectos en los sistemas biológicos.

De acuerdo a Menzie y otros (1992) la importancia de los HAP's está relacionada a su movilidad, debido a su peso molecular, presentándose en un

intervalo de 128,16 á 300,36 u.m.a. para el naftaleno y coroneno, respectivamente. Los HAP's de alto peso molecular son relativamente inmóviles y, por ende, de baja volatilidad y solubilidad. Dieciséis HAP's (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoreno, benzo(k)fluoreno, benzo(a)pireno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(ah)antraceno y benzo(ghi)perileno) son considerados como contaminantes prioritarios por EPA, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Comunidad Económica Europea (CEE) debido a sus efectos carcinogénicos.

Estos compuestos se encuentran distribuidos en el suelo, mar, sistemas fluviales y sedimentos, su presencia se ha atribuido principalmente a los derrames de petróleo y descargas de plantas petroquímicas, aún cuando también se puede deber al transporte atmosférico por los aportes de la combustión (Padilla, 1989).

Composición del petróleo

La proporción y composición del petróleo varía de acuerdo a su origen, almacenamiento, refinación y su alteración por las condiciones ambientales. Los compuestos que se obtienen al fraccionar el petróleo crudo ó hidrocarburos totales del petróleo (HTP), pueden clasificarse en cuatro principales grupos de acuerdo a su solubilidad en disolventes orgánicos: alifáticos, aromáticos, polares ó resinas y asfaltenos (Blumer, 1975).

En suelos intemperizados, los hidrocarburos alifáticos incluyen alcanos ramificados (parafinas) y de cadena lineal, además de cicloalcanos con diferente número de anillos y cadenas laterales (Blumer, 1975). Estos compuestos son predominantes en un 40-60 por ciento del total de los hidrocarburos. Los hidrocarburos aromáticos sencillos, son compuestos como el Tolueno, benceno, xileno, naftaleno y bifenilos. Los aromáticos tri y policíclicos, presentes en menor cantidad son: fenantreno, antraceno, criseno benzofluoreno y pireno, los cuales en

total representan entre el 20 y 45 por ciento del total de los hidrocarburos. Los compuestos polares de bajo peso molecular se forman como consecuencia de la degradación microbiana de compuestos alifáticos y aromáticos (Blumer, 1975); en los productos de la biodegradación se han identificado principalmente cetonas y ésteres, además de cicloalcanos y aromáticos (Riis y otros; 1996). Las resinas y los asfaltenos están formados por la fracción policíclica, de alto peso molecular, de los crudos en los que se incluyen átomos de N, S y O; constituyen los extremos pesados del petróleo de alto peso molecular de las series aromáticas, que representan del 10 al 30 por ciento de los hidrocarburos en suelos intemperizados.

Hinchee (1991) reportó que los hidrocarburos poliaromáticos están presentes en mezclas de hidrocarburos pesados y particularmente en el chapopote. Estos compuestos son insolubles en agua y se adsorben fuertemente a los sólidos.

Mansoori (1992) reportó que el grupo de los asfaltenos constituye la fracción más pesada en el petróleo y se define como el grupo de compuestos que precipita en presencia de un alcano de punto de ebullición bajo como el n-pentano. Hay una relación íntima entre los asfaltenos, resinas y los hidrocarburos policíclicos de alto peso molecular. Se supone que los asfaltenos se forman como resultado de la oxidación de las resinas naturales. Algunas de las propiedades químicas de los asfaltenos incluyen: (i) su hidrogenación produce hidrocarburos poliheterocíclicos aromáticos (hidrocarburos policíclicos aromáticos con átomos de Oxígeno y azufre en cantidades variadas); (ii) un calentamiento por encima de 300-400°C, los descompone, formando carbono y productos volátiles; (iii) la reacción con ácido sulfúrico forma ácido sulfónico, como podría esperarse basándose en su estructura poliaromática.

Se han realizado esfuerzos considerables para caracterizar las moléculas que constituyen al grupo de los asfaltenos mediante estudios de estructura química, y análisis elemental. (Espinat, 1993; Mansoori, 1996)

Mansoori (1996) ha intentado postular una estructura modelo basándose en métodos físicos y químicos. En la Figura 1 se muestran las estructuras propuestas para este tipo de compuestos.

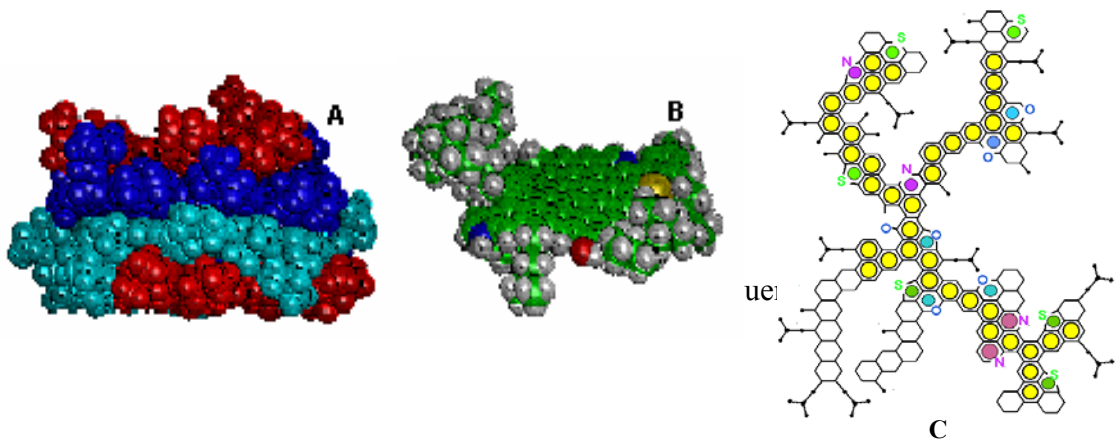


FIGURA 1. MODELOS TRIDIMENSIONALES PARA LOS ASFALTENOS (A Y B), MODELO BIDIMENSIONAL (C)

Fuente: Mansoori (1996), p143.

Debido a su complejidad, los asfaltenos, con mucha certeza, son una fracción no biodegradable de los contaminantes en suelos intemperizados (Medina, 1999) y esto explica que frecuentemente se encuentra una cantidad elevada de asfaltenos en los suelos intemperizados (Abelson, 1989).

Características determinantes de los hidrocarburos en el ambiente

- 1) *Densidad*: Se define como la relación entre la masa y una unidad de volumen determinado para una sustancia en particular (Chapín y Summerlin, 1988). Los compuestos orgánicos se clasifican en dos grupos: Compuestos orgánicos ligeros: son aquellos cuya densidad es menor que la del agua. Compuestos orgánicos densos: son aquellos que poseen una densidad mayor a la del agua.
- 2) *Polaridad*: Se refiere a la existencia o no de una distribución equitativa de las nubes electrónicas que forman varios enlaces. Si no es equitativa, una parte de la molécula será más positiva y la otra será más negativa. Por tanto, la molécula se

comporta como un dipolo o que es una molécula polar. (Chapín y Summerlin, 1988).

- Por otra parte, si las nubes electrónicas están igualmente distribuidas, decimos que la molécula es no polar. La polaridad depende de la electronegatividad de los átomos y la forma de la molécula, si no hay diferencia de electronegatividad de los átomos la molécula será no polar. Todos los compuestos orgánicos contienen carbono y la mayoría también hidrógeno, debido que existe una leve diferencia en electronegatividad entre el carbono y el hidrógeno; la mayoría de los compuestos son no polares (Chapín y Summerlin, 1988).
- De acuerdo a McBride (1994), los hidrocarburos alifáticos son compuestos no polares y son, por lo tanto, pobres competidores con el agua. Los hidrocarburos aromáticos, son compuestos no polares o muy débilmente polares como los alifáticos. Se ha determinado que compuestos no polares o débilmente polares tienen afinidad por las fases orgánicas hidrofóbicas en ácido húmico siendo las fuerzas de Van der Waals o la atracción hidrofóbica como unión de enlace.

3) *Hidrofobicidad*: Se refiere a la poca afinidad de los compuestos orgánicos al agua como es el caso de los hidrocarburos del petróleo. El comportamiento resultante es una baja solubilidad de las moléculas no polares y aquellas débilmente polares que tienen una mayor afinidad de reaccionar con la materia orgánica a través de las interacciones de Van der Waals. (Chapín y Summerlin, 1988)

4) *Solubilidad al agua*: Es la característica química más importante usada para asegurar: (a) movilidad química; (b) estabilidad química; (c) acumulación química, (d) bio-acumulación química y (e) Sorción química en el ambiente. (Chapín y Summerlin, 1988)

i) Las características de la solubilidad son (Ney, 1990):

- La alta solubilidad al agua de un compuesto químico promueve su mayor movilidad, y es menos probable a ser acumulativo, bio-acumulativo, volátil y

persistente; un compuesto químico altamente soluble es propenso a ser biodegradado y metabolizado por los microorganismos.

- Un contaminante químico poco soluble en agua es más probable de ser inmovilizado por vía adsorción y es menos móvil, más acumulativo o bioacumulativo, persistente en los compartimentos ambientales y ligeramente propenso a biodegradarse y puede ser metabolizado por plantas y animales.

- Los valores numéricos de la solubilidad son los siguientes:

- Solubilidad baja < de 10 ppm
- Solubilidad media entre 10 y 1000 ppm
- Solubilidad alta >1000 ppm

5) *Coefficiente de partición agua octanol*: Expresa la relación de concentraciones en equilibrio de un químico en las fases de octanol y agua. Es un indicador de la bioacumulación o potencial bioconcentración de un compuesto químico en el tejido graso de los organismos. El coeficiente es un indicador de la solubilidad al agua, movilidad, sorción y bioacumulación. Su valor se describe de la siguiente forma (Ney, 1990).:

- Alto coeficiente, significa mayor afinidad de bioacumularse / bioconcentrarse en la cadena alimenticia, mayor su potencial de sorción en suelo y baja su movilidad además de significar una baja solubilidad en agua.
- Bajo coeficiente, significa menor afinidad química a bioacumularse, mayor su potencial de movilidad, mayor solubilidad y mayor su potencial a biodegradarse y poder ser metabolizado.

Los valores numéricos para este parámetro (Kow) son los siguientes:

- a) Un coeficiente menor de 500 puede ser indicativo de una alta solubilidad al agua, movilidad, poco o nada de bioacumulación o acumulación y degradabilidad por microbios, plantas y animales.
- b) Un coeficiente mayor de 1000 es indicativo de la baja solubilidad, inmovilidad, no biodegradabilidad y es un químico que es bioacumulativo, acumulativo, persistente y adsorbido al suelo.

6) *Presión de Vapor*: En el caso de los HAP's de bajo peso molecular (2 anillos) su valor es de 10^{-4} atm indicativo de ser volátiles al ambiente, y los de alto peso molecular (>5 anillos) con un valor de 10^{-13} atm, tienden a quedar en suelo dado su peso molecular. Los alifáticos con un peso molecular bajo (C_5H_{12}) con un valor de 1 atm y los de peso molecular alto ($C_{18}H_{36}$) con un valor de 10^{-7} atm. Para los compuestos orgánicos como es el caso de los hidrocarburos estos se pueden manifestar de la siguiente manera (Ney, 1990).:

- Un compuesto químico con una presión de vapor baja, alta capacidad de adsorción o alta solubilidad al agua es menos probable a volatilizarse (principalmente compuestos orgánicos de alto peso molecular).
- Un compuesto químico con una presión de vapor alta, baja capacidad de adsorción o baja solubilidad al agua es más probable a volatilizarse.

7) *Coefficiente de partición en suelo*: Es frecuentemente interpretado como una medida de la contribución de las fuerzas hidrofóbicas para la sorción. Esto es preciso para compuestos altamente no polares, y puede no ser preciso para especies polares. El K_{oc} puede ser calculado de otras propiedades del compuesto químico como la solubilidad al agua, el coeficiente de partición agua octanol (K_{ow}) y de la estructura molecular del compuesto. El contenido de materia orgánica del suelo o sedimento es importante en la adsorción de los contaminantes orgánicos (Ney, 1990).

- En los sistemas de agua-suelo/sedimento, donde el contenido de materia orgánica es significativa, la adsorción de los contaminantes orgánicos no polares ocurre principalmente por partición dentro de la materia orgánica. De acuerdo al coeficiente de distribución agua-suelo/sedimento (K_d) de contaminantes no polares es fuertemente dependiente del contenido de materia orgánica del suelo o sedimento (f_{om}) o alternativamente del contenido de carbón orgánico del suelo/sedimento (f_{oc}) (Chiou y otros, 1998). Expresando la siguiente relación:

$$K_{oc} = K_d / f_{oc}$$

Hidrocarburos en el suelo

El comportamiento de los contaminantes orgánicos está en función de sus características físicas y químicas (densidad, solubilidad, polaridad, entre otras), además de las características del medio como son la unidad de suelo, permeabilidad, estructura, tamaño de las partículas, contenido de humedad y de materia orgánica, así como la profundidad del manto freático. Factores climatológicos como la temperatura y la precipitación pluvial también tienen una gran influencia. Todas las variables en su conjunto definen el tamaño y la distribución tridimensional del frente de contaminación en una zona específica (Jury, 1989) (Véase Tabla 1).

TABLA 1. PARÁMETROS DEL COMPUESTO QUÍMICO, SUELO Y AMBIENTE QUE INFLUYEN EN EL TRANSPORTE A TRAVÉS DEL SUELO

Parámetros del Contaminante	Parámetros del Suelo	Parámetros Ambientales
Solubilidad	Contenido y retención de agua	Temperatura
Presión de vapor	Porosidad, densidad y permeabilidad	Precipitación
Número y tipo de grupos funcionales	Contenido de arcilla	Evapotranspiración
Polaridad	Contenido de materia orgánica	

	Profundidad de agua subterránea	
--	------------------------------------	--

Fuente: Jury (1989)

Los compuestos orgánicos ligeros como las gasolinas, aceites y petróleo crudo tienden a formar una capa en forma de nata en el nivel freático y se mueven horizontalmente en dirección al flujo del agua subterránea. Los compuestos orgánicos densos, migran hacia la base del acuífero creando una columna a partir de la cual pueden moverse en dirección al flujo de agua subterránea, contaminando así el acuífero en toda su profundidad. (Barcelona y otros, 1990)

Para la zona superficial se han conceptualizado algunas relaciones con respecto al suelo y la presencia de contaminantes, a través de observaciones indirectas de acumulación de los contaminantes orgánicos en asociación con adsorbentes naturales (Luthy y otros, 1997), estableciendo los siguientes procesos:

- 1) Absorción a la materia orgánica amorfa o natural o en Líquidos de la Fase No Acuosa (LFNA) como es el caso del petróleo.
- 2) Absorción a la materia orgánica condensada o en polímeros o residuos de combustión.
- 3) Adsorción a superficies orgánicas húmedas (hollín).
- 4) Adsorción en superficies minerales (cuarzo).
- 5) Adsorción dentro de los microporos o en minerales microporosos (zeolitas) con superficies porosas a saturación de agua < 100 por ciento.

Las interacciones del geosorbente con los contaminantes orgánicos hidrofóbicos son de tres tipos principalmente (Luthy y otros, 1997):

- a) El mineral con su superficie reactiva atribuible a:
 - a. Superficies minerales externas expuestas a la escala de la partícula y superficies dentro de los macroporos;
 - b. Superficies interlaminares de arcillas expandibles a una escala de nanómetros;
 - c. Superficies dentro de los mesoporos y microporos.

- b) La materia orgánica del suelo a una escala de nanómetros.
- c) Los LFNA adheridos o atrapados que pueden funcionar como materia orgánica, excepto para material altamente intemperizado o películas interfaciales.

Las propiedades físicas del suelo más afectadas por derrames de hidrocarburos son:

- La estructura del suelo debido a la ruptura de los agregados
- Aumento de la retención del agua en la capa superficial.
- El potencial hídrico.

Probablemente el componente más importante del suelo en relación con la persistencia de sustancias tóxicas es la arcilla. La persistencia aumenta cuantas más pequeñas son las partículas debido a que aportan una gran área superficial para la absorción de los productos químicos.

Las propiedades químicas del suelo más afectadas por un derrame de hidrocarburos son:

- Aumento del carbono orgánico ya que el 75 % del carbono del petróleo crudo es oxidable.
- Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos.
- Aumento del manganeso y hierro intercambiable.
- Aumento del fósforo disponible.
- Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el ambiente dependerán de:
 - La cantidad y composición del petróleo
 - La frecuencia y tiempo de exposición
 - El estado físico del derrame.
 - Las características del sitio donde sucedió el derrame.
 - Variables ambientales como temperatura, humedad y oxígeno.
 - El uso de dispersantes químicos (está restringido su uso).
 - La sensibilidad de la biota específica del ecosistema impactado.

Naturaleza y Propiedades del Suelo

Los hidrocarburos se pueden encontrar de la siguiente forma en el suelo: líquida, soluble en el agua del suelo, adsorbidos por el suelo y en la atmósfera edáfica (Lesser, 1995).

Las propiedades y condiciones que afectan la migración, retención y transformación de compuestos orgánicos en el suelo son (Lesser, 1995):

a) *Materia Orgánica*. Se ha correlacionado positivamente con la adsorción de compuestos orgánicos en numerosos estudios. Un efecto inmediato del aumento de este parámetro es el incremento de los sitios de adsorción, disminuyendo la concentración en la fase acuosa y gaseosa del contaminante orgánico como también su transporte y su biodisponibilidad.

La adsorción es afectada por dos factores: la hidrofobicidad del contaminante (es la dificultad para disolverse en agua) y la fracción de la materia orgánica en el suelo (contenido de carbono orgánico). Muchos de los compuestos hidrofóbicos pueden ser altamente adsorbidos, de acuerdo a varios estudios de campo (Mackay y otros, 1985).

Los mecanismos de enlace de hidrógeno y la interacción ión dipolo no son operativos para las moléculas no polares. La adsorción de las moléculas no polares puede ocurrir en la materia orgánica, aunque hay debate acerca de la naturaleza del proceso (Fränzle, 1993).

Las moléculas no polares o débilmente polares tienen una gran afinidad por fases orgánicas hidrofóbicas en ácidos húmicos con fuerzas de atracción débil (Van der Waals) o bien una atracción hidrofóbica y para aquellas polares sin carga demuestran una afinidad por grupos polares húmicos, sitios de coordinación de metales multivalentes en coloides, superficies minerales con grupos Si-O-Si a través de fuerzas dipolo-dipolo y ion-dipolo (ligeramente fuerte a débil) (McBride, 1994).

Este comportamiento es debido a que las moléculas no polares, tienen una mayor atracción hacia la materia orgánica que hacia las superficies de los minerales, siendo la existencia de las superficies hidrofóbicas (organofílicas) o

enlaces dentro de la matriz orgánica las que favorecen el fenómeno de atracción hidrofóbica, siendo la atracción entre la superficie y el adsorbente en un solvente debido a la interacción de atracción disolvente-adsorbente que es más débil que la interacción disolvente-disolvente, explicando la "afinidad" de las moléculas no polares orgánicas hacia el humus. Una vez que el agua es el disolvente en el suelo, la atracción hidrofóbica llega a ser una fuerza conductora de la absorción, si el adsorbente orgánico tiene una baja afinidad por el agua (Murray, 1994).

Las sustancias húmicas pueden afectar el destino de los compuestos químicos orgánicos en varias vías que incluyen la adsorción y partición, solubilización, degradación por hidrólisis y fotodescomposición, fundamentales en el destino del contaminante químico y, subsecuentemente, en la transferencia a aguas subterráneas. (Murray, 1994).

- b) *Contenido de agua.* Tiene gran influencia en el transporte de difusión líquida o gaseosa. Para la difusión líquida el transporte aumenta con el contenido de agua debido a su trayectoria en los espacios porosos reemplazando el aire contenido; inversamente, la difusión de vapor disminuye con el contenido de agua. Cuando el contenido de agua disminuye a un bajo porcentaje (ocurriendo en la superficie del suelo durante una intensa sequía) las moléculas que ocupaban los sitios de adsorción son desplazadas y la capacidad de adsorción química aumenta considerablemente causando que las concentraciones líquida y gaseosa disminuyan reduciendo el mecanismo de transporte líquido y gaseoso. Sin embargo, este efecto de adsorción es reversible cuando la superficie vuelve a rehumedecerse (EPA, 1983).

Para el caso de hidrocarburos alifáticos no polares son definidos como pobres competidores con el agua en los sitios de adsorción en el complejo de intercambio. Cuando éstos son retenidos, el fenómeno presente es por las fuerzas de Van der Waals, predominante en las superficies de los minerales arcillosos. Las moléculas de un material dado pueden adsorberse de la fase gaseosa o líquida al sólido por fuerzas de Van der Waals, este proceso es

llamado adsorción física y puede alcanzar el equilibrio en un tiempo limitado, principalmente por las velocidades de difusión molecular. Las fuerzas de Van der Waals (y de London) son fuerzas intermoleculares relativamente débiles que sostienen líquidos o cristales de hidrocarburos, agua y alcoholes, entre otros (Fränze, 1993).

El agua es un medio de transporte en dirección horizontal y vertical, principalmente, para sustancias menos adsorbentes y más polares como es el caso de los alcoholes seguido por los aromáticos y finalmente los alifáticos (Tölgyessy, 1993).

- c) *Textura del suelo.* La lixiviación en texturas gruesas (suelos arenosos y grava) es más rápida que en texturas finas (suelos arcillosos), con mayor capacidad de retener los contaminantes y prevenir su alcance a aguas subterráneas. Además, otros parámetros dinámicos como permeabilidad, conductividad hidráulica y espacio poroso son dependientes de la textura. (Jury, 1989)

El contenido de arcilla está correlacionado con la capacidad de campo, área superficial específica, capacidad de intercambio catiónico influyendo en la adsorción de iones. Para compuestos orgánicos no polares, generalmente no existe correlación entre el contenido de arcilla y la adsorción (Jury, 1989).

Los aspectos específicos de la contaminación pueden presentarse en: a) formación de películas superficiales y emulsiones, y b) solubilidad en el agua de ciertos productos. Los problemas asociados con las películas superficiales son minimizados debido a la capacidad del material del subsuelo en adsorber y absorber una cantidad del producto. Sin embargo, este fenómeno magnifica los problemas asociados con los componentes solubles de los productos una vez que los hidrocarburos retenidos están sujetos a la lixiviación (Testa, 1994).

- d) *Profundidad de la capa freática.* Determina el tiempo y espacio para la retención y degradación del contaminante previo a su penetración dentro del acuífero, dado por las propiedades de retención del perfil del suelo. (Testa, 1994).

Se ha demostrado experimentalmente y teóricamente que en suelos de textura fina, el agua (y flujos de masa de compuestos orgánicos) pueden ascender desde grandes profundidades en comparación con los suelos arenosos. La profundidad puede influir en la extensión del flujo de agua ascendente hacia la capa superficial que se ha evaporado sin ninguna entrada de agua por un período dado. También afecta el tiempo de viaje de un compuesto lixiviado de la superficie a aguas subterráneas, siendo ésta una influencia indirecta en el transporte. (Testa, 1994).

- e) *Estructura del suelo.* Es una característica importante; se pueden presentar fisuras, grietas o canales que sirven como vías de transporte, permitiendo corrientes transitorias de grandes volúmenes de contaminantes a las aguas subterráneas. En la ausencia de tales canales, la agregación estructural de los suelos induce un flujo más rápido en los macroporos de los interagregados, que dentro de los microporos de los intragregados donde los contaminantes potenciales pueden ser retenidos. En ocasiones, la estructura del suelo favorece la tendencia para concentrarse en corrientes verticales o convergentes (llamados dedos) que generalmente comienzan en la transición de texturas finas a capas de textura granular, con un gran volumen de la zona superficial y siguiendo un transporte directo de contaminantes a la capa freática (Lesser, 1995).

Un compuesto orgánico volátil dentro de la zona superficial puede distribuirse en cada una de las tres fases a una misma concentración de equilibrio en función de la solubilidad y la volatilidad (Crouch, 1990).

Parámetros ambientales que afectan a los contaminantes

De acuerdo a Jury (1989) entre los parámetros ambientales que afectan a los contaminantes están:

- Temperatura: La presión de vapor está en función de la temperatura, al tener un valor bajo (10^{-4} atm) la fracción de un compuesto orgánico pasa rápidamente a la fase vapor. Por esta razón la difusión gaseosa es mucha más importante que la difusión líquida.

- Precipitación: Puede tener una influencia dominante debido al volumen de lluvia, afectando la velocidad de flujo en el suelo. Los suelos en regiones con lluvia intensa y frecuente tienen altos flujos de agua y de dispersión, extendiendo la difusión líquida y disminuyendo la gaseosa.
- Evapotranspiración: Representa la cantidad de agua aplicada y que es removida por plantas o es perdida en la superficie. Así, la extensión de la evapotranspiración afecta el flujo de agua debajo de la zona de la raíz y la lixiviación de los compuestos. La cantidad de agua lixiviada en suelos que no reciben entrada de agua por irrigación está determinada por el agua de lluvia menos el agua de evapotranspiración. Este parámetro es positivo, si implica un drenaje con movimiento descendente, y es negativo, si existe un proceso de secado con un bajo contenido de agua e induciendo un flujo ascendente de agua subterránea. Esto puede ser regulado por las condiciones meteorológicas externas como la radiación solar, viento, temperatura y humedad ambiente o por la resistencia del suelo o planta.

Transporte y Transformación de los Contaminantes en el Suelo

De acuerdo a Bonazountas y Kallidromitou (1993) el principal transporte y procesos de transformación para los contaminantes orgánicos disueltos en el suelo son: la advección, dispersión, lixiviación, adsorción y retardo, y la transformación química y biológica. La migración de una fase orgánica líquida inmiscible es gobernada, en gran parte, por su densidad, viscosidad y propiedades de superficie húmeda. El transporte vertical de contaminantes en la zona no saturada se produce debido a la gravedad y a las fuerzas capilares.

- a) *Advección*: En horizontes de arena y grava, el factor dominante en la migración del compuesto químico disuelto es la advección, proceso por el cual los solutos son transportados por un volumen móvil o por la circulación de agua.
- b) *Dispersión*: Se presenta por el agua del medio resultando dos procesos básicos: difusión molecular en solución y la mezcla, existiendo así una dispersión

hidrodinámica; debido a pasajes tortuosos o pequeños en el medio poroso, algunos líquidos realizan un movimiento menos directo al manto acuífero. En suma, el compuesto puede difundirse dentro de los poros inactivos para ser liberados lentamente cuando la principal concentración ha pasado. Esta dispersión está en función de la velocidad promedio del agua en el poro. La mezcla mecánica resulta de las variaciones en la velocidad del agua dentro de los poros del horizonte causado por fuerzas de fricción, variaciones en la geometría de los poros, y fluctuaciones en las direcciones locales hacia el flujo principal resultando una dilución y atenuación de los picos de concentración, las máximas concentraciones disminuyen con el incremento de la distancia (Barcelona y otros, 1990).

- c) *Lixiviación*: El movimiento de un químico hacia zonas profundas a través del suelo por medio del agua es llamado lixiviación. Es importante considerar la posibilidad de que un químico se mueva en el suelo y llegue a contaminar el agua subterránea; de suceder, entonces los pozos de agua, organismos acuáticos y la cadena trófica pueden contaminarse. Los factores determinantes en la lixiviación incluyen: la solubilidad, biodegradación, disociación, sorción, volatilidad, lluvias y evapotranspiración. Los efectos de la movilidad se describen en los siguientes apartados (Ney, 1990):
- Un compuesto químico que es soluble al agua puede lixivarse en el suelo y probable a ser biodegradado. Si la biodegradación es rápida, entonces la lixiviación no es un problema.
 - Un compuesto químico que es insoluble en agua puede ser adsorbido en el suelo, moviéndose con las partículas, y quizás sea biodegradado lentamente.
 - Los compuestos químicos en la superficie del suelo pueden ser fototransformados y no ser disponibles a lixivarse, sin embargo, los productos pueden ser disipados.

- Entre más precipitación mayor será la oportunidad de los contaminantes químicos a lixiviarse.
- La hidrólisis y la disociación pueden prevenir la lixiviación.

d) Adsorción e Intercambio iónico: La adsorción es la adhesión de iones o moléculas a superficies o interfases líquido-sólido, sólido-gas, líquido-gas y líquido-líquido produciendo un incremento en la concentración de químicos en la superficie o interfase sobre la concentración en solución (Fränze, 1993).

Los contaminantes orgánicos pueden alcanzar la zona de aguas subterráneas por la solución del suelo o como fases de líquidos orgánicos que pueden ser inmiscibles en el agua.

e) Volatilización: Un compuesto químico presente en el suelo, agua, plantas o animales puede volatilizarse hacia la atmósfera. La presión de vapor es uno de los factores más importantes que gobiernan la volatilización y provee información acerca de la volatilización bajo condiciones ambientales. Algunos factores que afectan dicho fenómeno son: el clima, sorción, hidrólisis y fototransformación. Estableciendo los siguientes enunciados:

1. Un compuesto químico con una baja presión de vapor tiene una alta capacidad de adsorción o una alta solubilidad al agua siendo menos probable a volatilizarse.
2. Un compuesto químico con una alta presión de vapor tiene una baja capacidad de adsorción o una muy baja solubilidad al agua siendo más probable a volatilizarse.

f) Fotólisis: Un químico puede ser fototransformado tanto como pueda absorber luz solar; puede ocurrir en el aire, suelo, agua, plantas y animales. Los productos pueden ser químicos de alto y bajo peso molecular. Las influencias ambientales tienen un efecto en la velocidad de fototransformación, tales como:

la profundidad del químico en el suelo y en el agua, sorción en el suelo y pH. La velocidad de fotólisis puede determinar la persistencia en el ambiente; entre más rápida sea la degradación es poco probable que continúe en el ambiente (vida media < 30 días), si tiene una vida media de 30 a 90 días, el compuesto químico puede tener un comportamiento hacia algunos compartimentos del ambiente y, si tiene una vida media > 90 días, existen problemas de contaminación (Ney, 1990).

g) *Degradación*: El comportamiento químico del suelo es fundamental para la degradación de muchos químicos orgánicos en una o más reacciones químicas (abióticas); en general, cinco reacciones pueden ocurrir en el suelo: Hidrólisis, Sustitución, Eliminación, Oxidación y Reducción. Sólo dos reacciones pueden transformar los contaminantes orgánicos que se pueden considerar para este caso:

- Oxidación: Se presenta en el suelo afectando a muchos compuestos químicos aromáticos experimentando una oxidación de radical libre, por ejemplo, benceno, bencidina, etilbenceno, naftaleno y fenol. Otro segundo grupo, incluye, tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), hexaclorobenceno, hexaclorociclopentadieno, bifenilos polibromados (PBB's) y policlorados (PCB's) y no aromáticos.

- Reducción: Definido en términos de transferencia de electrones, involucra a compuestos orgánicos en sistemas de agua-arcilla. El efecto se acelera al aumento de agua sugiriendo la existencia del mecanismo de transferencia de un electrón donde la arcilla actúa como un aceptor. En general, uno puede esperar que un químico orgánico puede experimentar una reducción química si el potencial del suelo es menor que el compuesto orgánico en cuestión.

h) *Degradación Biológica*: Es importante notar la presencia de microorganismos nativos del suelo que tienen un papel fundamental en la ausencia y/o permanencia de compuestos orgánicos, siendo considerado como una vía de pérdida de los compuestos orgánicos, llamada biodegradación; los compuestos químicos que poseen otras estructuras que los azúcares, aminoácidos y ácidos grasos, no pueden entrar inmediatamente dentro del metabolismo microbiano; esos compuestos requieren de una aclimatación definida en horas o meses, durante el cual poco o nada se degrada. El periodo de retraso generalmente es causado por: a) la transferencia de la información genética responsable de la degradación para una población, y b) la fase inicial de crecimiento exponencial de organismos capaces de degradar el compuesto, la alta solubilidad al agua que puede favorecer una rápida degradación (EPA, 1983), pero puede existir una acumulación a largo plazo de los productos de descomposición recalcitrante.

La temperatura que provee un crecimiento favorable fue de 27°C, estableciendo que aumenta la velocidad de degradación para desechos de refinería y petroquímicos cuando las temperaturas van de 10 a 30°C, pero disminuye ligeramente cuando las temperaturas aumentan de 30 a 40°C (EPA, 1983). El contenido de oxígeno en suelo es frecuentemente un factor limitante en la biorremediación.

La bioacumulación fue explicada observando la absorción de compuestos orgánicos por parte de plantas comestibles, donde se analizó los cultivos presentes en los terrenos agrícolas aledaños a zonas industriales siendo otro medio de remoción de estos compuestos en el suelo (Fränzle, 1993).

Finalmente, la combinación de las características del subsuelo, contaminantes y condiciones climatológicas del sitio pueden dar lugar a los diferentes procesos de transporte y distribución de los contaminantes. Para entender el transporte y destino de los contaminantes en el subsuelo es necesario realizar una buena caracterización del sitio con la cual se conocerán la carga hidráulica y la estratigrafía, así como los coeficientes de adsorción y la permeabilidad del suelo. Con esta información es posible calibrar modelos

matemáticos que sean representativos de la distribución tridimensional de los contaminantes en el sitio (Saval, 1995).

Biorremediación

El concepto de biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, entre otros), para remover (extraer), degradar (biodegradar) o transformar (biotransformar) compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos tóxicos o inocuos (Van Deuren y otros, 1997). Los procesos biológicos que involucran enzimas como catalizadores, pueden modificar moléculas orgánicas produciendo cambios en su estructura así como en sus propiedades toxicológicas incluso, dar como resultado la completa conversión de dichos compuestos en productos inorgánicos como agua, CO₂ o formas inorgánicas de N, P y S; además de componentes celulares y productos de las rutas metabólicas (mineralización) (Eweis y otros, 1998).

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio (autóctonos) o ajenos a éste (exógenos), y llevarse a cabo en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). Al igual que otras tecnologías de remediación, la biorremediación puede realizarse en el mismo sitio sin necesidad de excavar el material contaminado (in situ), o bien excavando el material para tratarlo en el sitio (on site) o fuera de él (ex situ) (Eweis et al. 1998). Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados por hidrocarburos totales del petróleo (HTP), solventes, explosivos, clorofenoles, pesticidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Van Deuren y otros. 1997).

Las tecnologías de biorremediación

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados, es relativamente reciente y presenta varias ventajas respecto de los métodos físico-químicos tradicionales (Eweis y otros, 1998). Algunas de estas ventajas son: (i) bajos costos de instalación y operación; (ii) es una tecnología simple y de fácil aplicación; (iii) es un tratamiento seguro con un mínimo de riesgos a la salud y (iv) es un tratamiento tecnológicamente efectivo.

De acuerdo con estudios realizados en los Estados Unidos de América y el Reino Unido, el mercado de la biorremediación para el tratamiento de suelos contaminados se ha incrementado debido a que los costos pueden reducirse entre 65% y 80%, respecto de los métodos físico-químicos. La aceptación de la biorremediación como una estrategia de limpieza viable, en muchos casos, depende de sus costos. Es decir, cuando el método biológico propuesto es menos costoso que los tratamientos físicos y químicos viables para el tratamiento de un sitio y de un contaminante en particular. Asimismo, muchas de las estrategias de biorremediación son competitivas en términos de costos y eficiencia sobre una matriz contaminada (Semple y otros, 2001). Entre las tecnologías de biorremediación más comunes, se encuentran las siguientes:

1. *Bioestimulación*. Implica la adición de oxígeno y/o nutrientes en el suelo contaminado con el fin de estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y con ello la biodegradación de los contaminantes (Van Deuren y otros, 1997).
2. *Bioaugmentación autóctona*. Consiste en la adición de microorganismos vivos que tienen la capacidad de degradar el contaminante en cuestión y así promover su biodegradación o biotransformación (Riser-Roberts, 1998).
3. *Biolabranza*. El suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, y se remueve (labra) periódicamente para favorecer su aireación.

Durante la biolabranza, el suelo contaminado se mezcla con suelo limpio (Van Deuren y otros. 1997).

4. *Bioventeo*. Consiste en estimular la biodegradación aerobia de un contaminante por medio del suministro de aire en el sitio contaminado (Van Deuren y otros. 1997).
5. *Fitorremediación*. Es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos o sedimentos (Van Deuren y otros. 1997).
6. *Biorreactores*. Es la tecnología más adecuada para casos en que los peligros potenciales de descargas y emisiones sean serios. Permite la combinación controlada y eficiente de procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoran y aceleran la biodegradación (Riser-Roberts 1998).
7. *Biodegradación en fase sólida*. Este tipo de tecnología generalmente se lleva a cabo ex situ, e incluye el composteo, las pilas estáticas y las pilas alargadas.

Biodegradación del petróleo

El petróleo es una fuente rica en materia orgánica, y los hidrocarburos que contiene son susceptibles de ser atacados por diferentes grupos de microorganismos (Murado y otros, 1996).

En la mayoría de los casos, la biodegradación de hidrocarburos es un proceso aerobio. Sin embargo, hay evidencias de biodegradación de hidrocarburos en condiciones anaerobias (Murado y otros, 1996); también se conocen bacterias y hongos termofílicos capaces de degradar hidrocarburos a temperaturas que oscilan entre los 55° y 77°C.

El trabajo desarrollado por Roldan-Martin (2003), destaca que al emplear grano verde de café en biopilas para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, con una concentración inicial de 58.000 ppm de HTP y al final de

38.000 ppm, se presenta menor compactación del sistema, se logran niveles altos de remoción y la actividad fúngica se ve incrementada en el sistema.

En la Tabla 2 se listan los géneros más comunes de levaduras, hongos y bacterias que tienen la capacidad de degradar hidrocarburos de petróleo (Murado y otros, 1996).

TABLA 2. GÉNEROS MÁS COMUNES DE LEVADURAS, HONGOS Y BACTERIAS QUE TIENEN LA CAPACIDAD DEGRADADORA DEL PETRÓLEO

Géneros de Levaduras	Géneros de Bacterias		Géneros de hongos	
<i>Candida</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Acremonium</i>	<i>Gliocladium</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Graphium</i>
<i>Endomyces</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Humicola</i>
<i>Hansenula</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Proteus</i>	<i>Beauveria</i>	<i>Monilia</i>
<i>Mycotorula</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Mortierella</i>
<i>Pichia</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Candida</i>	<i>Paecilomyces</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Chryso sporium</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Torulopsis</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Spirillum</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Rhodotorula</i>

<i>Trichosporon</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Cochlobolus</i>	<i>Saccharomyces</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Cylindrocarpus</i>	<i>Spicardia</i>
	<i>Brevibacterium</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Tolypocladium</i>
			<i>Fusarium</i>	<i>Trichoderma</i>
			<i>Geotrichum</i>	<i>Verticillium</i>

Fuente: Murado y otros (1996).

Yong y otros (1992) identificaron el orden en el que se biodegradan los hidrocarburos del petróleo, este orden es el siguiente: alifáticos de cadena lineal, > alifáticos de cadena ramificada, >compuestos monoaromáticos (benceno, Tolueno, etilbenceno y xileno) >compuestos con dos ó más anillos, > los compuestos poliaromáticos.

El tipo más común de oxidación de los hidrocarburos parafínicos (cadena larga), es la oxidación monoterminal hasta un ácido graso, seguido por la α -oxidación de éste último. El primer producto de ésta secuencia es un alcohol primario. Cuando el hidrocarburo capta Oxígeno molecular se forma el hidroperóxido intermediario (Figura 2). Esta asimilación puede ser llevada a cabo por grupos diferentes de bacterias, hongos y levaduras (Eweis y otros, 1998).

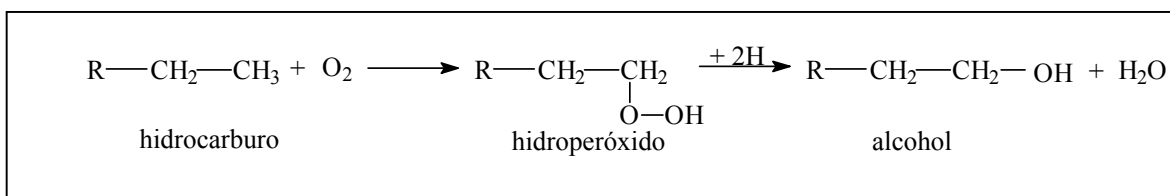


FIGURA 2. OXIDACIÓN DE HIDROCARBUROS DE CADENA LARGA

Fuente: Eweis y otros (1998), p58.

Los alcanos de cadena corta, también pueden ser oxidados en la parte subterminal para producir metilcetonas. Este tipo de oxidación se le conoce como oxidación subterminal (Figura 3).

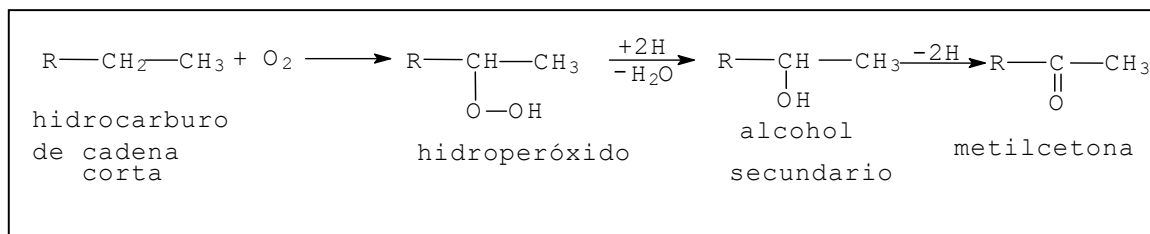


FIGURA 3. OXIDACIÓN DE HIDROCARBUROS DE CADENA CORTA

La mayor parte de la información disponible sobre la biodegradación de compuestos aromáticos se ha derivado del estudio de especies del grupo *Pseudomonas*, aunque también puede llevarse a cabo por corineformes, actinomicetos y posiblemente, por miembros del género *Spirillum* y bacilos esporógenos facultativos. También por hongos de los siguientes géneros: *Acremonium*, *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Graphium*, *Aureobasidium*, *Humicola*, *Beauveria*, *Monilia*, *Botrytis*, *Mortierella*, *Candida*, *Paecilomyces*, *Chryso sporium*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Rhodotorula*, *Cochlobolus*, *Saccharomyces*, *Cylindrocarpon*, *Spicardia*, *Debaryomyces*, *Tolypocladium*, *Fusarium*, *Thrichoderma*, *Geotrichum* y *Verticillium*. (Madigan, 1998).

De forma general, la degradación aerobia de un compuesto aromático implica la acción de las enzimas mono y dioxigenasas, que lo transforman en un fenol dihídrico,

y se trata por tanto de vías catabólicas convergentes. Algunos de los intermediarios en tales vías, son: el catecol, protocatecuato y el gentisato (Figura 4) (Madigan, 1998).

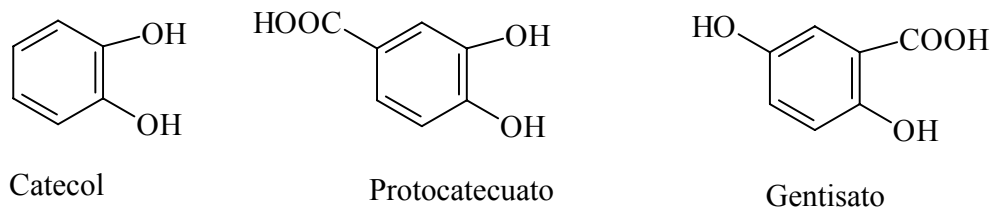


FIGURA 4. CATECOL, PROTOCATECUATO Y GENTISATO

Fuente: Madigan (1998), p311.

Los hongos también han sido evaluados para la degradación de hidrocarburos. Boldu y otros (2002), estudiaron el papel del hongo *Cladophialophora sp.*, en la degradación de benceno, Tolueno, etilbenzeno y xileno. El hongo no fue capaz de degradar el benceno, pero degradó los compuestos alcalinizados (Tolueno, etilbenzeno y xileno). El mecanismo de degradación fue una combinación de asimilación y cometabolismo. El Tolueno y el etilbenzeno fueron usados como fuente de carbono y energía. En el proceso degradativo actúa la enzima monooxigenasa la cual se encarga de la degradación del Tolueno, etilbenzeno y el xileno.

Madigan (1998) reporta cepas bacterianas que pueden utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono, aunque conserven la propiedad de utilizar más rápidamente otros sustratos para el crecimiento. Ciertos hidrocarburos se utilizan únicamente como co-sustratos, es decir, el organismo utiliza otro sustrato como fuente de energía y simultáneamente oxida al hidrocarburo. Este último no es oxidado completamente sino en una o dos etapas. Este mecanismo se conoce como co-metabolismo.

También demostraron que la composición química del petróleo y la temperatura en el cultivo tienen un efecto importante en el consorcio bacteriano y en su eficiencia de biodegradación. Keiji y otros, (1997) reportaron que al realizar la biodegradación de petróleo con bacterias *Acinetobacter T4*, se obtuvo una degradación del 12 al 20 por ciento, y para un consorcio aislado del mar (SM8) la degradación fue del 19 al 34 por ciento, con diferentes tipos de petróleo (Arabian Light, Dubai, Shengli y Maya).

Sin embargo, los compuestos saturados con peso molecular mayor de 500 kDa no eran degradados por estos microorganismos.

Lai y otros (2002) reportan que la biodegradación de suelos contaminados con petróleo, en un ambiente natural, puede estar restringida principalmente por tres factores: (i) Los microorganismos nativos son deficientes para aprovechar los hidrocarburos como fuente de carbono y/o energía, (ii) La transferencia de masa está limitada (biodisponibilidad) y (iii) Los compuestos intermediarios del metabolismo son tóxicos.

Suelos contaminados e intemperizados y biodisponibilidad

En suelos contaminados por largos periodos que permanecen a la intemperie, los compuestos llegan a ser inaccesibles para los microorganismos por las fuertes interacciones que se producen entre los contaminantes y el suelo. Cuando aumenta el tiempo de permanencia, el contaminante llega a estar progresivamente menos biodisponible para los microorganismos del suelo (Kelsey y otros, 1997), las moléculas contaminantes interactúan con los suelos, dependiendo de la naturaleza de las moléculas, del tamaño de partícula (arcillas son menores de 0,002 mm) y de la composición de los suelos que las alojan.

La fase sólida del suelo es una mezcla de materiales inorgánicos que determinan su la estructura. La fracción inorgánica está compuesta por fragmentos de rocas y minerales de diferente tamaño y composición. De acuerdo al tamaño, las fracciones del suelo se clasifican en arena, limo y arcilla. La arena es de tamaño uniforme (0,02 – 2,0 mm) aunque de formas irregulares, es químicamente inerte y no tiene carga eléctrica, por tanto tiene una baja capacidad de intercambio iónico (Cresser y otros; 1993).

El limo tiene un tamaño intermedio (0,002 – 0,02 mm) y presenta características que están entre la arena y las arcillas. Las arcillas son las partículas más pequeñas (menores de 0,002 mm), posee carga negativa y es el constituyente

inorgánico más activo en el suelo. Su presencia confiere al suelo una alta capacidad de intercambio catiónico (Cresser y otros; 1993).

Las arcillas y la materia orgánica son los constituyentes del suelo que adsorben y absorben más compuestos exógenos. Cuando se trata de moléculas de elevado peso molecular, estas se retienen en las superficies minerales por enlaces de hidrógeno y, en el caso de compuestos de bajo peso molecular por intercambio iónico. Las arcillas tipo 1:1, como la kaolinita, tienen menor capacidad de sorción debido a que las moléculas sólo se adsorben en las superficies externas. En las arcillas 2:1, como es la montmorillonita, ocurre tanto adsorción (superficie externa) como absorción (superficie interna) de contaminantes, incrementándose la capacidad de sorción (Reinhard y otros, 1997).

En general, se reconoce que en suelos con alto contenido de arcillas se favorece la retención de hidrocarburos (Geerdink y otros; 1995).

La biodisponibilidad de un contaminante orgánico en un suelo, puede incrementarse por cualquiera de las siguientes vías: (i) Adición de surfactantes sintéticos, (ii) Uso de biosurfactantes y (iii) adición de disolventes orgánicos.

Adición de surfactantes y biosurfactantes

Los surfactantes pertenecen a un grupo heterogéneo de moléculas que tiene la propiedad de reducir la tensión interfacial de las soluciones acuosas y mezclas de hidrocarburos, modificando la solubilidad de los hidrocarburos en agua. (Boopathy y Manning, 1999)

Los surfactantes sintéticos frecuentemente aplicados para el lavado de suelos, debido a su alta solubilidad, movilizan contaminantes orgánicos adsorbidos o absorbidos al suelo (Mata-Sandoval y otros 2000). Sin embargo muchos de ellos no han mostrado efectos positivos en pruebas de laboratorio ya que resultan tóxicos a altas concentraciones e inhiben la degradación. Incluso puede ocurrir la formación de un exceso de espuma que dificulta el tratamiento por ejemplo en un biorreactor (Laha y Luthy, 1992). A pesar de estos inconvenientes, el interés por aplicar surfactantes en el tratamiento de suelos contaminados ha permitido desarrollar novedosas propuestas

como es el uso de lecitina de soya (Fava y Gioia, 2001), que es un surfactante fotogénico aplicado para el tratamiento de un suelo artificial contaminado con bifenilos policlorados en un microcosmos de suelo en suspensión.

Los biosurfactantes por otra parte, son producidos principalmente por bacterias, se forman como parte de su estrategia metabólica para crecer sobre sustratos donde la biodisponibilidad es reducida. Los biosurfactantes presentan características similares a los surfactantes sintéticos. (Laha y Luthy, 1991)

Si bien es posible superar algunos de los inconvenientes mencionados en el tratamiento de suelos con surfactantes, sus costos y su carácter poco específico, entre otros aspectos, promueven la búsqueda de otras alternativas para mejorar la biodisponibilidad y biodegradación de compuestos hidrófobos. En este sentido el uso de los solventes orgánicos es una alternativa. (Laha y Luthy, 1991)

Medición de la biodegradación de HTP

Para medir la biodegradación de hidrocarburos en suelos intemperizados se realizan los siguientes procedimientos que son complementarios: (i) Estimación por medio de la cuantificación de los HTP, (ii) Por diferencia de peso de una muestra de suelo contaminado antes y después de ser tratado con el disolvente orgánico.

Tolueno

De acuerdo a lo establecido por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo- España. NIOSH (1999) y ECOPETROL:

1. Identificación del producto

- Clase: Producto petroquímico, disolvente.
- Nombre químico: Tolueno
- Sinónimos: Metilbenceno/ Fenilmetanol/ Toluol
- Fórmula: $C_6H_5CH_3/C_7H_8$

2. Descripción del producto: El tolueno se produce por destilación de la fracción de aromáticos (BTX) obtenida en el proceso de reformado catalítico de las naftas de petróleo. Es un hidrocarburo aromático líquido, volátil, poco soluble

en agua, pero se mezcla fácilmente con alcohol, éter, cloroformo, acetona, ácido y bisulfuro de carbono.

3. *Propiedades físico-químicas*

- Aspecto y color: Líquido incoloro
- Olor: Aromático característico (agradable)
- Presión de vapor: 2.9 KPa 20°C
- Densidad relativa de vapor (aire=1): 3.2
- Solubilidad en agua: Ninguna
- Punto de ebullición: 111°C
- Peso molecular: 92.1

	ASTM	Min.	Max.
Acidez	D 847	Pasa	
Apariencia	[1]	Pasa	
Color escala platino-cobalto	D 1209		20
Color de lavado ácido	D 848	Pasa	2
Compuestos de azufre	D 853 [2]	Pasa	
Corrosión lámina de cobre	D 849		
Cromatografía	D 2360		
Contenido de no aromáticos (% Vol.)			1,5
Densidad relativa (g / cm³) a 15.6°C	D 4052	0,869	0,873
Densidad (g / cm³) a 20°C	D 4052	0,865	0,87
Destilación	D 850		
Rango de destilación			1°C (1.8°F)
Temperatura incluida			110.6°C(231°F)

[1] Líquido claro libre de sedimentos u opacidad entre 18,3 y 25,6°C

[2] Libre de H₂S y SO₂; análisis cualitativo

Fuente: ECOPETROL

- ### 4. *Usos:* Se utiliza como disolvente en la fabricación de pinturas, resinas, thinner y tintas. Sirve como materia prima para la fabricación de benceno y puede reemplazarlo en ciertas formulaciones.

5. *Identificación de los peligros*



6. *Estabilidad y reactividad*

- Reacciona violentamente con oxidantes fuertes, originando peligro de incendio y explosión.
- Condiciones que deben evitarse: Fuentes de calor e ignición.
- Materiales a evitar: Ácido nítrico: reacción vigorosa. Ácido nítrico + ácido sulfúrico: posible descomposición violenta. Oxidantes fuertes: peligro de fuego y explosión. Plásticos, gomas y recubrimientos: pueden ser atacados. Ácido sulfúrico: reacción exotérmica.
- Productos de descomposición: Por altas temperaturas: puede liberar humos acres y vapores irritantes.
- Polimerización: No aplicable.

7. Información toxicológica

	Efectos agudos	Efectos crónicos
Contacto con la piel	Irritante, los vapores pueden causar deshidratación. Generalmente	Puede causar dermatitis
Contacto con los ojos	Irritación y quemadura de córnea si no se remueve rápidamente.	Puede causar conjuntivitis.
Inhalación	Irritante, narcótico y neuro-tóxico.	Puede causar la irritación de la membrana mucosa, vómito, insomnio, anorexia, pérdida momentánea de memoria.
Ingestión	Narcótico, puede causar sensación de quemadura y espasmos abdominales.	

- Límite en aire de lugar de trabajo (s/ Res. 444/91) CMP: 375mg/m³ CMP-CPT: 560 mg/m³
- Límite biológico (s/ Res. 444/91):
 - Ácido hipúrico en orina:
Fin de la jornada: 2.5 g/g (Nb, Ne)
Luego de 4 horas del fin de la jornada: 3 mg/min.
 - Tolueno en sangre venosa:
Fin de la jornada: 1 mg/l (Cf)
 - Tolueno en aire exhalado (última porción):
Durante la jornada: 20 ppm (Cf)
 - Límite NIOSH REL: TWA= 100 ppm (375 mg/m³), ST= 150 ppm (560 mg/m³)

- Límite OSHA PEL: TWA 200 ppm, C= 300 ppm, 500 ppm (pico máximo 10 minutos)
- Nivel guía para fuentes de agua de bebida humana (s/ Dto. 831/93): 1000 ug/l

8. *Riesgos de incendio y explosión*

- Incendio: Altamente inflamable. El vapor es más denso que el aire y puede extenderse al ras del suelo; posible ignición en punto distante con resultado del flujo, agitación, etc. Se pueden generar cargas electrostáticas.
- Explosión: Las mezclas vapor/ aire son explosivas.
- Puntos de inflamación: 4.4° C (vaso cerrado)
- Temperatura de auto-ignición: 480° C

9. *Efectos ecotóxicos*

Residuo clasificado peligroso / especial	S/ Ley 24-051 - Dto. 831/93 (Nación)		S/ Ley 11.720 - Dto. 806/97 (Bs.As.)	
	SI	NO	SI	NO
Límite en emisiones gaseosas	S/ Dto. 831/93 (Nación)		S/ Dto. 3395/96 (Bs.As.)	
	Nivel guía de emisión: 2.10 E02 mg/s (desde superficie) 7.40 E04 mg/s (altura de chimenea 30m).		Nivel guía de emisión: no establecido	
	Nivel guía de calidad de aire: 0.6 (promedio: 30 minutos)		Nivel guía de calidad de aire: 1.4 mg/m ³ (período de tiempo 8 horas)	
Límite en vertidos líquidos	S/ Res. 79179/90 (Nación)		S/ Res. 287/90 (Bs.As.)	
	No establecido		No establecido	

10. *Equipos de protección personal*

- Protección respiratoria: Sí
- Protección de manos: Sí
- Protección de ojos: Sí
- Protección del cuerpo: No
- Instalaciones de seguridad: Sí

11. *Manipuleo y almacenamiento*

- Condiciones de manipuleo: Usar herramientas antichispas y equipos de protección. Evitar el contacto con goma. Usar líneas de acero dulce y tuberías de polipropileno, acero dulce o acero inoxidable. Evitar las llamas, NO producir chispas, NO fumar, comer ni beber durante el trabajo.

- Condiciones de almacenamiento: A prueba de incendio. Alejado de fuentes de ignición. Separado de oxidantes fuertes.

12. *Medidas a tomar en caso de derrames y/o fugas*

- Precauciones personales: Equipo autónomo de respiración.
- Precauciones ambientales: NO verterlo al alcantarillado.
- Métodos de limpieza: Recoger el líquido procedente de la fuga en recipientes precintables, absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro.

13. *Medidas a tomar en caso de contacto con el producto - Primeros Auxilios*

- En general: En todos los casos luego de aplicar los primeros auxilios derivar al médico.
- Contacto con la piel: Quitar las ropas contaminadas. Lavar con abundante agua y jabón. Remover la indumentaria contaminada y proporcionar asistencia médica.
- Contacto con los ojos: Lavar con abundante agua durante varios minutos (quitar lentes de contacto si puede hacerse con facilidad) y proporcionar asistencia médica.
- Inhalación: Sacar del área contaminada inmediatamente y exponer al aire fresco, si es necesario dar respiración artificial y proporcionar asistencia médica.
- Ingestión: Enjuagar la boca, dar a beber una pastilla de carbón activado y agua. NO provocar el vomito y proporcionar asistencia médica.

14. *Medidas a tomar en caso de incendio y explosión*

- Medidas de extinción apropiadas : Espuma, Dióxido de Carbono, polvos químicos. Si es posible mover el contenedor fuera del área de fuego y enfriar con agua.
- Medidas de extinción inadecuadas: No utilizar agua en chorro sino en forma de niebla.
- Productos de descomposición: Por las altas temperaturas puede liberar humos acre y vapores irritantes.

- Equipos de protección personal especiales: Trajes de protección personal completa y equipos de respiración autónoma.
- Instrucciones especiales para combatir el fuego: Mantener fríos los bidones y demás instalaciones rociando con agua.

15. Medidas a tomar para la disposición final de residuos

- Los restos de producto químico deberían eliminarse por incineración o mediante cualquier otro medio de acuerdo a la legislación local.
- El envase contaminado, debe tratarse como el propio residuo químico.
- No verter en ningún sistema de cloacas sobre el piso o extensión de agua.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA

Modalidad del Trabajo de Grado

Este trabajo de grado se enmarcó dentro de la modalidad de Proyecto de Investigación Documental y de Laboratorio.

Una investigación documental es el estudio de problemas o de un tema planteados a escala teórica, con el fin de ampliar y profundizar el conocimiento de su naturaleza, apoyado fundamentalmente en estudios o trabajos previos, información y datos divulgados por medios impresos, audiovisuales o electrónicos. La originalidad del estudio se fundamenta principalmente en el pensamiento del autor, es decir, el enfoque, los criterios, conceptualizaciones, reflexiones, conclusiones y recomendaciones. (Universidad Pedagógica Experimental Libertador (UPEL), 1998)

Se entiende por investigación de laboratorio, el análisis sistemático y simulación de problemas de la realidad controlando algunas variables, con el propósito bien sea de describirlos, interpretarlos, entender su naturaleza y factores constituyentes, explicando sus causas y efectos, o predecir su ocurrencia, haciendo uso de métodos característicos de los enfoques de investigación conocidos o en desarrollo. (UPEL, 1998)

Tipo y diseño de la investigación

Para el desarrollo de este trabajo de grado se utilizaron estudios de carácter exploratorio, descriptivo.

Un *estudio exploratorio* es el primer nivel de conocimiento. Permite al investigador familiarizarse con el fenómeno o tema que se investiga. Sirve como punto de partida para la formulación de otras investigaciones de mayor profundidad. Busca construir un marco teórico de referencias o las orientadas al análisis de los

modelos teóricos. Este tipo de estudio puede completarse con el estudio descriptivo, según lo quiera o no el investigador. (Sabino, 1994; Méndez, 2001)

Este trabajo puede servir de base para la realización de nuevas investigaciones, porque arroja resultados y conclusiones que podrían inducir a otros autores a formularse hipótesis o problemas no resueltos.

El *estudio descriptivo* es el segundo nivel de conocimiento. Identifica características del universo de investigación, señala formas de conducta, establece comportamientos concretos, y descubre y comprueba asociación entre variables. Su objetivo es conocer grupos homogéneos de fenómenos utilizando criterios empleados de manera sistemática para obtener su estructura o comportamiento. No se ocupa de verificar hipótesis, sino de describir hechos a partir de un modelo teórico definido anteriormente. (Sabino, 1994)

Fuentes y Técnicas de recolección de datos

Para la recolección de datos en esta investigación se utilizaron tanto fuentes secundarias como primarias. Se definen como fuentes secundarias toda información escrita que ha sido recopilada y transcrita por personas que han recibido tal información a través de otras fuentes escritas o por un participante en un suceso o acontecimiento. Se encuentra en las bibliotecas, y está contenida en libros, periódicos, revistas especializadas, enciclopedias, documentos como trabajos de grado, diccionarios, documentos electrónicos, etc. Cuando se usan estas fuentes se debe señalar el grado de facilidad o dificultad que tiene su utilización. (Méndez, 2001)

Se definen como fuentes primarias toda información oral o escrita que es recopilada directamente por el investigador a través de relatos o escritos transmitidos por los participantes en un suceso o acontecimiento. Implica utilizar técnicas y procedimientos que suministren la información adecuada. (Sabino, 1992; Méndez, 2001)

Los *datos primarios* se recolectaron utilizando los siguientes *materiales y métodos*:

- a) Reactivos: Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron reactivos de grado analítico. Los disolventes fueron grado reactivo.
- b) Medios de cultivo: La composición del medio de cultivo utilizado para la obtención y conservación del consorcio microbiano, fue: 80 g/l. de $MgSO_4$; 8 g/l. de $CaCl_2$; 800 g/l. de $FeCl_3$; 200 g/l. de solución de microelementos, y 40 ml. de la solución M9.

La composición de la solución M9 por cada litro de agua desionizada fue la siguiente: 3.0 gr. de KH_2PO_4 ; 6.0 gr. de Na_2HPO_4 ; 1.0 gr. de NH_4Cl ; y 0.5 gr. de $NaCl$.

La composición de la solución de microelementos consiste en un suplemento para medios microbiológicos.

Preparación:

Disolver 1.5 gr. de ácido nitroacético en 500ml. Ajustar el pH a 6.5 con KOH 10M.

Agregar:

- 5.1 gr. de $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$. Cloruro de magnesio hexahidratado.
- 0.51 gr. de $MnCl_2$. Cloruro de manganeso anhidro.
- 1.0 gr. de $NaCl$. Cloruro de sodio anhidro.
- 1.0 gr. de $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$. Cloruro ferrico hexahidratado.
- 0.1 gr. de $CaCl_2 \cdot 6 H_2O$. Cloruro de calcio hexahidratado.
- 0.0065 gr. de $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$. Cloruro cúprico dihidratado.
- 0.08 gr. de $ZnCl_2$. Cloruro de cinc anhidro.
- 0.05 gr. de $AlCl_3$. Cloruro de aluminio anhidro.
- 0.01 gr. de H_3BO_3 . Acido bórico anhidro.
- 0.04 gr. de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$. Molibdata de sodio dihidratado
- 0.08 gr. de $CoCl_2 \cdot 6H_2O$. Cloruro de cobalto hexahidratado.

Ajustar a Ph 4.3 con HCl 6N.

El medio de cultivo utilizado para la propagación del consorcio (M9) tiene la composición arriba mencionada.

Consortio microbiano:

- Obtención y conservación: El consorcio microbiano se obtuvo a partir del suelo contaminado. El consorcio microbiano se desarrolló en el medio M9, con 1000 mg. de suelo impactado, como fuente de carbono se adicionó 20 mg. de hidrocarburos poliaromáticos, los cuales fueron Naftaleno, Pireno, DBT (Diversotiofeno) y una cuarta fiola con orimulsión. El objetivo de ello fue el de incentivar el crecimiento y aumentar la concentración de bacterias capaces de degradar diferentes tipos de hidrocarburos. El consorcio se incubó a 30°C con agitación a 250 r.p.m., durante 5 días.
- Conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC): Para realizar ello, al finalizar los 5 días de crecimiento microbiano se tomaron alíquotas de cada fiola contenedora de los consorcios en crecimiento y se realizaron diluciones de diferentes concentraciones y se realizó el procedimiento de cuentas microbianas explicado mas adelante.
- Realización de pases de enriquecimiento bacteriano: Para realizar ello, se prepara medio mínimo salino M9 y por cada 40 ml de M9 de cada fiola se agregan 200 µlt de microelementos, 800 µlt FeCl₃ 5Mm, 8 µlt CaCl₂ 0.5m, 80 µlt MgSO₄ 1m y 20 mg de poliaromático (pireno, DBT, naftaleno, orimulsión) respectivo a cada fiola.
Se toman 500 µlt del consorcio microbiano de cada fiola. Se colocan T=30°C y con una agitación de 250 rpm por 5 días.
- Concentración de bacterias: Para lograr ello, después de obtener un resultado del conteo microbiano, se sometieron las diferentes soluciones a centrifugación en una centrifugadora marca Beckman (fig. 5) de manera de eliminar la mayor cantidad de líquido de la solución, y así obtener la

concentración deseada de bacterias para realizar la inoculación en las bandejas contenedoras del suelo impactado.



FIGURA 5. CENTRIFUGADORA MARCA BECKMAN

- c) **Caracterización del suelo intemperizado:** El suelo se obtuvo en un sitio cercano a una zona en explotación, situada en El Tigre, Barcelona. Esta fosa ha estado contaminada por un largo periodo con desechos de la actividad petrolera. El clima de la zona es de tipo ecuatorial con una temperatura que oscila entre los 23 y 30°C. Las lluvias más abundantes se registran entre Mayo y Agosto, periodo en el cual el sitio tiende a inundarse. Las muestras de suelo se tomaron a una profundidad no mayor a 0,50 m, y se mantuvieron a temperatura ambiente, conservándose en bolsas de plástico. Por otro lado el suelo fue separado en tres grupos dependiendo de su contenido de petróleo, dividiéndose en tres categorías: Alto impacto, Medio impacto y bajo impacto (ver figura 6) a los cuales se les calcularon los TPH contenidos por el procedimiento de determinación de grasas, aceites y TPH expuesto mas adelante.

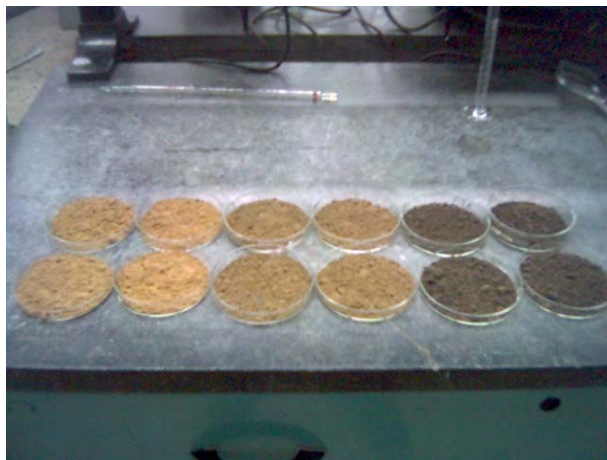


FIGURA 6. TIPOS DE TIERRA: BAJO, MEDIO Y ALTO IMPACTO DE PETRÓLEO

- d) Unidad experimental: Las unidades experimentales se realizaron básicamente con mezcla de suelos (contaminado, sin contaminar), también se adicionó medio M9 en el volumen necesario para obtener cierto porcentaje de humedad. Se incubaron a temperatura ambiente del laboratorio a aproximadamente 27 °C, se colocaron en diferentes contenedores como se mencionan en cada caso.
- Unidad experimental de Biobioaumentación autóctona: Se realizó una mezcla de suelos de la siguiente manera: por cada gramo de suelo con bajo impacto de HTP, se adicionó 1,2 grs. de suelo medio y altamente impactado (100 grs HTP/Kg de suelo) obteniendo una mezcla de suelo artificial con una concentración de 10% de HTP. Todo se tamizó con malla, la mezcla se inoculó con 20 por ciento v/p de consorcio microbiano autóctono y solución salina rica M9 con una concentración aproximada de bacterias de $1 \cdot 10^9$ UFC/ml (UFC siglas de Unidades Formadoras de Colonias).
 - Unidad experimental de Bioestimulación: Se realizó una mezcla de suelos de la siguiente manera: por cada gramo de suelo con bajo impacto de HTP, se adicionó 1,2 grs. de suelo altamente impactado (100 grs HTP/Kg de suelo) obteniendo una mezcla de suelo artificial con una concentración

de 10% de HTP. Todo se tamizó con malla, la mezcla se inoculó con 20 por ciento v/p de solución salina rica M9.

- Unidad experimental de Bioaumentación alóctona: Se realizó una mezcla de suelos de la siguiente manera: por cada gramo de suelo con bajo impacto de HTP, se adicionó 1,2 grs. de suelo altamente impactado (100 grs HTP/Kg de suelo) obteniendo una mezcla de suelo artificial con una concentración de 10% de HTP. Todo se tamizó con malla, la mezcla se inoculó con 20 por ciento v/p de consorcio microbiano R1 y solución salina rica M9 con una concentración aproximada de bacterias de $1 \cdot 10^9$ UFC/ml.
- Unidad experimental de Control: Se realizó una mezcla de suelos de la siguiente manera: por cada gramo de suelo con bajo impacto de HTP, se adicionaron 1,2 grs. de suelo altamente impactado (100 grs HTP/Kg de suelo) obteniendo una mezcla de suelo artificial con una concentración de 10% de HTP. Todo se tamizó con malla, a esta unidad no se le agregó ningún tipo de nutrientes.
- Unidad experimental de biosurfactante: Se realizó una mezcla de suelos de la siguiente manera: por cada gramo de suelo con bajo impacto de HTP, se adicionó 1,2 grs. de suelo altamente impactado (100 grs HTP/Kg de suelo) obteniendo una mezcla de suelo artificial con una concentración de 10% de HTP. Todo se tamizó con malla, la mezcla se inoculó con 20 por ciento v/p de consorcio microbiano R1 activado para producir surfactantes y solución salina rica M9 con una concentración aproximada de bacterias de $1 \cdot 10^9$ UFC/ml.



FIGURA 7. FOTO DE MONTAJE DE UNIDADES EXPERIMENTALES

Determinación de Grasas y Aceites y HTP.

Para determinar Grasas y Aceites y HTP, se utilizó el siguiente método analítico:

1. Tomar muestra representativa del suelo en estudio con una espátula.
2. Colocar en estufa (50 °C) el tiempo suficiente para evaporar la humedad.
3. Pesar alrededor de 5 gr de muestra en un envase de vidrio (Previamente pesado) de 200 ml y agregar tolueno hasta cubrir la muestra.
4. Agitar bien y dejar reposar el tiempo necesario para que el crudo se disuelva en el tolueno (1 a 2 días).
5. Separar por filtración (papel de filtro MFS Nro 1. Diam. 18,5 cm.) el suelo del crudo disuelto en el solvente. Lavar con tolueno hasta que el suelo quede limpio y el filtrado salga transparente. El envase de vidrio donde se recoge el filtrado también debe ser pesado previamente en balanza analítica.
6. Transferir el papel de filtro con el suelo limpio hasta el frasco donde quedó el resto del suelo limpio. Colocar en una placa de calentamiento para evaporar moderadamente el tolueno hasta sequedad.
7. Colocar el frasco con el extracto (filtrado de crudo + tolueno + papel de filtro) en la placa de calentamiento hasta evaporar completamente el tolueno.
8. Pesar los frascos con extracto papel de filtro y suelo limpio.

9. Calcular el TPH por diferencia de pesada tanto a través del suelo como del extracto.

El paso N° 7 se modificó para recuperar el solvente disuelto y ser reutilizado en las diluciones siguientes y así mejorar la viabilidad económica del proyecto. La modificación consistió en elaborar un montaje (ver figura 8) que permitiera realizar la destilación de la dilución y por diferencias por puntos de ebullición, extraer el tolueno de la muestra y por otro lado obtener los HTP's sin solvente.



FIGURA 8. SISTEMA DE EXTRACCIÓN DE SOLVENTE PARA HTP.

Cuantificación de HTP por gravimetría:

La concentración de HTP (base seca) en el suelo contaminado, se estima mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{HTP}] = \frac{W_{\text{CH+HTP}} - W_{\text{CH}}}{W_{\text{MC}}} \quad \text{Ec. N° 1}$$

Donde:

$W_{\text{CH+htp}}$ = peso seco de los htp, la Cápsula de Petit y el papel de filtro.

W_{CH} = peso seco de la Cápsula de Petit y papel de filtro limpio.

W_{MC} = peso de la muestra de suelo contaminado.

En cada unidad experimental se determinó la concentración de HTP por gravimetría.

e) **Métodos Analíticos:**

- pH del suelo: La determinación potenciométrica de la actividad de H^+ en una suspensión de suelo en agua se realizó de acuerdo al siguiente procedimiento: se pesa 10g de suelo seco de 2 mm en un matraz, se añade 25 ml de agua destilada, después se agita durante un minuto, se dejó reposar durante una hora y se midió el pH en el sobrenadante. Nuevamente se agita manualmente por 30 segundos y se mide inmediatamente el pH.
- Determinación de humedad: En una cápsula de Petit, a peso constante, se colocaron de 5 a 10 grs. de mezcla de suelo artificial húmedo, se secaron en una estufa a 60°C durante 24 horas y se pesó la muestra seca. Se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(PMH - PMS)}{PMH} \times 100 \quad \text{Ec. N}^\circ 2$$

Donde:

PMH = Peso de muestra húmeda

PMS = Peso de muestra seca

- Cuenta microbiana: La cuenta de células viables se realizó por duplicado mediante la técnica de dilución en serie y subsiguiente plaqueo en agar. Para preparar las diluciones se emplearon 100 μ l de suspensión microbiana y se diluyó en 900 μ l de solución salina M9 y se vertieron en envases Eppendorf de 1000 μ l obteniendo una concentración de 10^{-1} UFC/ml, luego se realizaron las diluciones

siguientes agitando la mezcla anterior con concentración de 10^{-1} UFC/ml y tomando nuevamente 100 μ l y se le agregan a un nuevo Eppendorf siendo la dilución para este caso 10^{-2} UFC/ml, se repite este procedimiento hasta llegar a la dilución deseada. Las placas se inocularon con 50 μ l de suspensión microbiana que se distribuyó sobre la superficie de agar con una espátula de platino. Las placas de Petri se incubaron a 30°C durante 72 horas. Se contaron la unidades formadoras de colonias (UFC) en la placa con una dilución que tuviera entre 25 y 100 UFC. Las células viables, se reportan como UFC / ml calculadas de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de Colonias}}{0,1 \text{ ml de Suspensión}} \times (\text{Factor de Dilución}) \quad \text{Ec. N}^\circ 3$$

Caracterización de los HTP mediante Separación S.A.R.A.

- Cuantificación de asfáltenos: Se fraccionaron a partir de los HTP, por insolubilidad en pentano caliente. Se colocaron de 0,25 á 0,5 grs. de extracto de HTP en un vaso de precipitado y posteriormente se adicionaron 20 ml de n-pentano en ebullición, con la finalidad de precipitar los asfáltenos. El precipitado se filtró al vacío con papel de filtro realizando de 3 a 5 lavados con 10 ml de n-pentano en ebullición. Finalmente los asfáltenos se cuantificaron gravimétricamente.

La fracción de asfáltenos (F_{asf}) presente en los HTP de muestras sólidas contaminadas, se estimaron mediante la siguiente ecuación:

$$F_{asf} = \frac{(W_{pasf} - W_p) + (W_{vasf} - W_v)}{W_{ext-asf}} \quad \text{Ec. N° 4}$$

de:

W_{pasf} = peso seco del papel filtro con asfáltenos

W_p = peso seco del papel filtro

W_{vasf} = peso del vaso de precipitado con asfáltenos

W_v = peso seco del vaso de precipitado

$W_{ext-asf}$ = peso seco del extracto de HTP iniciales empleado en la determinación de los asfáltenos

- Obtención de fracciones Saturadas: Se activó la alúmina a utilizar durante 24 hr mediante calentamiento en una estufa y posteriormente evitar el contacto con humedad. Para realizar el empaquetamiento se coloca al final de la columna un poco de algodón esterilizado ó lana de vidrio, se llenó la columna de vidrio hasta $\frac{3}{4}$ partes de su capacidad con n-heptano cuidando de no dejar gotas de aire a lo largo de la columna, luego se agregó la alúmina lentamente dando pequeños golpes a la columna para lograr un empaquetamiento uniforme mientras se agrega la alúmina hasta llegar a una altura de empaque de 30 cm aproximadamente. Fué de suma importancia que el nivel de líquido en la columna se mantuviese siempre 2 cm por encima del tope del empaque de alúmina. El eluyente ó maltenos obtenidos del paso anterior son disueltos en n-heptano y agregados a la columna con la llave abierta y continuamente se siguió agregando n-heptano en una cantidad

aproximada de 20 ml por gramo de muestra. Los beakers utilizados para recolectar los precipitados fueron pesados con anterioridad.

- Obtención de fracciones Aromáticas: Una vez precipitado los compuestos saturados se reemplazó el beaker recolector ubicado al final de la columna y se procedió a agregar una cantidad de 50 ml tolueno en varias porciones hasta observar con la luz UV que ya ha precipitado toda la cantidad de compuestos aromáticos los cuales son resaltados con esta luz.
- Obtención de Resinas: Para finalizar se agregaron 50 ml de cloroformo en varias porciones hasta que la columna se encontrara completamente limpia.
- Al finalizar estos pasos se procedió a evaporar o recuperar el solvente que contenía cada fracción de crudo y se pesaron los residuos y se calcularon los porcentajes en base a la cantidad inicial de crudo pesada inicialmente.

Análisis de Placas Líticas

Para poder hacer este análisis se debe observar en placas una posible muerte celular (lisis), y se puede verificar con los siguientes pasos:

- Se toma dos tubos de ensayos totalmente estériles y a cada uno se le agrega 300 µl de LB o M9.
- Se toma una muestra de bacterias 9816 y E Coli
- Se agregan a los tubos las muestras de las bacteria 9816 y E. Coli respectivamente, se coloca en agitación a 250 rpm a 30°C por un día.

- Luego se toma 4 tubos de ensayos totalmente estériles y a cada uno se le agrega 300 µl de LB o M9. (Dos de estos tubos van a ser el control de la bacteria 9816 y E. Coli y los otros bacterias 9816 + placa lítica y E. Coli + placa lítica)
- Se toma 100 µl de los tubos de las bacterias crecidas en LB o M9 anteriores y se le agregan a los 4 tubos de ensayo.
- Se agrega 500 µl de LB o M9 a la placa lítica.
- Se rastilla la placa lítica para homogenizar la muestra, luego se toma el sobrenadante y se llevan a los tubos 9816 + placa lítica y E. Coli + placa lítica
- Los 4 tubos se colocan en agitación a 250 rpm a 30°C por un día.
- Se toma 100 µl de cada tubo y se hace diluciones seriadas.
- Se toman 100 µl y se siembran en placas con LB al título deseado y se dejan por un día o dos. En este caso se van hacer dos juegos de placas uno normal y el otro juego le vamos aplicar UV por 10 seg aproximadamente.

Se observan las placas y si nota calvas en las células, es decir, espacios vacíos dentro de las bacterias, o tiene un menor título que los controles esta en presencia de virus.

Las placas de UV las comparamos con las normales y si observamos que tenemos la misma cantidad de las de control, quiere decir que estamos en presencia de virus.

Fases de la investigación

La investigación se dividió en 3 etapas las cuales fueron: La etapa primaria se trató de la adecuación de los recursos con los que se van a trabajar, en esta etapa se realizaron las tareas de aislamiento de los consorcios bacterianos como también realizar el seguimiento de su crecimiento mediante el conteo microbiano en placas. También se adecuó la concentración de HTP en la tierra a tratar y llevarla a una concentración del 10% en HTP mediante la técnica de cuantificación de aceites grasas e hidrocarburos.

En la segunda etapa se realizaron muestreos en cada bandeja por triplicado en donde a cada muestra se le realizaron estudios de cuantificación de hidrocarburos y estudios de crecimientos microbianos para así conocer el comportamiento del sistema a través del tiempo. Dichos muestreos se realizaron en lapsos de tiempos no constantes debido a que la degradación de petróleo por vía remediación es más acelerada en las primeras semanas por lo que se diseñó un sistema de muestreo para nuestro caso de estudio el cual se puede observar en la figura 9.

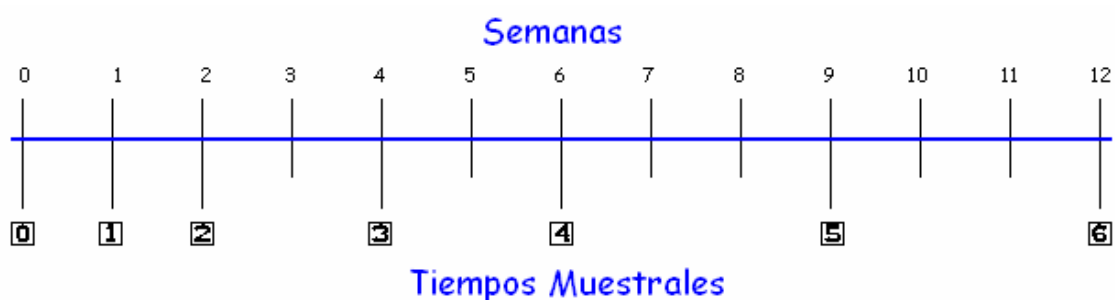


FIGURA 9. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LOS TIEMPOS MUESTRALES

En la última etapa de la investigación se realizó el análisis estadístico y de los datos obtenidos a través de la investigación y se hizo un análisis del comportamiento obtenido durante todos los tiempos muestrales, para finalizar y realizar las conclusiones pertinentes.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Presentación y análisis de los resultados obtenidos en la investigación

Caracterización del suelo desde el punto de vista de humedad

El promedio de humedades de cada unidad experimental se muestra en la tabla 3. Esta se encuentra dentro del rango que permite la mayor biodegradación posible de los HTP, ya que de acuerdo a Ercoli *et al* (2000), el porcentaje de humedad óptimo para el crecimiento bacteriano durante la degradación de HTP se encuentra dentro del rango de 10-18 %.

TABLA 3. PORCENTAJE DE HUMEDAD PROMEDIO EN LA TIERRA

Unidad Experimental	Peso de tierra húmeda (gr)	Peso de tierra seca (gr)	% de humedad
BIOAUMENTACIÓN ALÓCTONA	6,400	5,470	14,605
BIOESTIMULACIÓN	6,375	5,305	16,815
BIOAUMENTACIÓN AUTÓCTONA	6,360	5,445	14,39
BIOSURFACTANTE	6,665	5,675	14,815
CONTROL	6,315	5,355	15,165

Fuente: Elaboración propia

Aplicación la técnica de cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo en un suelo intemperizado

El método para la cuantificación de HTP se realizó por gravimetría y por recuperación de hidrocarburos por extracción líquido-líquido eliminando el solvente mediante destilación (Véase Capítulo III: Metodología, Sección: *Determinación de Grasas, Aceites y HTP* en el aparte cuantificación de HTP por gravimetría). Los

resultados por ambos métodos fueron consistentes y no se observó diferencia significativa.

En las tablas 4 y 5 se puede observar la concentración de hidrocarburos en los 3 tipos de suelos (Véase Capítulo III: Metodología, Sección: *Fuentes y Técnicas de recolección de datos*, en el aparte *Caracterización del suelo intemperizado*), analizándose 3 muestras de cada tipo de suelo y usándose luego los valores obtenidos para calcular la cantidad de cada uno de los lotes de suelos (denominados como alto, medio y bajo impacto) necesaria para obtener una concentración de HTP de aproximadamente 10% p/p.

TABLA 4. PORCENTAJE DE HTP EN LA TIERRA: BAJO, MEDIO Y ALTO IMPACTO DE PETRÓLEO OBTENIDO POR GRAVIMETRÍA.

Muestra	(%)
Alto Imp. (AI)	22,13
Medio Imp. (MI)	12,44
Bajo Imp. (BI)	0,57

Fuente: Elaboración propia

TABLA 5. PORCENTAJE DE HTP EN LA TIERRA: BAJO, MEDIO Y ALTO IMPACTO DE PETRÓLEO OBTENIDO POR EXTRACCIÓN LIQ-LIQ.

Muestra	(%)
Alto Imp. (AI)	24,60
Medio Imp. (MI)	10,62
Bajo Imp. (BI)	0,50

Fuente: Elaboración propia

La proporción de cada tipo tierra necesaria para elaborar las unidades experimentales de 2 kg cada una, los resultados obtenidos se pueden apreciar en la tabla 6.

TABLA 6. CANTIDAD DE TIERRA POR UNIDAD EXPERIMENTAL

Muestra	Peso Tot (Kg)
Alto Imp. (AI)	0,6
Medio Imp. (MI)	0,5
Bajo Imp. (BI)	0,9

Fuente: Elaboración propia

Seguimiento de la degradación de HTP en las unidades experimentales.

Para seguir el comportamiento a través del tiempo de cada unidad experimental, se realizaron muestreos en cada momento indicado en el esquema de la figura 9 (capítulo anterior).

El tratamiento en cada unidad experimental y su duplicado respectivamente fueron inoculados adecuadamente ya que su desempeño durante la experiencia no se vio afectado de manera alguna lo cual nos favorece en el momento de realizar los análisis respectivos en cada caso, esto se puede afirmar al observar los resultados obtenidos en el análisis de varianza de la tabla 7, aplicado a los valores de las muestras reportados por cada unidad experimental. Como se puede apreciar el valor de la función F es menor que el valor crítico para F lo cual indica que existe concordancia entre los resultados obtenidos para cada muestra. Por otro lado el valor de la probabilidad es mayor que a 0.05 el cual es el límite inferior para concluir que la probabilidad de que los datos sean representativos del sistema.

TABLA 7. ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LAS MUESTRAS PRINCIPALES Y DUPLICADOS

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre muestras	1,656	0,227	4,964

Fuente: Elaboración propia

Al realizar el análisis de varianza entre las unidades experimentales para comprobar si existe alguna relación entre sí, como también para comprobar que la variación en los valores de TPH a través del tiempo es representativa se presentan en la tabla 8, donde se puede apreciar que a diferencia del caso anterior los valores de F obtenidos son mayores a los valores críticos calculados para F lo cual indica que tanto para los tratamientos y los tiempos muestrales es rechazada la hipótesis de que podrían ser dependientes y que la probabilidad de que algún dato entre si pueda ser dependiente es casi nula.

TABLA 8. ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre Tratamientos	15,045	2,76E-06	2,780
Entre tiempos de muestreo	20,184	2,74E-08	2,510

Fuente: Elaboración propia

Sin embargo al observar que los comportamientos de los tratamientos de bioaumentación autóctona y biosurfactante eran similares se realizó el estudio entre ambos, obteniendo un resultado negativo en cuanto a dependencia de un método con respecto al otro como se puede observar en la tabla 9.

TABLA 9. ANÁLISIS DE VARIANZA ENTRE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES BIOSURFACTANTE Y BIOAUMENTACIÓN ALÓCTONA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre Tratamientos	14,384	9,046E-03	5,987

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 10 se puede observar el porcentaje de degradación bruta del crudo en cada unidad experimental en el tiempo final. Resaltan los porcentajes obtenidos en las unidades experimentales de bioaumentación autóctona y biosurfactante en donde este último fue el que obtuvo un mayor porcentaje de degradación de todas las técnicas estudiadas.

TABLA 10. PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN DE CRUDO EN CADA UNIDAD EXPERIMENTAL

Unidad Experimental	% de degradación
BIOESTIMULACIÓN	24,470
BIOAUMENTACIÓN AUTÓCTONA	41,540
BIOAUMENTACIÓN ALÓCTONA	55,610
BIOSURFACTANTE	59,460
CONTROL	13,530

Fuente: Elaboración propia

Estos porcentajes de degradación son aceptables, ya que según [Hinchee \(1994\)](#) en su trabajo titulado “Applied Biotechnology for Site Remediation” dice que obtener un porcentaje de degradación mayor al 45% dentro de las primeras 16 semanas, para nuevas tecnologías de biorremediación, y como se pudo observar en la tabla anterior los resultados se encuentran cerca o superiores a dicho valor a pesar de haber tenido 14 semanas de estudio.

En la figura 10 se puede observar el comportamiento de los hidrocarburos totales de petróleo a través del tiempo mostrando que, aparentemente, la comunidad microbiana tiene un gran efecto sobre el crudo presente en cada unidad experimental.

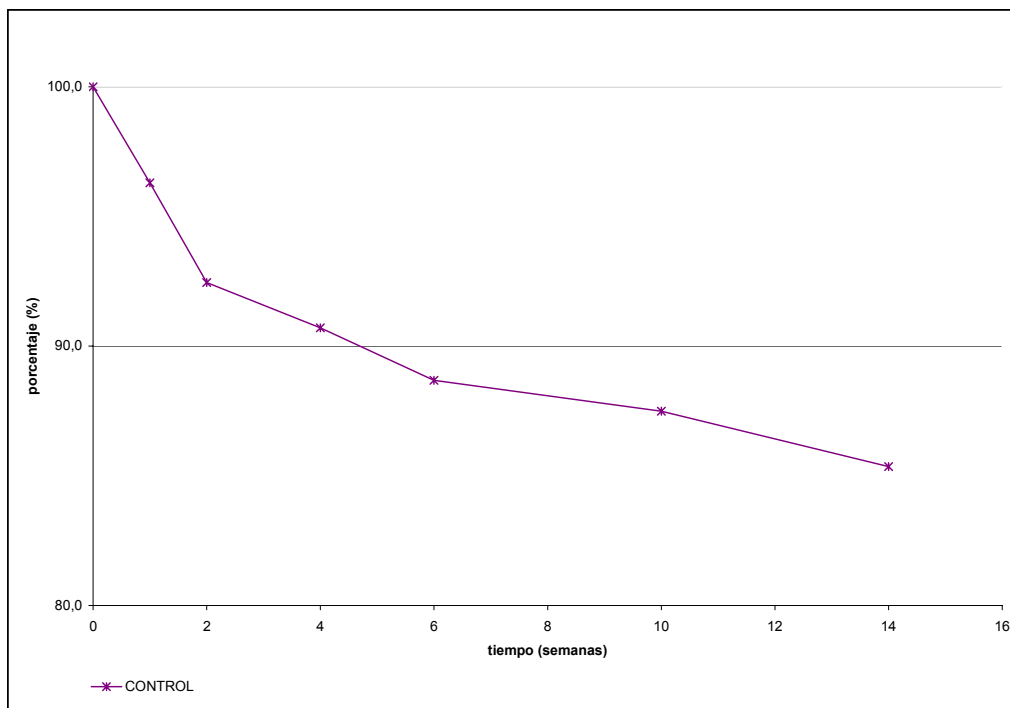


FIGURA 10. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN HTP TOTAL EN UNIDAD EXPERIMENTAL DE CONTROL EN EL TIEMPO

En la figura 10 la tendencia de la unidad experimental de control se debe que a la cantidad de hidrocarburos de bajo peso molecular presente inicialmente disminuye su concentración en mayor proporción que los de mayor peso molecular, ya que la metabolización de las bacterias es menos costoso desde el punto de vista energético y por la misma razón su tiempo de degradación es menor. También se le atribuye a que la concentración de bacterias que fueron inoculados o autóctonas disminuyen su concentración a lo largo de experimento produciéndose mas lenta la degradación.

En la figura 11 se puede observar el comportamiento de los hidrocarburos totales de petróleo a través del tiempo de las unidades experimentales con el control mostrando que, aparentemente, la comunidad microbiana tiene un gran efecto sobre el crudo presente en cada unidad experimental.

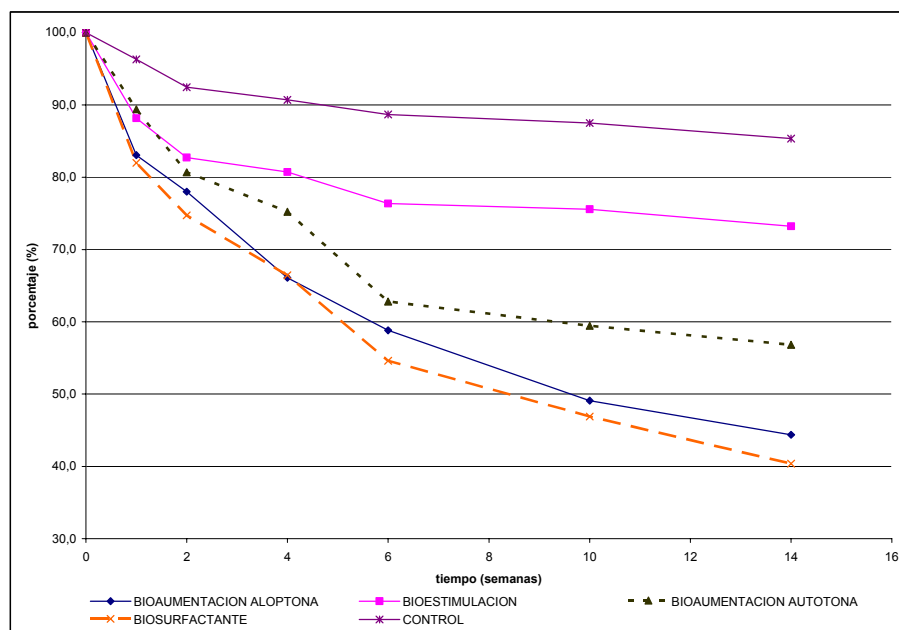


FIGURA 11. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN HTP TOTAL EN CADA UNIDAD EXPERIMENTAL EN EL TIEMPO

El comportamiento de la unidad experimental de control fue el esperado, obteniéndose un bajo porcentaje de degradación de crudo (13,53%) realizado por la población bacteriana autóctona sin agregar ningún tipo de nutrientes. Dicho comportamiento es atribuible al efecto de la atenuación natural, entendiéndose como atenuación natural al efecto del medio ambiente (tanto la migración de compuestos, como transformación natural biótica y abiótica de los mismos). Cabe destacar que este fenómeno debería ser menor en la naturaleza que en las unidades experimentales, ya que en éstas mejora la disponibilidad de O₂ mediante el movimiento y aireación y las demás variables como humedad están controladas.

Como se desprende de la tabla 7 y la gráfica 11 el orden de eficiencia en la degradación sería el siguiente

- 1) Biosurfactante
- 2) Bioaumentación alóctona,
- 3) Bioaumentación autóctona,
- 4) bioestimulación y por último la unidad experimental de control.

La técnica de bioaumentación con el consorcio bacteriano estimulado para la producción de biosurfactantes, tuvo un mayor desempeño en la biodegradación de crudo lo cual puede ser atribuido a una mayor capacidad de producción de surfactantes. Estos podrían haber disminuido la tensión superficial existente entre la fase acuosa del medio y el crudo presente, aumentando el área transferencia entre el consorcio bacteriano y el crudo, aumentando la biodisponibilidad y la solubilidad aparente entre el crudo y el agua.

Con respecto a la técnica de bioaumentación alóctona se pudo notar también un gran porcentaje de degradación ya que dicho consorcio fue seleccionado por su alto y probado desempeño en el proceso de biodegradación.

Las técnicas de bioaumentación autóctona y bioestimulación son muy similares ya que ambas dependen de la comunidad bacteriana autóctona con la diferencia de que en la bioaumentación autóctona la comunidad bacteriana que presente la actividad deseada es aumentada en concentración y en población teniendo una mayor cantidad de bacterias, mejorando su desempeño, a diferencia de la

bioestimulación la cual solo consiste en agregar los nutrientes necesarios para garantizar la prosperidad de la comunidad bacteriana autóctona.

Se puede observar adicionalmente que la actividad biodegradativa fue más intensa en las primeras 4 semanas, esto se puede deber a que la concentración de hidrocarburos ricos desde el punto de vista energético (compuestos saturados y aromáticos del petróleo) se encuentran en una mayor concentración. Estos hidrocarburos son “ricos” energéticamente debido a que sus estructuras simples y bajo peso molecular, permiten una mejor movilización y su degradación produce una mayor cantidad de energía neta para los microorganismos.

Posteriormente se puede observar una degradación más lenta, debido a que las moléculas de fácil degradación disminuyeron su concentración haciendo necesaria la transformación de moléculas más complejas cuya degradación tiene un rendimiento energético menor.

Para remediar ello se emplean técnicas como la utilización de consorcios bacterianos ajenos a la comunidad nativa (alóctonos) con actividad degradativa comprobada como también el uso de consorcios bacterianos capaces de producir biosurfactantes lo que ayuda a las bacterias nativas a obtener un acceso más fácil a estas complicadas estructuras, como se puede observar en la pendiente de la curva de biosurfactante es más pronunciada que las demás, como exponen Laha, y Luthy (1992) en su trabajo titulado “Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-Water systems” en donde indican la importancia de los surfactantes en los tratamientos de biodegradación.

Al realizar una normalización de los datos con respecto al control (figura 11) se obtiene una representación del porcentaje de TPH descontando los efectos de disminución de crudo atribuidos a la atenuación natural de los contaminantes a los tratamientos, permitiendo así analizar el efecto neto de cada técnica sobre los contaminantes. En esta figura se puede apreciar que la curva de degradación de la unidad experimental de control no se muestra, esto se debe a que los resultados obtenidos en dicha unidad experimental fueron atribuidos al efecto de atenuación natural.

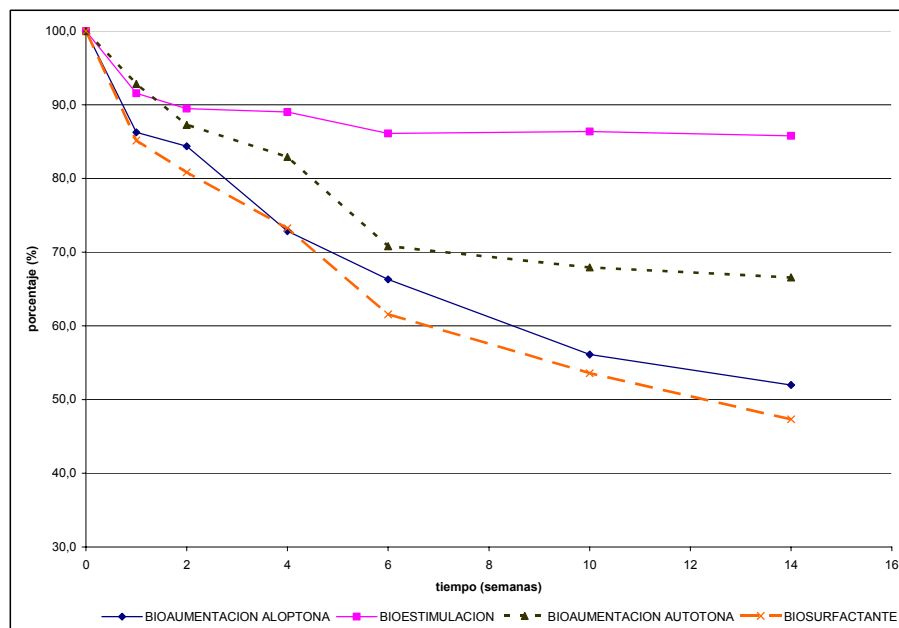


FIGURA 12. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN HTP NETA EN CADA UNIDAD EXPERIMENTAL EN EL TIEMPO

Como se puede observar la curva de bioestimulación y la pendiente de la segunda a la cuarta semana comienza a disminuir para luego en la semana 6 en adelante es casi cero lo que nos sugiere que la actividad observada después de la semana 6 es atribuible a la atenuación natural, como lo confirma el coeficiente de correlación Spearman donde dicho valor fue de 0.13 lo cual indica que no existe una relación lineal entre las variables, confirmando que la variable en nuestro caso el porcentaje de hidrocarburos es casi constante. Esto indica que a partir de este punto sería necesario tomar alguna acción, como la adición de nutrientes adicionales, para recuperar la actividad, o dar el tratamiento por concluido.

Por otro lado en los demás tratamientos se observa que aún conservan capacidad degradativa, manteniendo así la tendencia observada sin omitir los efectos de la atenuación natural. Aunque claramente se logra distinguir que los tratamientos de bioaumentación alóctona y biosurfactante son mucho más efectivos que la bioaumentación autóctona.

Seguimiento de las fracciones S.A.R.A. en las unidades experimentales.

En la figura 13 se muestran los datos obtenidos de las unidades experimentales al realizar la caracterización de crudos mediante el fraccionamiento S.A.R.A. (Saturados, Aromáticos, Resinas y Asfaltenos).

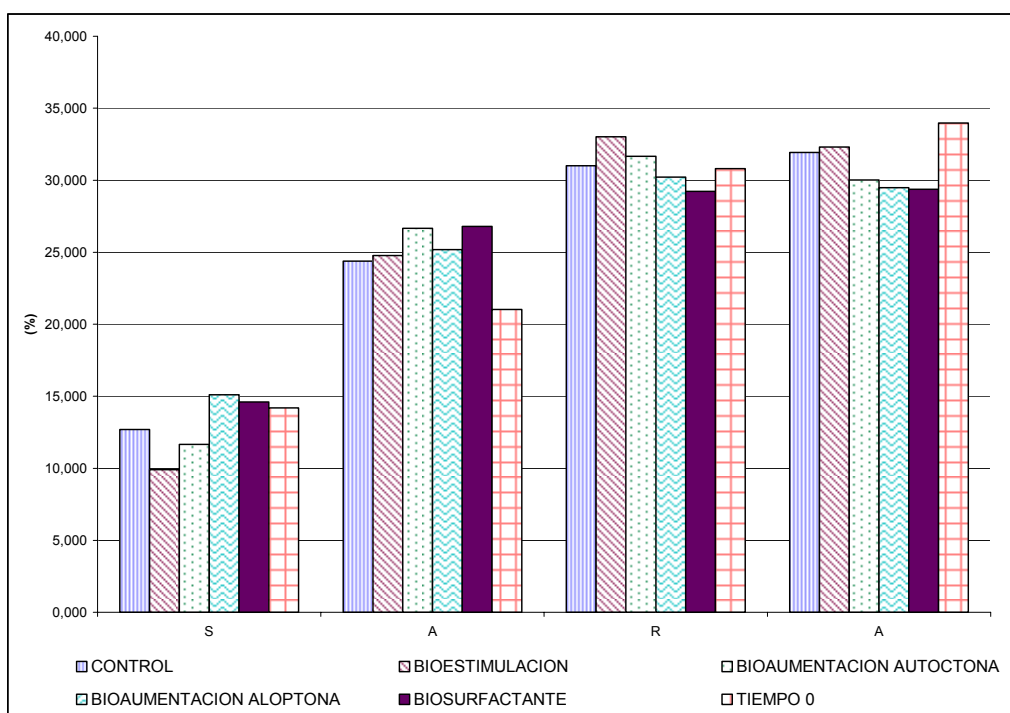


FIGURA 13. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN OBSERVADA EN LAS FRACCIONES S.A.R.A. DE HIDROCARBUROS EN LAS UNIDADES DE EXPERIMENTALES.

Se puede observar que los porcentajes de hidrocarburos son similares a los registrados en el tiempo 0 de la investigación, con una diferencia: en los porcentajes de saturados presentes en la unidad de control son menores, lo cual indica que los organismos autóctonos fueron capaces de degradar una pequeña fracción de estos compuestos, como también la evaporación de los compuestos más volátiles pudo afectar dicha composición.

También se observa un comportamiento similar al de la unidad experimental de control, lo cual nos indica que el tratamiento de biestimulación se limita a degradar en mayor cantidad los hidrocarburos de cadena corta o de estructuras moleculares sencillas como lo es el caso de los saturados y aromáticos.

El beneficio de esta técnica es que al agregar nutrientes se observa una mayor conversión de hidrocarburos ya que se garantiza el crecimiento de la población de bacterias autóctonas.

Así mismo en la figura 13 se observan los resultados obtenidos del fraccionamiento S.A.R.A. para las técnicas de bioaumentación autóctona y bioaumentación alóctona respectivamente, en las que se aprecia un comportamiento muy parecido, lo cual nos indica que los organismos autóctonos inoculados en altas concentraciones logran resultados muy parecidos que al utilizar organismos ajenos. Aunque cabe destacar que el desempeño de la unidad experimental de biosurfactante fue mayor en términos generales, ya que, hablando de degradación total mediante el conteo de HTP tuvo un mayor porcentaje y al observar el porcentaje de asfaltenos obtenidos fue menor en comparación con las técnicas ya analizadas.

Para finalizar la figura 13 muestra los porcentajes de cada una de las fracciones de hidrocarburos S.A.R.A. en el caso de la unidad experimental de biosurfactante. Se puede apreciar claramente que el desempeño de la unidad experimental de biosurfactante fue diferente al observado en las técnicas anteriormente estudiadas, ya que aparentemente, gracias a la activación en medio que favorezca la producción de surfactantes y la mayor cantidad de la bacteria productora de los mismos en esta unidad experimental la degradación de las fracciones de resinas y asfaltenos fue mayor ya que estas fracciones más pesadas se vuelven más biodisponibles, lo que equivale decir a que estas interaccionan más fácilmente con el agua (un incremento en la solubilidad aparente) habiendo así una mayor interacción crudo-bacteria.

Como se observa en los porcentajes de cada fracción al ser parecidos nos indica que en la degradación no hubo preferencia marcada hacia las moléculas de poca complejidad como los son los saturados y aromáticos.

Con estos resultados se puede afirmar que de las técnicas aplicadas la más efectiva fue la de biosurfactante ya que se obtuvo una gran porcentaje de degradación y un desempeño destacado al observar que logró una mayor conversión de las fracciones asfálticas del crudo, siendo esta la mas problemática de eliminar en los casos de contaminación de suelos por crudos.

En la figura 14 se encuentran los porcentajes de biodegradación observados en cada fracción de hidrocarburos al ser calculados la cantidad inicial encontrada y la final, en donde se destacan los comportamientos de los tratamientos de bioaumentación alóctona y biosurfactante los cuales muestran porcentajes de degradación, parecidos en cada una de las fracciones, indicando que no hubo preferencia en la degradación de alguna fracción en específico como ocurrió con los demás tratamientos en los que se observó una mayor degradación en las fracciones mas ligeras.

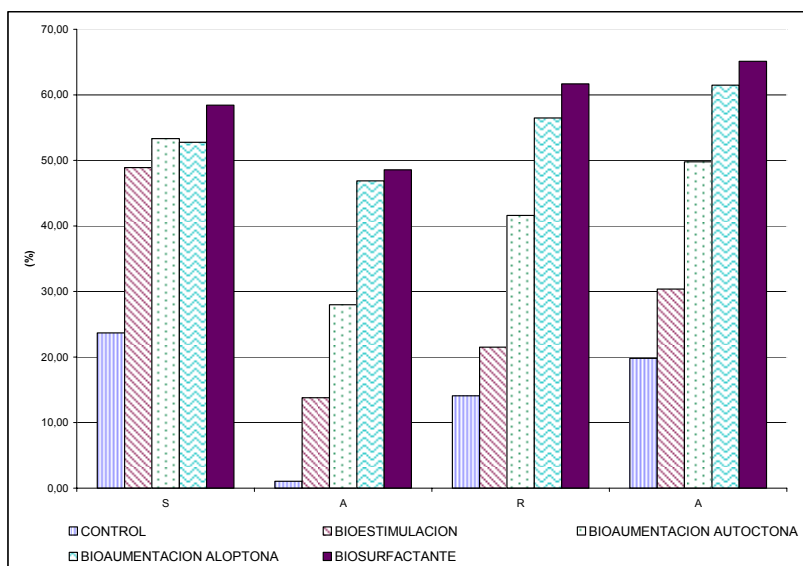


FIGURA 14. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE DEGRADACIÓN OBSERVADA EN LAS FRACCIONES S.A.R.A. DE HIDROCARBUROS EN LAS UNIDADES DE EXPERIMENTALES.

En la tabla 11 se muestran un análisis de los resultados obtenidos en las pruebas de caracterización S.A.R.A. tanto en el tiempo inicial como en el final de muestreo. También se incluyen los porcentajes de degradación de TPH obtenidos al

inicio y al final de la investigación. En donde se resaltan los porcentajes de biodegradación de cada técnica con respecto a la cantidad inicial de cada fracción.

TABLA 11. COMPARACIÓN DE LOS PORCENTAJES DE DEGRADACIÓN EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

Tratamientos	Tiempo en semanas	Degradación de TPH (%)	S	A	R	A
Control	0	0,00	14,19	21,03	30,80	33,97
	14	14,65	12,69	24,38	31,01	31,92
	% de biodegradación		23,68	1,07	14,08	19,80
Bioestimulación	0	0,00	14,19	21,03	30,80	33,97
	14	26,78	9,91	24,77	33,02	32,31
	% de biodegradación		48,89	13,80	21,51	30,36
Bioaumentación autóctona	0	0,00	14,19	21,03	30,80	33,97
	14	43,18	11,66	26,66	31,66	30,02
	% de biodegradación		53,30	27,98	41,60	49,79
Bioaumentación alóctona	0	0,00	14,19	21,03	30,80	33,97
	14	55,63	15,11	25,18	30,22	29,49
	% de biodegradación		52,76	46,88	56,47	61,48
Biosurfactante	0	0,00	14,19	21,03	30,80	33,97
	14	59,62	14,61	26,79	29,23	29,37
	% de biodegradación		58,42	48,56	61,68	65,09

Fuente: Elaboración propia

Se puede observar en la tabla 11 al igual que en la figura 13 que un comportamiento en común entre las unidades experimentales de control, bioestimulación y bioaumentación autóctona es que la fracción de los saturados disminuyó con el tiempo lo cual es un comportamiento esperado ya que es la fracción más volátil de todas. Por otro lado se aprecia que la fracción de las resinas aumentó

con el tiempo. Esto no necesariamente implica una ausencia de degradación de las resinas, ya que esta aparente falta de degradación se puede atribuir al hecho que durante el trabajo hayan ocurrido rupturas de enlaces críticos que unan los centros de heteroaromaticidad en la fracción de asfaltenos como indica Blumer y Youngblood en su trabajo “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Recent Sediments” en donde se explica este hecho por la ruptura de enlaces en moléculas de alto peso molecular para formar varias de menor peso.

En los tratamientos de bioaumentación alóctona y biosurfactante los porcentajes tanto de las fracciones de resinas y asfaltenos disminuyeron lo cual indicaría que hubo una degradación equivalente en todas las fracciones, por ello se observa una semejanza entre los porcentajes de cada fracción en el tiempo final de muestreo.

Seguimiento del crecimiento de UFC en las unidades experimentales.

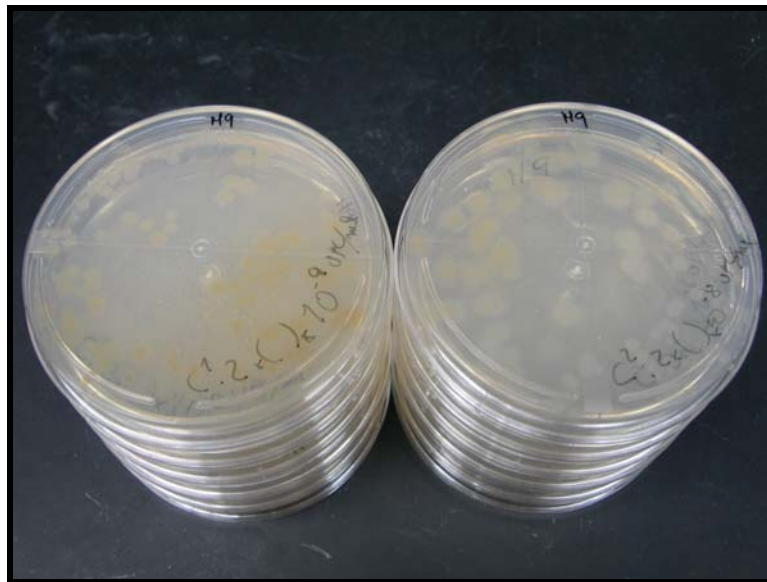
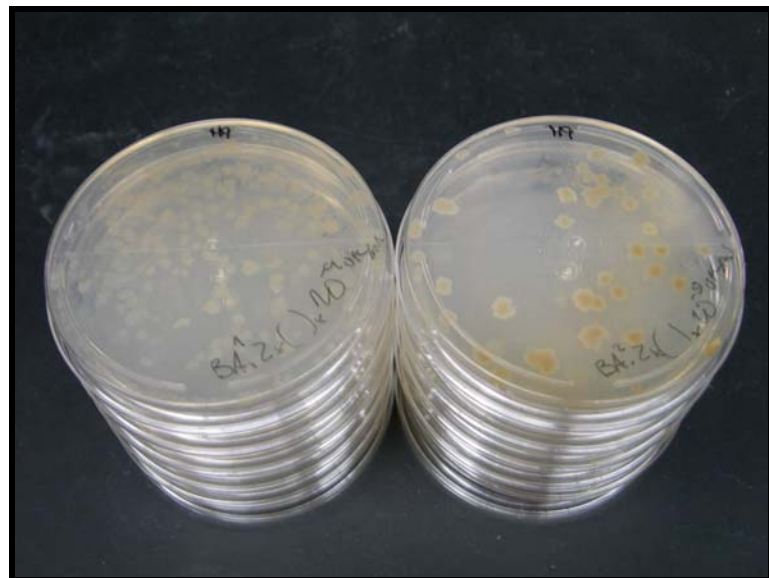


FIGURA 15.FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DEL CONTROL



FIGURA 16. FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DE BIOESTIMULACION



**FIGURA 17. FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DE BIOAUMENTACION
AUTOCTONA**

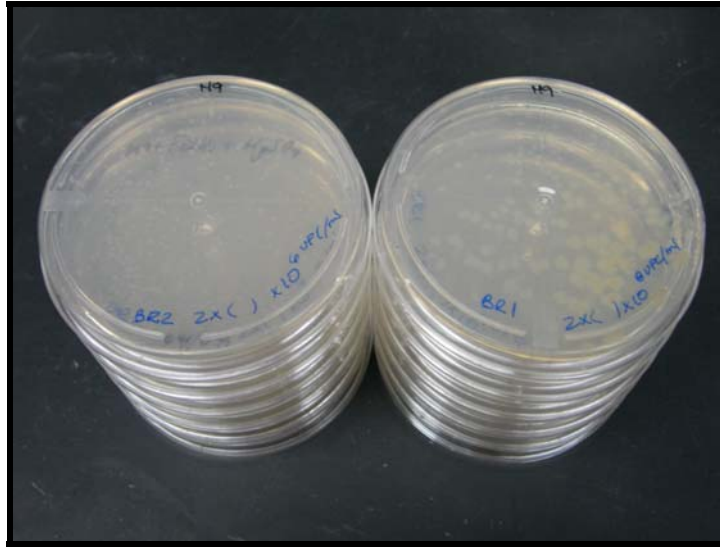


FIGURA 18. FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DE BIOAUMENTACION ALOPTONA

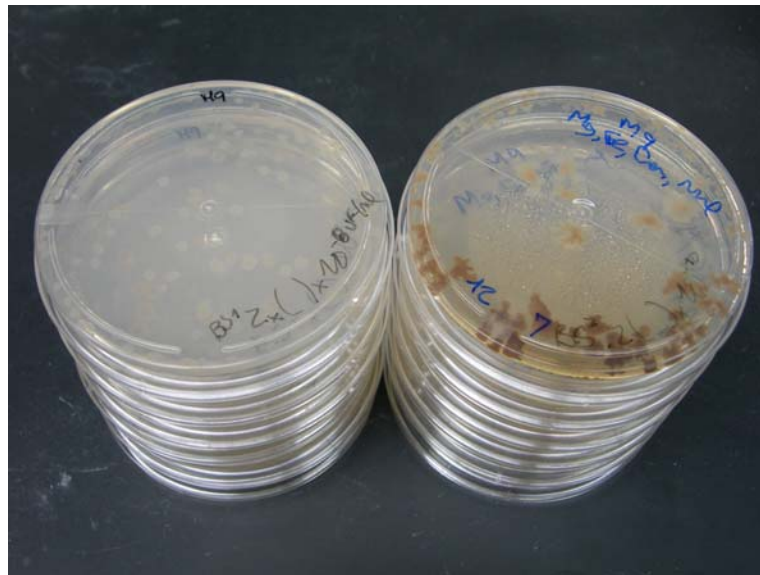


FIGURA 19. FOTO DE SEMBRADO EN PLACAS DE T0 DE BIOSURFACTANTE

En las figuras 15, 16, 17, 18 y 19 se presenta el conteo en placas inicial con su duplicado (Véase Capítulo III: Metodología, Sección: *consorcio microbiano* en el conteo de unidades formadoras de colonias) del experimento observando en cada una de ellas el crecimiento bacteriano. En el control el título inicial fue de $2,26 \times 10^6$

UFC/ml, de bioestimulación 1×10^6 UFC/ml y bioaumentación autóctona, bioaumentación alóctona y biosurfactante fue mayor a 1×10^{10} UFC/ml.

Se puede apreciar en la figura 20 los resultados obtenidos al realizar conteos de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) en todas las unidades experimentales.

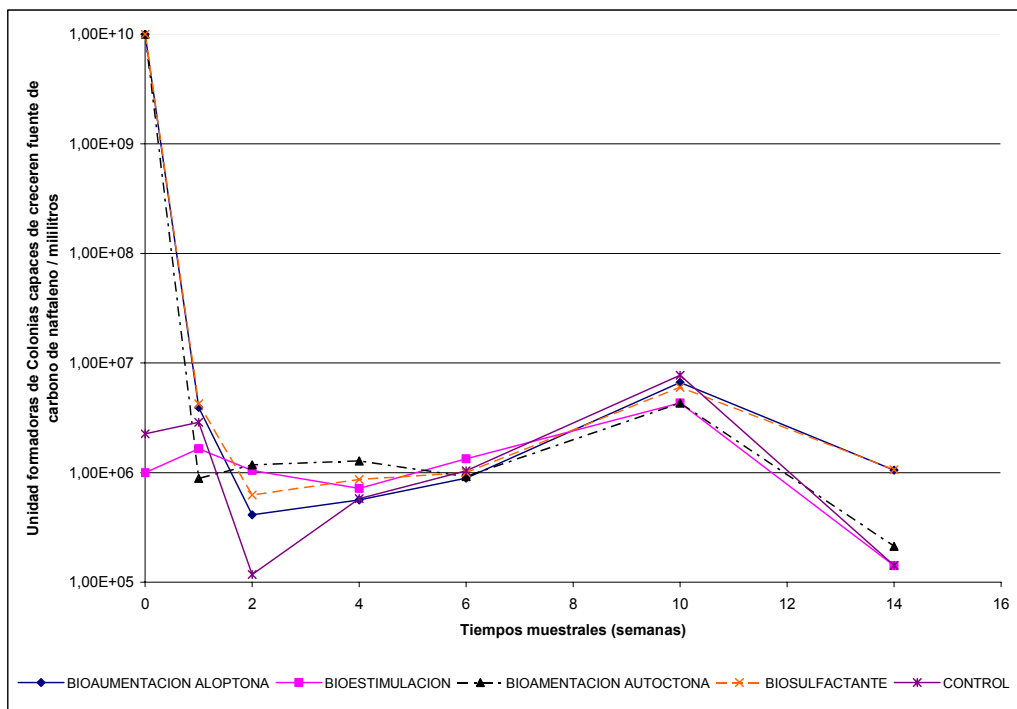


FIGURA 20. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL CONTEO DE UFC EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

Se puede apreciar en la figura 21 los resultados obtenidos al realizar conteos de UFC (Unidades Formadoras de Colonias) en todas las unidades experimentales, realizándose una ampliación en la zona más concurrida.

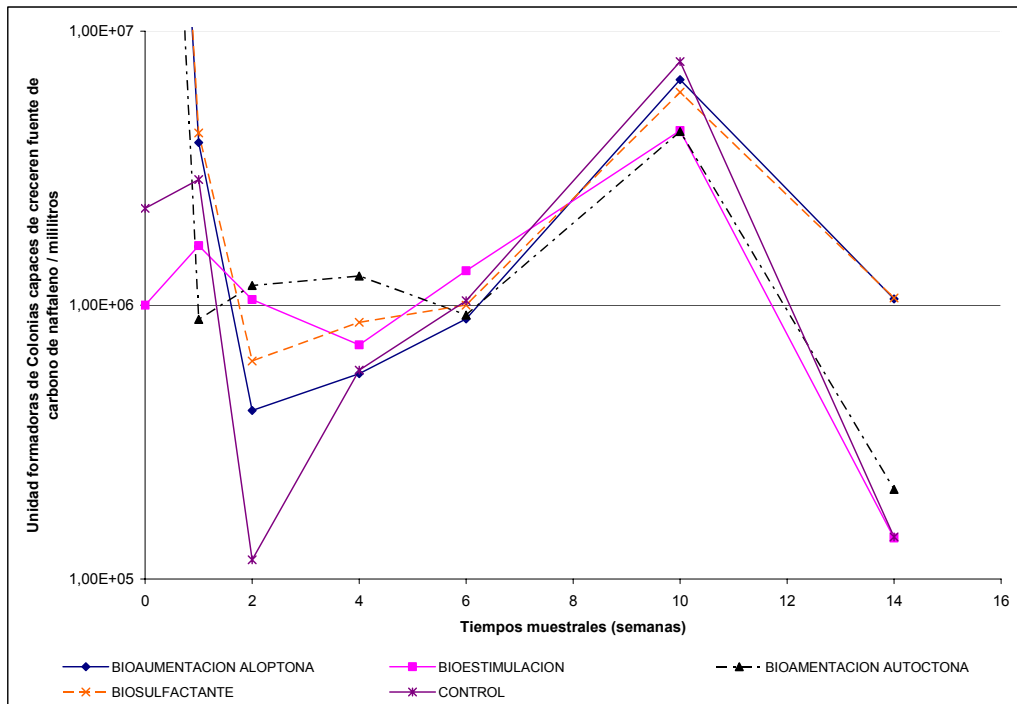


FIGURA 21. AMPLIACIÓN DE LA REGIÓN MÁS IMPORTANTE DE LA REPRESENTACIÓN GRÁFICA DEL CONTEO DE UFC EN LAS UNIDADES EXPERIMENTALES (FIG.17)

En las Figuras 20 y 21 se muestran los conteos de bacterias capaces de crecer en naftaleno como única fuente de carbono para cada unidad experimental (control, bioestimulación, bioaumentación autóctona, bioaumentación alóctona) biosurfactante presentando en ella los UFC/ml frente al tiempo en semanas.

Una vez comenzado la inoculación de cada una de las unidades experimentales se inicia el seguimiento de crecimiento bacteriano desde la semana 0 hasta la semana 14 donde se finaliza el experimento. Se observa que el crecimiento en el método de bioaumentación autóctona, bioaumentación alóctona y biosurfactante como se esperaba tiene un conteo inicial bastante alto de bacterias (1×10^{10} UFC/ml) con respecto al control y unidad experimental de bioestimulación (1×10^6 UFC/ml). Este resultado se debe a que para los primeros tres tratamientos se realizó un aumento previo de las bacterias autóctonas, el consorcio de bacteriano del laboratorio y las

bacterias productoras de surfactantes respectivamente y para la bioestimulación y el control no se aplicó ningún tratamiento ya que en este método no implica una inoculación.

Se puede observar de la semana 0 a la 2 de la inoculación en el suelo que en las unidades experimentales de bioestimulación y control comienzan a aumentar con un título de $2,88 \times 10^6$ UFC/ml y $1,65 \times 10^6$ UFC/ml respectivamente; esto se debe a que se le adicionó a la población microbiana autóctona de la unidad experimental de bioestimulación nutrientes que ayudan a su multiplicación; así como también a la unidad experimental de control siendo testigo (blanco del experimento) de estos tratamientos no se modificó creciendo naturalmente en su medio. Sin embargo de la semana 1 a la 2 la unidad experimental de control tiene un declive pronunciado esto fue a causa de un cambio brusco de temperatura en el laboratorio lo que ocasionó la pérdida extrema de humedad en estas unidades experimentales trayendo como consecuencia una alta muerte celular. En este punto se agregó a la tierra una cantidad adicional de agua destilada para llevarla a la misma humedad de las otras unidades experimentales para seguir con el control total de las variables de temperatura, humedad, densidades cada una de ellas

Para este lapso de tiempo en las unidades experimentales de bioaumentación autóctona, bioaumentación alóctona y biosurfactante descendieron más de 4 potencias a títulos de $8,88 \times 10^5$ UFC/ml, $3,93 \times 10^6$ UFC/ml y $4,25 \times 10^6$ UFC/ml respectivamente. Ocurriendo que para estas unidades experimentales las bacterias venían de un medio fresco y rico y al inocularse a un medio viejo y más pobre que carecen de determinados componentes esenciales trayendo como consecuencia la muerte de algunas células tras lo cual tiene que transcurrir un cierto tiempo para que ellas se acostumbren al nuevo medio. A este proceso se le puede llamar fase de adaptación.

No solo por eso sino que también estos métodos se inocula una cantidad de organismos que excede grandemente la capacidad de carga del sistema (la capacidad del medio de sostenerlas con vida) los organismos presentes comenzarán a morir hasta alcanzar un equilibrio donde su cantidad sea menor a la capacidad de carga del ecosistema. La teoría indica que la mayoría de los microorganismos unicelulares

crecen exponencialmente pero esta velocidad de crecimiento puede variar por los efectos nutricionales, genéticos así como también las condiciones ambientales como temperatura, composición del medio de cultivo; esta teoría reafirma lo antes discutido (Madigan *et al*, 1998).

A partir de la semana 2 a la semana 10 hay un crecimiento continuo de las bacterias debido a que su adaptación ha sido efectiva e inician su crecimiento. Los títulos de los tratamientos de la semana 6 a la 10 de las unidades de experimentación se muestran en la tabla 12.

TABLA 12. TÍTULOS DEL CRECIMIENTOS DE CADA UNA DE LAS UNIDADES EXPERIMENTALES

Unidad Experimental	Título UFC/ml	Título UFC/ml
	semana 6	semana 10
Control	5,97x10 ⁵	7,75x10 ⁶
Bioestimulación	1,36x10 ⁶	4,33x10 ⁶
Bioaumentación autóctona	1,28x10 ⁶	4,31x10 ⁶
Bioaumentación alóctona	5,63x10 ⁵	6,65x10 ⁶
Biosurfactante	8,66x10 ⁵	5,99x10 ⁶

En la figura 21 y en los datos de la tabla 12 se puede ver claramente que el crecimiento de cada una de las unidades experimentales fueron casi lineales, también se observó que la tendencia de los tratamientos son muy parecidos.

Esto se puede explicar a medida que las bacterias capaces de degradar los hidrocarburos estaban creciendo también comenzó a crecer otro tipo de comunidad que eran capaces de crecer en naftaleno, esto se puede afirmar ya que se observó en la placas una cambio de formas de colonias lo cual indicaba un nuevo crecimiento; también se puede observar claramente en la figura 20 donde la tendencia desde la semana 6 a la 10 es menos pronunciada que en los tiempos anteriores, a excepción de los tratamientos de bioaumentación alóctona y de biosurfactante siguen con una mayor actividad degradativa. En el caso de biosurfactante que es el de mayor crecimiento con un título de 5,99x10⁶ UFC/ml, las bacterias aumentan la interacción,

aumenta la solubilidad de los contaminantes y acelera la degradación de varios tipos de hidrocarburos poliaromáticos dando lugar a que su decrecimiento sea más lento de las demás.

Finalmente se observa que de la semana 10 a la semana 14 hay una disminución en el conteo de las bacterias y también se observaron placas de lisis, posiblemente debidas a un fago (virus de bacterias) que trajo como consecuencia una mortalidad alta en todos los tratamientos y el control. Esto fue confirmado por experimentos de lisis que se realizaron adicionalmente (Véase Capítulo III: Metodología, Sección: *procedimiento para comprobar placas liticas*). En este experimento se observó que para la bacteria *Pseudomonas putida* NCBI 9816 y para la E. Coli DH5- α había en las placas una clara disminución de una potencia en el título obtenido (1×10^{10} UFC/ml a 1×10^9 UFC/ml) evidenciando la presencia de fagos que pudieron ser contraído del el medio ambiente. La disminución de los títulos observados de la semana 10 a la 14 también pudo ocurrir por un agotamiento de nutrientes como fósforo y nitrógeno ya que no se renovó el medio para que siguiera su actividad bacteriana Se recomendaría que en la semana 10 se vuelva a inocular y/o renovar el fósforo y el nitrógeno de tal forma de probar si se puede mantener la degradación de los TPH a un ritmo elevado por un período mayor de tiempo.

Para culminar, llama la atención que no se encontró una relación directa entre el números de células viables capaces de crecer en naftaleno y la velocidad de degradación, sugiriendo que esta pudiera depender de organismos no cultivables, es decir, en nuestro experimentos de crecimiento solo tomamos una pequeña cantidad de bacterias presente en cada unidad experimental, esto se debe a que en practica solo el 1% del total de las bacterias son cultivables lo que queda un 99% sin contabilizar pero que si están presentes en la actividad biodegradativa del los TPH dando a pensar que para los próximos experimentos se deberá tomar otro tipo organismo que sirva como indicador, se use un medio de cultivo diferente u otro método alternativo al conteo en placas, como la técnica NMP (cálculo de número más probable) (Madigan *et al.* 1998)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El mayor porcentaje de degradación en tratamientos de biodegradación se observó en las primeras 6 semanas.
- El fraccionamiento S.A.R.A. de hidrocarburos es una técnica de gran ayuda para el análisis del comportamiento de técnicas de biodegradación.
- Los organismos cultivables que son degradadores de naftaleno parecen no ser buenos indicadores de la actividad biodegradativa en las unidades experimentales.
- Las unidades experimentales de biosurfactante fueron las que tuvieron mayor actividad degradativa así como mayor crecimiento celular siendo la más efectiva.
- El periodo de efectividad de la técnica de bioestimulación pareciera ser de seis (6) semanas.
- Las técnicas de bioestimulación tiende a degradar en mayor proporción fracciones de hidrocarburos menos pesadas.
- La adición de bacterias activadas para producir biosurfactantes indica aumentar la degradación de moléculas de hidrocarburos de altos pesos moleculares.
- Las condiciones ambientales como la temperatura y la humedad son variables que afectan significativamente este tipo de experimento.
- Los resultados de crecimiento bacteriano no tienen relación con el resultado de THP debido a existencia de bacterias no cultivables que deben ser capaces de efectuar degradación.

- La bioatenuación disminuye la cantidad de hidrocarburos de bajo peso molecular encontrados en suelos.
- La bioatenuación es un factor importante que hay que tomar en cuenta en el momento de realizar un análisis del efecto neto de cualquier técnica de biorremediación.
- Observar un crecimiento en el conteo de UFC no es precisamente un indicativo de que todas colonias contadas son capaces de degradar cualquier fracción de hidrocarburos.
- La pérdida de la humedad del suelo produce una muerte celular alta.

Las técnicas de bioaumentación autóctona y bioaumentación alóctona, con y sin activación para la producción de biosurfactantes constituyen, a escala de laboratorio, una alternativa viable en términos tiempo y porcentaje de degradación para la biodegradación de TPH contaminantes de suelos.

Sumario de contribuciones

Durante la realización de este trabajo de grado se realizaron actividades adicionales para la mejor comprensión de los resultados obtenidos como lo fueron:

- Realización de fraccionamiento S.A.R.A. de hidrocarburos.
- Análisis de placas líticas, con esto se verifica si hay o no virus en el medio.
- Estandarización de procedimientos y equipos en el laboratorio de Fisicoquímica de la escuela de ingeniería química de la U.C.V. para trabajos posteriores.

Recomendaciones

Algunos de los aspectos que durante el trabajo de tesis no se cubrieron o que se pudiesen mejorar, por estar fuera de los objetivos planteados, pero podría ayudar a complementar la información generada en éste trabajo son:

- Para los próximos experimentos se deberá tomar otro tipo de método para el conteo en placas.

- Se debe evitar el uso de envases metálicos en este tipo de experimentos ya que pueden reaccionar con las sales y enzimas encontradas en las unidades experimentales.
- En el caso de no contar con bacterias capaces de producir surfactantes se puede proponer el uso de biosurfactantes en conjunto con alguna técnica de biorremediación.
- Es recomendable la realización del fraccionamiento S.A.R.A. de hidrocarburos para un mejor seguimiento de la conversión de cada una de las fracciones durante el estudio.
- Realizar procedimientos de re-inoculación y conteo de placas en la mitad del estudio para garantizar la continuidad de la degradación producida por las bacterianas inoculadas inicialmente.
- Se recomendaría que en la semana 10 se renueve una cantidad de fósforo y el nitrógeno que permitan seguir con la degradación de los TPH principalmente en todos los tratamientos menos en bioestimulación, donde se debería renovar en la semana 6.
- Se debe tener un mayor control de las variables temperatura y humedad en el suelo a tratar.

GLOSARIO

AEROBIO. Proceso bioquímico o condición ambiental que sucede en presencia de oxígeno. *Organismo que necesita de oxígeno para vivir.

ANAEROBIO. Proceso bioquímico o condición ambiental que se sucede en ausencia de oxígeno.

BIOACUMULACIÓN. El término bioacumulación hace referencia a la acumulación neta, con el paso del tiempo, de metales [u otras sustancias persistentes] en un organismo a partir de fuentes tanto bióticas (otros organismos) como abióticas (suelo, aire y agua).

BIOAUMENTACIÓN. Aceleración de los procesos biológicos a través de la inoculación de bacterias seleccionadas y preparadas para el proceso.

BIOCIDA. Agente físico o químico que puede matar organismos.

BIODEGRADABLE. Capaz de ser asimilado (descompuesto y metabolizado) por el ambiente gracias a su naturaleza química. *Sustancias que pueden ser descompuestas por microorganismos (principalmente bacterias aerobias) en un período de tiempo relativamente corto. Muchos productos artificiales son biodegradables, pero otros (insecticidas organoclorados y detergentes "duros") son muy resistentes a la acción bacteriana.

BIOPILAS. Las biopilas, son una forma de composteo en el cual se forman pilas con el suelo contaminado y agentes de volumen. El sistema, que puede ser abierto o cerrado, se adiciona con nutrientes y agua y se coloca en áreas de tratamiento, que incluyen sistemas para colectar lixiviados y alguna forma de aireación.

BIOTECNOLOGÍA. Toda tecnología que se aplica a organismos vivos para hacerlos más valiosos para el ser humano.

BIODISPONIBILIDAD. Biodisponibilidad significa la velocidad y extensión con la cual la sustancia activa es absorbida de una forma original y se hace disponible en el sitio de acción.

BIODIVERSIDAD. El número y la abundancia relativa de las diferentes especies se encuentran dentro de la expresión de Diversidad. Así, los sistemas se pueden caracterizar por la ocurrencia de pocas especies dominantes y otras con comunidades ricas en especies, en donde apenas se puede distinguir la dominancia. Sin embargo, el concepto de diversidad ecológica es mucho más amplio que el tradicional de diversidad. Este concepto abarca diferentes tipos de diversidad: La Genética, la Específica (de especies), la Estructural, la Ambiental y la Ecosistémica. Además de indicar la riqueza biótica en un espacio y tiempo determinados, dado su significado práctico, también conlleva un componente geopolítico. De esta manera, la biodiversidad tiene algunos enfoques que permiten evaluarla en términos: Taxonómicos, Ecológicos, Biogeográficos y hasta Geopolíticos. La pérdida en la "Variedad y abundancia en la vida" (diversidad ecológica) es el resultado de la transformación de los hábitats, la contaminación de origen urbano-industrial, la sobreexplotación de los recursos, la sobregeneración de residuos peligrosos y la pérdida del equilibrio original de los ecosistemas.

BIOMASA. Es la materia orgánica compuesta por los diferentes organismos de un ecosistema.

COMETABOLISMO. Se da en casos de sustratos complejos donde los microorganismos consumen un compuesto y producen enzimas para transformar otro compuesto, sobre el que no pueden crecer, en uno asimilable por su metabolismo.

COMUNIDAD. Conjunto de poblaciones animales y vegetales que conviven en una misma área en un tiempo determinado.

COMPOSTEO. Proceso de transformación de los residuos orgánicos sólidos en un producto fertilizante de suelos (composta) comparable al estiércol. El que es producido de manera natural en los bosques, se le llama "humus" o "tierra de hojas". Tiene altos contenidos de nutrientes, indispensables para el crecimiento de las plantas.

CONTAMINANTE. Toda materia o energía en cualquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural.

CONTAMINACIÓN. La presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico.

CONTROL. Procedimientos de Inspección, vigilancia y aplicación de las medidas necesarias para que se hagan cumplir las disposiciones establecidas en la Ley.

DEGRADACIÓN. Pérdida de las características que le daban valor a algo (devaluación); descomposición, transformación y pérdida del valor original de un recurso.

DESCARGA. Cambio de lugar de algo (hacia abajo); puede ser líquido o sólido. Se descargan aguas residuales, residuos peligrosos sólidos y líquidos, materia prima, etc.

DESECHO. Material en cualquier estado físico, generalmente considerado como no peligroso, que se utilizó y aunque esté completo, entero (o casi nuevo), ya no tiene o

no se le quiere dar la utilidad que puede seguir teniendo. Ejemplos son la ropa, juguetes, muebles y carros usados, desechos de guerra, etc. Es un tipo de residuo posible de ser aprovechado para reuso.

DESPERDICIO. Pedacería, depósitos (embalajes), partes incompletas o dañadas, hasta restos orgánicos que no sirven para el propósito que se adquirió. Es un tipo de residuo posible de ser aprovechado para reciclaje. También se refiere a todo aquello que no se le dá un uso adecuado o no se aprovecha de manera integral, como al agua y el mismo dinero y el tiempo que se malgastan o se pierden. Se incluye también todo tipo de energía, materia prima o elaborada, productos y combustibles no aprovechados de manera integral o total que, al no considerar su valor en el presente son potenciales productores de pérdidas significativas y/o daños al ambiente en un plazo mas largo.

ECOSISTEMA. Unidad funcional utilizada en ecología para referirse a todos los seres vivos y sus alrededores, incluyendo las interacciones recíprocas entre los organismos y el medio que los rodea.

EMISIÓN. Liberación y difusión de contaminantes (materia o energía) a la atmósfera. Se emite ruido, olores, vibraciones, radiaciones, humos, partículas, vapores, gases, VOCs, etc

EQUILIBRIO ECOLÓGICO. Es la relación de interdependencia que se establece entre los elementos que conforman el ambiente que hace posible la existencia, transformación y desarrollo del hombre y demás seres vivos. El desequilibrio se refiere a la alteración de estas relaciones de interdependencia.

EX-SITU. En latín fuera del lugar. Dícese de las acciones que se llevan adelante fuera de el lugar de interés.

FACTOR DE DILUCIÓN. Cociente del volumen (flujo o gasto) de agua de una corriente o cuerpo receptor, con el volumen (flujo o gasto) del desecho vertido en

aquella. La capacidad de una corriente para asimilar un desecho, es parcialmente dependiente de la dilución ambiental.

FLOCULO. Conjunto de partículas pequeñas aglutinadas en partículas más grandes y con mayor capacidad de sedimentación que se obtiene mediante tratamiento químico, físico o biológico.

GESTIÓN AMBIENTAL. Conjunto de actividades humanas que tienen por objeto lograr un ordenamiento del ambiente. Sus componentes principales son la Política, el Derecho y la Administración Ambiental.

HAP. Siglas de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

HTP: Siglas para Hidrocarburos Totales de Petróleo.

IDEA. Siglas de Instituto de estudios avanzados.

IMPACTO AMBIENTAL. Modificación del ambiente ocasionada por la acción del hombre o la naturaleza.

IN SITU. En latín en el lugar. Dicese de las acciones que se llevan adelante en el lugar de interés.

INDICADOR, INDICE. Variable que señala la presencia o condición de un fenómeno que no puede medirse directamente. Ratio, u otro número, derivada de una serie de observaciones, que se usa como medida de condiciones, propiedades, fenómenos, tendencias o comportamientos.

INOCULACIÓN. Este proceso incorpora microorganismos al suelo para realizar una función específica, como es la degradación de contaminantes. Los microorganismos pueden ser comerciales o preparados para un fin específico. La inoculación se usa cuando los microorganismos del suelo no pueden degradar el contaminante presente,

o cuando se producen inhibición por presencia de sales o metales pesados o cuando no alcanzan la masa crítica necesaria.

IVIC. Siglas de Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

LIXIVIACIÓN. Migración de materiales del suelo arrastrados por líquidos percolados.

METABOLISMO. Conjunto de reacciones químicas que se producen en los seres vivos.

MICROBIOTA. Organismos de distintos reinos que viven en el suelo y en el agua. Son de tamaño microscópico (no perceptibles a simple vista).

MODELO. Representación idealizada de la realidad para describir, analizar o comprender el comportamiento de algún aspecto de ella o de su totalidad. El término modelo se aplica a una amplia clasificación de representaciones, desde simples descripciones cualitativas de sistemas u organizaciones a otras altamente complejas.

MONITOREO. Acción de realizar mediciones y relevamientos. Relevamiento intermitente llevado a cabo para determinar el grado de ajuste a determinado estándar o el grado de desviación de una norma esperada.

NUTRIENTE. Sustancia que contiene alimento. Se emplea sobre todo en relación con los elementos del suelo y el agua que las plantas y animales toman. *Compuestos de nitrógeno (N) o fósforo (P) que favorecen en las aguas y suelos el desarrollo de la vida.

OMS. Siglas de Organización Mundial de la Salud.

PAH. Siglas en inglés de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Se usan como aditivos para gasolinas sin plomo, solventes, etc. Se les atribuyen acciones cancerígenas.

PDVSA. Siglas de petróleos de Venezuela sociedad anónima.

PERCOLACIÓN. Movimiento de un líquido al subsuelo por grietas y poros.

PH. Es una medida de la concentración del ión hidrógeno en el agua. Se expresa la concentración de este ión como pH, y se define como el logaritmo decimal cambiado de signo de la concentración de ión hidrógeno.

PREVENCIÓN. Conjunto de disposiciones y actividades anticipadas que se realizan con el fin de evitar daños ambientales. Es de naturaleza "Pro-activa" y surge por iniciativa de las mismas empresas por "autorregularse" quizá con el fin de evitar pérdidas y daños ambientales o con propósitos de certificación. Es una actitud mas madura de una cultura organizacional que intenta lograr permanentemente las 0 pérdidas y 0 daños.

POBLACIÓN. Grupo natural de organismos animales o vegetales de una misma especie con un material genético común.

PROTECCIÓN. Conjunto de políticas y medidas de seguridad utilizadas para cuidar el ambiente y evitar su deterioro. Es generalmente de carácter "reactivo" como respuesta a políticas coercitivas del gobierno sobre empresas, conocidas como de "mando-control".

RECUPERACIÓN. Restauración a un estado mejor o más útil de una sustancia, por ejemplo extracción de materiales útiles de los residuos.

RELLENO SANITARIO. Fracción de suelo seleccionada por estrictos estudios geológicos y de impacto ambiental, utilizada para la disposición final de los residuos sólidos urbanos. Es un área cercada e impermeabilizada en el fondo (con arcilla o plásticos gruesos y resistentes "liners"). La basura se deposita por capas cubiertas con arena y utiliza sistemas de control de gas metano producido para evitar incendios y de

recuperación de lixiviados. Se evita la disposición de residuos industriales que pudieran ser considerados como peligrosos, entre otros.

RESIDUO. Es cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento cuya calidad no permita usarlo nuevamente en el proceso que lo generó. Es un término general que se utiliza para referirse a los desperdicios, desechos y a la misma basura.

REUSO. Utilización de residuos, en su forma original, que ya habían sido previamente utilizados en una actividad, proceso o sistema.

RIESGO AMBIENTAL. Probabilidad de ocurrencia de un fenómeno que afecta directa o indirectamente al medio ambiente. Peligro (latente) ambiental al que puedan estar sometidos los seres humanos en función de la probabilidad de ocurrencia y severidad del daño.

RIPIO. Fragmentos de ladrillos, piedras y otros restos de obra de albañilería que se utilizan para rellenar, Grava.

TPH. Siglas en ingles para Total Petroleum Hydrocarbon.

TAXÓN. Es un grupo de organismos con características comunes. Taxa es el plural latino de *taxon*, y es la forma natural en inglés, pero en español, donde los neologismos son castellanizados, el plural apropiado de taxón es taxones.

TRATAMIENTO. Es la acción de transformar los residuos o sus propiedades con el fin de eliminar o evitar los riesgos no deseados a la salud del hombre y al equilibrio de los ecosistemas. Involucra actividades de limpieza, degradación, (combustión parcial), incineración (combustión total), neutralización, inmovilización y encapsulado.

SANEAMIENTO. Conjunto de acciones con el objetivo de restaurar las condiciones ambientales que habían sido modificadas o degradadas.

SUELO. se define como el conjunto de cuerpos naturales originados a partir de materiales minerales y orgánicos que contienen materia viva, y que pueden soportar vegetación en forma natural. Se pueden considerar tres etapas de formación de un suelo, primero, las rocas quedan expuestas al ambiente y se inicia un proceso de desintegración (intemperismo físico), segundo, ocurre un proceso de descomposición (intemperismo químico) y, finalmente, se inicia la invasión de vegetación (intemperismo bioquímico).

TRANSPORTE. Forma de movilidad que utiliza un contaminante para trasladarse dentro de un medio o para pasar de un medio a otro.

UFC. Siglas de Unidades Formadoras de Colonias.

UFC/lit. Es un valor que expresa el número relativo de microorganismos de un taxón determinado en un volumen de un litro de solución.

VERTIDOS. Es el efluente residual evacuado fuera de las instalaciones de los establecimientos industriales y/o especiales, con destino directo o indirecto a colectoras, cloacas máximas, conductos pluviales, cursos de agua y el suelo, ya sea mediante evacuación o depósito.

VOC. Sigla en inglés de compuesto orgánico volátil. Se refiere a todo aquel compuesto orgánico presente en la atmósfera en fase de vapor o como partícula. Pueden ser desde un hidrocarburo simple, hasta algún tipo de compuesto halogenado.

BIBLIOGRAFÍA

- Abelson, P.H. 1989, “Hydrocarbons from the low-temperature heating of a kerogen”, *Carnegie Institute Yearbook de 1980 a 1989*, v. 440, p. 255–258.
- Barcelona, M.; A. Wehrmann; J. F. Keely y W. A. Pettyjohn. 1990. “Contamination of Groundwater Prevention Assessment”, *Restoration*. Noyes Data Corporation. New Jersey.
- Bedair, H. M. y H. T. Al-Saad. 1992. “Dissolved and Particulate Adsorbed Hydrocarbons in Water of Shatt Al-Arab River, Iraq”. *Water, Air, Soil Pollution*. 61:397-408.
- Bidleman, T. F.; A. A. Castleberry; W. T. Foreman; M. T. Zaransk & D. W. Wall. 1990. “Petroleum Hydrocarbons in the Surface Water of Two Studies in the Southeastern United States”. *Est. Coast Shelf Science*. 30:91-109.
- Blumer, M. & W. W. Youngblood. 1975. “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Recent Sediments”. *Science*. 188: 53-55.
- Boldu, F., Vervoort, J., Grontehuis, J. y Van Groenestijn, J. 2002. “Sunstrate interactions during the biodegradation of Benzene, Toluene Ethylbenzene and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp strains T1”. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 2660-2665.
- Bonazountas, M. y D. Kallidromitou. 1993. “Mathematical Hydrocarbon Fate Modelling in Soil Systems”. *Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils*. Publicaciones Lewis. USA.
- Boopathy, R., Manning, J.R., Montemagno, C. y Kulpa, C.F., 1994. “Metabolism of 2,4,6-trinitrotoluene by a *Pseudomonas* consortium under aerobic conditions”, *Current Microbiology*. 28:130-137.

- Chiou, C. T.; S. E. McGroddy y D. E. Kile. 1998. "Partition Characteristics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Soils and Sediments". *Environmental Science Technology*. Vol. 32(2):264 – 269.
- Chappin, R. G. y L. R. Summerlin. 1988. "Química". Publicaciones Cultural. México.
- Cresser M.S., Smith C. y Sanger L., 1993. "Critical loads for peat soils. In: Hornung, M. and Skeffington, R.A. (Eds) *Critical Loads - Concepts and Applications*". ITE Symposium 28. HMSO, Londres.
- Crouch, S. M. 1990. "Check Soil Contamination Easily". *Chemical Engineering Progress*. 41-45. Septiembre 1990.
- EPA. 1983. "Hazardous Waste Land Treatment. Municipal Environmental Research Laboratory". Office of Research and Development. U.S.A. Cincinnati, Ohio.
- Ercoli, E, Di Paola, M y Cantero, J. 2000. "Análisis y Evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo". Laboratorio de Bioprocesos; UN de Cuyo, Argentina.
- Espinat, D., 1993. "Colloidal Structure of Asphaltene Solutions and Heavy-Oil Fraction Studied by Small-Angle and X-Ray Scattering". Trabajo presentado ante el SPE Int'l. Symposium. Oilfield Chemistry, New Orleans, LA, Marzo.
- Eweis, J.B.; Ergas, S.J.; Chang, D.P.Y y Schroeder, E.D. 1998. "Bioremediation Principles". WCB/McGraw-Hill, Malaysia.
- Fava F., Di Gioia D. 2001. "Soya lecithin effects on the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in an artificially-contaminated soil". *Biotechnology & Bioengineering* 72:177-184.
- Fränzele, O. 1993. "Contaminants in Terrestrial Environments". Springer-Verlag. BerlinHeidelberg. Alemania.

- Gutiérrez, E. M. 1990. “Los Residuos Sólidos Peligrosos: ¿ Un Riesgo sin Solución?”. Ciencias. No. 20 UNAM.
- Hinchee R., 1994. “Applied Biotechnology for Site Remediation”, CRC Press, Enero. 1994.
- Juan C. Mata-Sandoval, Jeffrey Karns, y Alba Torrents , 2000. “Effect of Rhamnolipids Produced by Pseudomonas aeruginosa UG2 on the Solubilization of Pesticides”, University of Maryland at College Park, September 12, 2000.
- Jury, W. A. 1989. “Chemical Movement through Soil. Vadose Zone Modeling of Organic Pollutants”. Publicaciones Lewis. USA.
- Keiji Sugiura, Masami Ishihara, Toshitsugu Shimauchi, y Shigeaki Harayama, 1997. “Physicochemical Properties and Biodegradability of Crude Oil”, Marine Biotechnology Institute, Kamaishi Laboratories, Japon, Agosto, 1997.
- Kelsey W., y Martin Alexander, 1997. “DECLINING BIOAVAILABILITY AND INAPPROPRIATE ESTIMATION OF RISK OF PERSISTENT COMPOUNDS”, Instituto para la comparación de la toxicología ambiental y departamento de suelos, Cosecha y ciencias atmosféricas, Cornell University.
- Laha, S. and Luthy, R.G. 1991. “Inhibition of Phenanthrene Mineralization by Nonionic Surfactants in Soil-Water Systems”, Environment Scientific Technology, 25: 1920-1930.
- Laha, S. y Luthy, R. G. 1992. “Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-Water systems”, Biotechnology Bioengineering. 40: 1367-1380.
- Lai, K., Scrimhaw, M. y Lester, J. 2002. “Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by Chlorella vulgaris”. Applied and environmental Microbiology 68: 859-864.

- Lesser, I. J. M. 1995. "Prospección de Contaminación de Acuíferos por Hidrocarburos". *Geólogos*. 1(6):5-8.
- Luthy, R. G., G. R. Aiken, M. L. Brusseau, S. D. Cunningham, P. M. Gschwend, J. J. Pignatello, M. Testa, M. S. 1994. "Geological Aspects of Hazardous Waste Management". Publicaciones Lewis. USA.
- McBride, M. B. 1994. "Environmental Chemistry of Soils". New York Oxford. USA.
- Mackay, M. D.; P. V. Roberts y J. A. Cherry. 1985. "Transport of Organic Contaminants in Groundwater". *Environmental Science & Technology*. 19(5): 384-392.
- Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. 1998. "Brock: Biología de los Microorganismos". Prentice Hall. Octava Edición. 1064 pp.
- Mansoori, G.A., 1997. "Modeling of asphaltene and other heavy organic depositions", *J. Petroleum Science & Engineering*, 17, 101-111.
- Marcel J. Geerdink, Mark C. M. van Loosdrecht, y Karel Ch. A. M. Luyben , 1995. "Model for Microbial Degradation of Nonpolar Organic Contaminants in a Soil Slurry Reactor", *Kluyver Laboratory for Biochemical Technology, Holanda*, Octubre. 1995.
- Menzie, C. A.; B. B. Potocki y J. Santodonato. 1992. "Exposure to Carcinogenic Polycyclic Hydrocarbons in the Environment". *Environmental Science & Technology*. 26:1278-1284.
- Medina S., 1999. "Lavado y composteo ex-situ de un suelo intemperizado con hidrocarburos", *Universidad Autónoma metropolitana Iztapalapa*.
- Murado M., M. L. Cabo, M. P. González y L. Pastoriza. 1999. "A method for bacteriocin quantification", *Journal of Applied Microbiology*, Volume 87 pp 907 - Diciembre, 1999.

- Murray, B. McB. 1994. "Environmental Chemistry of Soils". Oxford University Press. USA.
- Ney, R. 1990. "Fate and Transport of Organic Chemicals in the Environment". Govern. Inst. Maryland.
- Padilla, R. M. Y. 1989. "Determinación de los Niveles de Hidrocarburos en Sedimentos Recientes del Río Calzadas en la Región del Bajo Río Coatzacoalcos, Veracruz. México". Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Reinhard, S. J. Traina, W. J. Weber Jr. y J. C. Westall., 1997. "Sequestration of Hydrophobic Organic Contaminants by Geosorbents". Environmental Science & Technology. 31:3341-3347.
- Riis V, Brandt M, Miethel D y Babel W. 1995. "Degradation of refinery products and oils from polluted sites by the autochthonous microorganisms of contaminated and pristine soils". Microbiology Resources, 150(3):323-30, Septiembre 1995.
- Roldan-Martín A., 2003. "Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas", Instituto de Ingeniería, UNAM, Febrero, 2003.
- Saval, B. S. 1995. "Acciones para la Remediación de Suelos en México. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo". Instituto de Ingeniería. UNAM. SEMARNAP. Los Suelos de Tabasco Restauración, Conservación y Uso. Gobierno Constitucional del Estado de Tabasco.
- Tölgyessy, J. 1993. "Chemistry and Biology of Water, Air and Soil Environmental Aspects". Elsevier. Czechoslovakia.

ANEXO 1

(Tablas de resultados de los cálculos de THP)

Fecha: 12/07/2006

	Pesado de fiolas TPH			Pesado de envases (extracción)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	128,4070	127,8517	130,0512	72,3366	72,0858	72,0543
BIOESTIMULACIÓN 1	128,4065	127,8489	130,0544	71,9457	71,8325	71,3525
BIOAUMENTACIÓN 1	128,4122	127,8485	130,0724	72,3578	72,0910	72,0511
BIOSURFACTANTE 1	130,0809	125,4522	128,4064	71,9564	27,3699	72,1124
CONTROL 1	125,4623	128,4166	127,8568	73,0486	72,3877	87,5540
BIOREMEDIACIÓN 2	125,4516	98,5490	128,0069	31,9348	27,3571	28,5481
BIOESTIMULACIÓN 2	130,0582	125,4591	128,4086	72,3340	72,0695	72,0579
BIOAUMENTACIÓN 2	130,0671	125,4617	128,4175	72,1189	71,9606	71,9705
BIOSURFACTANTE 2	125,5011	98,5580	130,0452	72,3404	72,0830	72,0685
CONTROL 2	130,0710	125,4395	128,4240	71,3429	72,1159	71,9483

	Pesado papeles de filtro			Pesado Tierra limpia + envase + filtro		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	1,4815	1,5126	1,4961	78,3515	78,1297	78,1153
BIOESTIMULACIÓN 1	1,4838	1,5112	1,5162	77,7003	77,7172	77,3737
BIOAUMENTACIÓN 1	1,5021	1,4746	1,5277	78,5870	78,1337	78,2254
BIOSURFACTANTE 1	1,5093	1,4745	1,5017	78,1012	33,3001	78,0874
CONTROL 1	1,4935	1,4831	1,5008	79,4570	78,8037	93,8734
BIOREMEDIACIÓN 2	1,4965	1,4944	1,4866	37,9254	33,3547	34,5547
BIOESTIMULACIÓN 2	1,5000	1,5028	1,4721	78,3870	78,0337	78,0585
BIOAUMENTACIÓN 2	1,4814	1,5188	1,4732	78,1515	78,0297	77,9653
BIOSURFACTANTE 2	1,4859	1,4920	1,4852	78,3244	77,9487	78,0254
CONTROL 2	1,4853	1,4966	1,4797	77,7515	78,5297	78,2353

	Pesado de fiolas + TPH			Pesado de tierra seca (gr)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	129,0014	128,4081	130,5885	5,1182	5,0824	5,1428
BIOESTIMULACIÓN 1	128,9272	128,3712	130,4557	4,9173	4,8479	4,8685
BIOAUMENTACIÓN 1	128,9452	128,3769	130,4553	5,1612	5,1466	5,1762
BIOSURFACTANTE 1	130,7148	125,9571	128,9153	5,1442	5,0118	5,0616
CONTROL 1	126,1109	128,9518	128,4683	5,4508	5,5100	5,5158
BIOREMEDIACIÓN 2	126,0996	98,9737	128,5356	4,9817	5,1148	5,0775
BIOESTIMULACIÓN 2	130,5777	125,9911	128,7203	5,0178	4,9966	5,0338
BIOAUMENTACIÓN 2	130,6014	125,9545	129,0223	5,0750	5,1336	5,1207
BIOSURFACTANTE 2	125,9124	99,2176	130,7166	5,0481	5,0452	5,0326
CONTROL 2	130,6910	126,1040	128,9724	5,5218	5,4900	5,5030

	Pesado de Tierra húmeda			1	2	3
	1	2	3			
BIOREMEDIACIÓN 1	6,0367	6,0170	6,0759			
BIOESTIMULACIÓN 1	6,0414	6,0380	6,0101			
BIOAUMENTACIÓN 1	45,6842	45,9808	46,3345			
BIOSURFACTANTE 1	6,0093	6,0078	6,0933			
CONTROL 1	6,0056	6,0761	6,0030			
BIOREMEDIACIÓN 2	6,0858	6,0519	6,0062			
BIOESTIMULACIÓN 2	6,0414	6,0380	6,0101			
BIOAUMENTACIÓN 2	45,9460	45,9300	45,7000			
BIOSURFACTANTE 2	6,0615	6,0156	6,0208			
CONTROL 2	6,0758	6,0839	6,0149			

Fecha: 19/07/2006

	Pesado de fiolas TPH			Pesado de envases (extracción)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	128,4002	127,8554	130,0543	72,3416	72,0871	72,0524
BIOESTIMULACIÓN 1	128,4034	127,8549	130,0515	71,9502	71,8310	71,3539
BIOAUMENTACIÓN 1	128,4214	127,8606	130,0511	72,3680	72,0891	72,0705
BIOSURFACTANTE 1	130,0629	125,4656	128,4110	71,9678	27,3679	72,1059
CONTROL 1	125,4532	128,4116	127,8709	73,0501	72,3942	87,5464
BIOREMEDIACIÓN 2	125,4494	98,5407	128,0174	31,9334	27,3639	28,5445
BIOESTIMULACIÓN 2	130,0651	125,4429	128,4179	72,3227	72,0744	72,0535
BIOAUMENTACIÓN 2	130,0740	125,4518	128,4205	72,1165	71,9681	71,9750
BIOSURFACTANTE 2	125,5009	98,5447	130,0587	72,3426	72,0984	72,0705
CONTROL 2	130,0805	125,4557	128,3983	71,3443	72,1012	71,9593

	Pesado papeles de filtro			Pesado Tierra limpia + envase + filtro		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	1,4992	1,5163	1,4747	78,4525	78,2497	78,2253
BIOESTIMULACIÓN 1	1,5133	1,5172	1,4807	77,8803	77,9182	77,5637
BIOAUMENTACIÓN 1	1,5064	1,4867	1,5113	78,5970	78,1451	78,2954
BIOSURFACTANTE 1	1,5063	1,4879	1,4913	78,1467	33,4079	78,1775
CONTROL 1	1,5149	1,4781	1,4844	79,6680	79,0137	94,0814
BIOREMEDIACIÓN 2	1,4971	1,4861	1,4943	38,2254	33,6047	34,7687
BIOESTIMULACIÓN 2	1,4814	1,4866	1,5069	78,4778	78,2437	78,2565
BIOAUMENTACIÓN 2	1,4762	1,5089	1,4883	78,3055	78,2297	78,1677
BIOSURFACTANTE 2	1,4987	1,4787	1,4857	78,5294	78,1632	78,2249
CONTROL 2	1,4540	1,5128	1,4948	77,8015	78,5347	78,3053

	Pesado de fiolas + TPH			Pesado de tierra seca (gr)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	129,0113	128,3131	130,4893	5,1243	5,1727	5,2074
BIOESTIMULACIÓN 1	128,8858	128,3193	130,4272	4,8822	5,3727	4,8464
BIOAUMENTACIÓN 1	128,8708	128,3096	130,4061	5,1956	5,1714	4,9516
BIOSURFACTANTE 1	130,3690	126,0312	128,9339	4,9959	5,2582	4,9922
CONTROL 1	126,0607	129,0100	128,4643	5,4403	5,6078	6,1670
BIOREMEDIACIÓN 2	125,9132	98,8772	128,5086	5,0418	4,8377	5,8018
BIOESTIMULACIÓN 2	130,5347	125,9724	128,6754	4,9902	4,9048	5,4826
BIOAUMENTACIÓN 2	130,6503	125,9019	128,9577	5,1657	4,8350	5,8794
BIOSURFACTANTE 2	125,9446	98,9843	130,5266	5,0526	5,0696	5,1999
CONTROL 2	130,6695	126,0542	129,0230	5,6125	5,6688	5,3430

	Pesado de Tierra húmeda			1	2	3
	1	2	3			
BIOREMEDIACIÓN 1	6,0879	6,0328	6,1413			
BIOESTIMULACIÓN 1	6,0267	6,0365	5,9914			
BIOAUMENTACIÓN 1	6,0847	6,0892	6,1168			
BIOSURFACTANTE 1	6,0207	5,9882	6,0767			
CONTROL 1	6,0213	6,0927	5,9855			
BIOREMEDIACIÓN 2	6,0714	6,1206	5,9705			
BIOESTIMULACIÓN 2	6,0301	6,0529	5,9957			
BIOAUMENTACIÓN 2	6,0334	6,1043	6,1467			
BIOSURFACTANTE 2	6,0830	6,0311	6,0328			
CONTROL 2	6,0905	6,0692	6,0259			

Fecha: 26/08/2006

	Pesado de fiolas TPH			Pesado de envases (extracción)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,2506	67,1571	56,3704	38,9109	31,9402	39,7035
BIOESTIMULACIÓN 1	68,2501	67,1543	56,3736	32,2321	27,6527	31,8789
BIOAUMENTACIÓN 1	68,2558	67,1539	56,3916	71,8195	71,2333	71,3415
BIOSURFACTANTE 1	68,2570	67,1538	56,3656	73,1364	73,1506	73,8163
CONTROL 1	68,2472	67,1624	56,3647	72,9436	72,2598	87,3589
BIOREMEDIACIÓN 2	68,2442	67,1627	56,3686	31,9316	30,1320	27,3544
BIOESTIMULACIÓN 2	68,2343	67,1607	56,3678	40,4899	38,9014	39,9934
BIOAUMENTACIÓN 2	68,2432	67,1633	56,3767	39,9057	40,2797	39,7097
BIOSURFACTANTE 2	68,2478	67,1713	56,3742	39,7042	73,1414	31,9507
CONTROL 2	68,2471	67,1411	56,3832	39,9995	38,9142	40,2674

	Pesado papeles de filtro			Pesado Tierra limpia + envase + filtro		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	1,4312	1,4780	1,4243	45,4641	38,0275	46,0574
BIOESTIMULACIÓN 1	1,4109	1,4138	1,4327	38,7012	34,0670	38,3236
BIOAUMENTACIÓN 1	1,4320	1,4278	1,3621	78,1828	77,5796	77,8616
BIOSURFACTANTE 1	1,4369	1,4102	1,4402	79,9955	79,6397	80,5501
CONTROL 1	1,4243	1,4215	1,4112	79,5981	79,0108	94,1803
BIOREMEDIACIÓN 2	1,4314	1,4312	1,4124	38,1351	36,8451	34,0457
BIOESTIMULACIÓN 2	1,4793	1,4970	1,4655	46,6602	45,2148	46,0932
BIOAUMENTACIÓN 2	1,4809	1,4195	1,4780	46,4051	46,7810	46,0029
BIOSURFACTANTE 2	1,4312	1,4809	1,4243	46,0380	79,6131	38,8471
CONTROL 2	1,4138	1,4124	1,4102	46,3154	44,8975	46,5434

	Pesado de fiolas + TPH			Pesado de tierra seca (gr)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,6996	67,6445	56,8744	5,6047	5,1047	5,4157
BIOESTIMULACIÓN 1	68,6862	67,5738	56,8428	5,5330	5,4725	5,4225
BIOAUMENTACIÓN 1	68,6118	67,6136	56,7773	5,3165	5,3510	5,5575
BIOSURFACTANTE 1	68,7428	67,6260	56,9062	5,9344	5,5939	5,7825
CONTROL 1	68,8220	67,8036	56,9356	5,8087	5,9758	5,9920
BIOREMEDIACIÓN 2	68,6742	67,6131	56,8123	5,2114	5,7877	5,6801
BIOESTIMULACIÓN 2	68,6449	67,5677	56,7713	5,1246	5,2516	5,0046
BIOAUMENTACIÓN 2	68,7308	67,7132	56,8275	5,4666	5,6360	5,3262
BIOSURFACTANTE 2	68,7031	67,6374	56,7901	5,3947	5,4879	5,8474
CONTROL 2	68,8011	67,7467	56,9209	5,5075	5,1089	5,4587

	Pesado de Tierra húmeda			1	2	3
	1	2	3			
BIOREMEDIACIÓN 1	6,5200	6,0910	6,4372			
BIOESTIMULACIÓN 1	6,5167	6,5272	6,4715			
BIOAUMENTACIÓN 1	6,2186	6,2257	6,4843			
BIOSURFACTANTE 1	6,6030	6,8140	6,9686			
CONTROL 1	6,1443	6,4159	6,2113			
BIOREMEDIACIÓN 2	6,0586	6,7355	6,5692			
BIOESTIMULACIÓN 2	6,2293	6,3686	6,1156			
BIOAUMENTACIÓN 2	6,3688	6,6166	6,2296			
BIOSURFACTANTE 2	6,3326	6,4910	6,7549			
CONTROL 2	6,4932	6,0805	6,5314			

Fecha: 06/08/2006

	Pesado de fiolas TPH			Pesado de envases (extracción)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,2488	67,1621	56,3716	38,9159	39,7016	31,9415
BIOESTIMULACIÓN 1	68,2515	67,1588	56,3721	32,2366	31,8803	27,6512
BIOAUMENTACIÓN 1	68,2752	67,1641	56,3897	71,8297	71,3609	71,2314
BIOSURFACTANTE 1	68,2504	67,1652	56,3637	73,1478	73,8098	73,1486
CONTROL 1	68,2396	67,1639	56,3712	72,9451	87,3513	72,2663
BIOREMEDIACIÓN 2	68,2406	67,1612	56,3755	31,9302	27,3508	30,1388
BIOESTIMULACIÓN 2	68,2299	67,1494	56,3727	40,4786	39,9890	38,9063
BIOAUMENTACIÓN 2	68,2477	67,1609	56,3842	39,9033	39,7142	40,2872
BIOSURFACTANTE 2	68,2498	67,1734	56,3897	39,7064	31,9527	73,1568
CONTROL 2	68,2580	67,1426	56,3685	40,0009	40,2784	38,8995

	Pesado papeles de filtro			Pesado Tierra limpia + envase + filtro		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	1,4256	1,4830	1,4294	45,5595	46,1488	38,1293
BIOESTIMULACIÓN 1	1,4312	1,4183	1,4123	38,7215	38,3483	34,0909
BIOAUMENTACIÓN 1	1,3602	1,4380	1,4514	78,2369	77,8930	77,6374
BIOSURFACTANTE 1	1,4382	1,4216	1,4303	80,0253	80,5815	79,6610
CONTROL 1	1,4178	1,4231	1,4168	79,6090	94,1706	79,0229
BIOREMEDIACIÓN 2	1,4193	1,4298	1,4278	38,1868	34,0831	36,8868
BIOESTIMULACIÓN 2	1,4704	1,4857	1,4749	46,6602	46,0932	45,2148
BIOAUMENTACIÓN 2	1,4855	1,4171	1,4854	46,4438	46,0843	46,8097
BIOSURFACTANTE 2	1,4398	1,4831	1,4436	46,0954	38,9458	79,7209
CONTROL 2	1,3955	1,4139	1,4248	46,3328	46,5681	44,9072

	Pesado de fiolas + TPH			Pesado de tierra seca (gr)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,6209	67,5667	56,7949	5,5862	5,4282	5,1561
BIOESTIMULACIÓN 1	68,6758	67,5631	56,8287	5,5467	5,4078	5,5176
BIOAUMENTACIÓN 1	68,5895	67,5908	56,7476	5,3359	5,5380	5,3612
BIOSURFACTANTE 1	68,6954	67,5768	56,8488	5,8687	5,7629	5,6053
CONTROL 1	68,8179	67,7862	56,9467	5,7332	6,0577	5,9915
BIOREMEDIACIÓN 2	68,6168	67,5377	56,7430	5,1757	5,6870	5,7733
BIOESTIMULACIÓN 2	68,6338	67,5543	56,7512	5,0810	5,0532	5,2403
BIOAUMENTACIÓN 2	68,7063	67,6878	56,8004	5,5116	5,3437	5,6120
BIOSURFACTANTE 2	68,6576	67,5863	56,7384	5,4067	5,8629	5,5094
CONTROL 2	68,7900	67,7276	56,8897	5,5185	5,4438	5,1234

	Pesado de Tierra húmeda			1	2	3
	1	2	3			
BIOREMEDIACIÓN 1	6,5712	6,4926	6,1068			
BIOESTIMULACIÓN 1	6,5020	6,4528	6,5257			
BIOAUMENTACIÓN 1	6,2288	6,5037	6,2062			
BIOSURFACTANTE 1	6,6144	6,9520	6,8120			
CONTROL 1	6,1459	6,1938	6,4325			
BIOREMEDIACIÓN 2	6,0442	6,5335	6,8042			
BIOESTIMULACIÓN 2	6,2180	6,1012	6,3835			
BIOAUMENTACIÓN 2	6,3448	6,2746	6,6912			
BIOSURFACTANTE 2	6,3541	6,7669	6,5065			
CONTROL 2	6,5079	6,5424	6,0658			

Fecha: 23/08/2006

	Pesado de fiolas TPH			Pesado de envases (extracción)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,1719	67,0793	56,2909	72,9904	71,8703	72,0268
BIOESTIMULACIÓN 1	68,2397	67,1436	56,3595	72,9400	72,2404	72,8828
BIOAUMENTACIÓN 1	68,2335	67,1311	56,3619	32,2072	27,6227	31,8500
BIOSURFACTANTE 1	68,2096	67,1046	56,3082	40,3758	38,8284	39,8954
CONTROL 1	68,2431	67,1450	56,3758	71,7970	71,2004	71,3565
BIOREMEDIACIÓN 2	68,1868	67,0873	56,2993	39,8305	40,1558	39,5416
BIOESTIMULACIÓN 2	68,2232	67,1473	56,3477	73,1136	72,1690	73,0836
BIOAUMENTACIÓN 2	68,2187	67,1379	56,3496	58,1940	39,6053	27,7621
BIOSURFACTANTE 2	68,2023	67,1202	56,3225	48,2729	49,8330	35,8943
CONTROL 2	68,2360	67,1220	56,3520	72,0286	72,3131	72,0447

	Pesado papeles de filtro			Pesado Tierra limpia + envase + filtro		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	1,4747	1,5163	1,4992	80,1279	79,0684	79,1570
BIOESTIMULACIÓN 1	1,4807	1,5172	1,5133	80,0261	79,3948	79,9901
BIOAUMENTACIÓN 1	1,5113	1,4867	1,5064	39,3868	34,7697	39,0170
BIOSURFACTANTE 1	1,4913	1,4879	1,5063	47,6279	46,1085	47,1404
CONTROL 1	1,4844	1,4781	1,5149	78,6948	78,1292	78,3273
BIOREMEDIACIÓN 2	1,4943	1,4861	1,4971	47,0322	47,3505	46,7512
BIOESTIMULACIÓN 2	1,5069	1,4866	1,4814	80,2215	79,3062	80,1975
BIOAUMENTACIÓN 2	1,4883	1,5089	1,4762	65,3120	46,7564	34,8856
BIOSURFACTANTE 2	1,4961	1,4787	1,4987	55,4652	56,9509	43,0973
CONTROL 2	1,4948	1,5128	1,4540	78,9743	79,3081	78,9421

	Pesado de fiolas + TPH			Pesado de tierra seca (gr)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,5422	67,4889	56,7154	6,0423	6,0963	6,0604
BIOESTIMULACIÓN 1	68,6860	67,5813	56,8434	6,0620	6,0984	6,0520
BIOAUMENTACIÓN 1	68,6060	67,5124	56,7623	6,0528	6,0473	6,0650
BIOSURFACTANTE 1	68,5967	67,4787	56,6714	6,2147	6,1510	6,0692
CONTROL 1	68,8295	67,7688	56,9578	6,0354	6,0663	6,0386
BIOREMEDIACIÓN 2	68,5594	67,4623	56,6737	6,0970	6,0811	6,0801
BIOESTIMULACIÓN 2	68,6725	67,5954	56,7924	6,0551	6,1040	6,0760
BIOAUMENTACIÓN 2	68,6063	67,5344	56,7357	6,0208	6,0357	6,0377
BIOSURFACTANTE 2	68,5702	67,4989	56,6867	6,0767	6,0116	6,0685
CONTROL 2	68,8774	67,7453	56,9014	6,0691	6,0722	6,0578

	Pesado de Tierra húmeda			1	2	3
	1	2	3			
BIOREMEDIACIÓN 1	6,0423	6,0963	6,0604			
BIOESTIMULACIÓN 1	6,0620	6,0984	6,0520			
BIOAUMENTACIÓN 1	6,0528	6,0473	6,0650			
BIOSURFACTANTE 1	6,2147	6,1510	6,0692			
CONTROL 1	6,0354	6,0663	6,0386			
BIOREMEDIACIÓN 2	6,0970	6,0811	6,0801			
BIOESTIMULACIÓN 2	6,0551	6,1040	6,0760			
BIOAUMENTACIÓN 2	6,0208	6,0357	6,0377			
BIOSURFACTANTE 2	6,0767	6,0116	6,0685			
CONTROL 2	6,0691	6,0722	6,0578			

Fecha: 20/09/2006

	Pesado de fiolas TPH			Pesado de envases (extracción)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,1719	67,0793	56,2909	72,2579	72,0080	71,9748
BIOESTIMULACIÓN 1	68,2603	67,1725	56,3883	71,9558	71,8507	71,3672
BIOAUMENTACIÓN 1	68,2723	67,0755	56,4063	72,3743	72,0126	72,0658
BIOSURFACTANTE 1	68,1896	67,0957	56,2462	71,8890	27,3118	71,9930
CONTROL 1	68,2588	67,1450	56,3758	73,0602	72,3703	87,5651
BIOREMEDIACIÓN 2	68,1868	67,0873	56,2993	71,8990	27,2817	71,7632
BIOESTIMULACIÓN 2	68,2730	67,2018	56,4090	72,3727	72,1106	72,0991
BIOAUMENTACIÓN 2	68,1432	67,0099	56,3120	72,0189	71,8072	71,9058
BIOSURFACTANTE 2	68,1603	67,0839	56,3225	72,2530	71,9956	72,0168
CONTROL 2	68,3345	67,1588	56,3949	71,4303	72,1336	71,9600

	Pesado papeles de filtro			Pesado Tierra limpia + envase + filtro		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	1,3978	1,4335	1,4184	78,8967	78,1942	78,1123
BIOESTIMULACIÓN 1	1,5250	1,5309	1,5295	78,6214	77,9523	77,3941
BIOAUMENTACIÓN 1	1,5084	1,3981	1,5022	78,8921	78,1777	78,4111
BIOSURFACTANTE 1	1,4305	1,4184	1,3889	78,8535	33,5619	78,0174
CONTROL 1	1,5035	1,4591	1,4986	79,8022	78,7276	94,0315
BIOREMEDIACIÓN 2	1,4405	1,4121	1,4209	78,2167	33,3493	77,9605
BIOESTIMULACIÓN 2	1,5500	1,5390	1,5177	78,7029	78,3352	78,2800
BIOAUMENTACIÓN 2	1,3838	1,3579	1,4040	78,4439	77,7829	78,0650
BIOSURFACTANTE 2	1,3963	1,3891	1,4596	78,6914	78,0824	78,1900
CONTROL 2	1,6022	1,5052	1,4804	78,0552	78,6252	78,4360

	Pesado de fiolas + TPH			Pesado de tierra seca (gr)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,4503	67,3585	56,5851	5,5260	5,0404	5,0029
BIOESTIMULACIÓN 1	68,6613	67,5344	56,7520	5,5432	4,9355	4,8626
BIOAUMENTACIÓN 1	68,5883	67,3880	56,7227	5,3330	5,0828	5,1613
BIOSURFACTANTE 1	68,5130	67,3682	56,4823	5,8670	5,0861	4,8924
CONTROL 1	68,8342	67,6735	56,9258	5,8203	5,4334	5,5211
BIOREMEDIACIÓN 2	68,4553	67,3341	56,5637	5,1540	4,9063	5,0455
BIOESTIMULACIÓN 2	68,6554	67,5742	56,7799	5,1633	5,0589	5,0378
BIOAUMENTACIÓN 2	68,4683	67,3044	56,6218	5,3666	4,9216	5,0689
BIOSURFACTANTE 2	68,4499	67,3310	56,5880	5,3073	4,9607	4,9935
CONTROL 2	68,9045	67,7111	56,8943	5,5949	5,5395	5,5017

	Pesado de Tierra húmeda			1	2	3
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	6,3585	6,3594	5,9572			
BIOESTIMULACIÓN 1	6,4817	6,4897	6,0561			
BIOAUMENTACIÓN 1	6,5008	6,4059	6,0892			
BIOSURFACTANTE 1	6,9012	6,9105	5,8899			
CONTROL 1	6,2229	6,1939	6,0167			
BIOREMEDIACIÓN 2	6,5118	6,4938	6,0165			
BIOESTIMULACIÓN 2	6,1543	6,1567	6,0826			
BIOAUMENTACIÓN 2	6,1296	6,0762	5,9927			
BIOSURFACTANTE 2	6,6675	6,6675	6,0098			
CONTROL 2	6,6188	6,5491	6,0875			

Fecha: 18/10/2006

	Pesado de fiolas TPH			Pesado de envases (extracción)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,2673	67,1811	56,3823	38,3898	31,4191	39,1812
BIOESTIMULACIÓN 1	68,2806	67,1964	56,4130	31,8600	27,3425	31,5578
BIOAUMENTACIÓN 1	68,3264	67,1333	56,4377	71,5454	70,6823	71,0674
BIOSURFACTANTE 1	68,2194	67,1170	56,2776	72,5843	72,6632	73,1652
CONTROL 1	68,2697	67,1571	56,3661	72,3966	71,6724	86,8389
BIOREMEDIACIÓN 2	68,2385	67,1290	56,3367	31,4826	29,6550	26,8774
BIOESTIMULACIÓN 2	68,3247	67,2435	56,4464	40,2229	38,6514	39,7424
BIOAUMENTACIÓN 2	68,1819	67,0386	56,3934	39,2803	39,5157	39,2019
BIOSURFACTANTE 2	68,2177	67,1917	56,4212	39,1302	72,5894	31,5007
CONTROL 2	68,3519	67,1685	56,4196	39,6895	38,4142	39,7964

	Pesado papeles de filtro			Pesado Tierra limpia + envase + filtro		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	1,4294	1,5029	1,5126	45,1368	38,0763	45,4377
BIOESTIMULACIÓN 1	1,4123	1,5193	1,5112	38,4060	33,8853	37,5842
BIOAUMENTACIÓN 1	1,4514	1,4211	1,4746	78,0180	77,3272	77,3963
BIOSURFACTANTE 1	1,4303	1,5197	1,4745	79,6502	79,6753	79,2942
CONTROL 1	1,4168	1,4336	1,4831	79,0366	78,5695	93,3065
BIOREMEDIACIÓN 2	1,4278	1,4888	1,4944	37,8744	36,5691	33,1884
BIOESTIMULACIÓN 2	1,5083	1,4652	1,5028	46,4872	44,7991	45,9241
BIOAUMENTACIÓN 2	1,4854	1,4663	1,5188	45,9142	46,0121	45,5049
BIOSURFACTANTE 2	1,4436	1,5149	1,4920	45,7401	79,7123	37,8035
CONTROL 2	1,4248	1,4702	1,4618	46,1108	44,8067	46,2256

	Pesado de fiolas + TPH			Pesado de tierra seca (gr)		
	1	2	3	1	2	3
BIOREMEDIACIÓN 1	68,5500	67,4563	56,6349	5,6029	5,4332	5,0042
BIOESTIMULACIÓN 1	68,6777	67,5835	56,7583	5,5344	5,4123	4,8611
BIOAUMENTACIÓN 1	68,6393	67,4555	56,7413	5,3359	5,5482	5,1594
BIOSURFACTANTE 1	68,4931	67,3977	56,5146	5,9278	5,7743	4,8904
CONTROL 1	68,8388	67,7500	56,9058	5,8012	6,0593	5,5277
BIOREMEDIACIÓN 2	68,4758	67,3873	56,5643	5,2078	5,6855	5,0524
BIOESTIMULACIÓN 2	68,6880	67,6018	56,8090	5,1202	5,0419	5,0427
BIOAUMENTACIÓN 2	68,5002	67,3489	56,6820	5,4711	5,3413	5,0764
BIOSURFACTANTE 2	68,4533	67,4544	56,6175	5,4071	5,8650	5,0090
CONTROL 2	68,8445	67,6788	56,9349	5,5185	5,4453	5,4870

	Pesado de Tierra húmeda			1	2	3
	1	2	3			
BIOREMEDIACIÓN 1	5,5857	5,9161	5,5740			
BIOESTIMULACIÓN 1	6,1536	6,1613	5,7773			
BIOAUMENTACIÓN 1	5,9321	5,9333	5,7732			
BIOSURFACTANTE 1	6,2423	6,4812	5,4999			
CONTROL 1	5,8855	5,6239	5,5463			
BIOREMEDIACIÓN 2	6,3552	6,0922	5,6041			
BIOESTIMULACIÓN 2	6,1165	5,8656	5,8530			
BIOAUMENTACIÓN 2	6,0658	5,4656	5,5279			
BIOSURFACTANTE 2	5,9325	6,2029	5,5616			
CONTROL 2	5,7558	6,0314	5,6012			

Fecha: 12/07/2006

TPH evaporación			TPH extracción		
1	2	3	1	2	3
0,116134579	0,109485676	0,104476161	0,11424915	0,108423186	0,112351248
0,105884937	0,107731183	0,082440587	0,131468082	0,097862992	0,074663243
0,103270557	0,102679439	0,073963525	0,084108347	0,112394591	0,10230478
0,123231989	0,100734267	0,100543306	0,0988939	0,11096612	0,1162419
0,118989873	0,097130672	0,110866964	0,098301167	0,104725953	0,126386018
0,13009013	0,083031595	0,104114229	0,097876227	0,119560882	0,109798129
0,1035394	0,106480407	0,061905519	0,092638208	0,107104831	0,100381422
0,105280788	0,096003195	0,11810065	0,103211823	0,113615786	0,116987521
0,081486104	0,130734163	0,133404205	0,108941978	0,133080948	0,111447363
0,112278605	0,121032787	0,09966382	0,108374081	0,10432969	0,126412866

EV PROM	EXT PROM	Diferencia
11,00	11,17	-0,16
9,87	10,13	-0,26
9,33	9,96	-0,63
10,82	10,87	-0,05
10,90	10,98	-0,08
10,57	10,91	-0,33
9,06	10,00	-0,94
10,65	11,13	-0,48
11,52	11,78	-0,26
11,10	11,30	-0,20

Fecha: 19/07/2006

TPH evaporación			TPH extraccion		
1	2	3	1	2	3
0,11926507	0,088483771	0,083544571	0,09523252	0,10175537	0,102479164
0,098814874	0,086436987	0,077514789	0,088631718	0,149409049	0,030941951
0,086496266	0,086823684	0,071704096	0,091981677	0,116419151	0,047055497
0,061270242	0,107565327	0,104741397	0,061722613	0,134293104	0,085507392
0,111675827	0,106713863	0,09622669	0,056388434	0,083171654	0,18597211
0,091985005	0,069566116	0,084668551	0,048419215	0,017154846	0,185230446
0,094096429	0,107955472	0,046974063	0,068554367	0,045274017	0,138795462
0,111562809	0,093092037	0,091377011	0,090016842	0,01701303	0,197778005
0,087816174	0,086720846	0,089988269	0,069558247	0,095366498	0,10464432
0,104953229	0,105583192	0,116919334	0,11582539	0,131957381	0,08440015

EV PROM	EXT PROM	Diferencia
9,71	9,98	-0,27
8,76	8,97	-0,21
8,17	8,52	-0,35
9,12	9,38	-0,26
10,49	10,85	-0,36
8,21	8,36	-0,15
8,30	8,42	-0,12
9,87	10,16	-0,29
8,82	8,99	-0,17
10,92	11,07	-0,16

Fecha: 26/08/2006

TPH evaporación			TPH extracción		
1	2	3	1	2	3
0,080111335	0,09549043	0,093071994	0,084884115	0,087879797	0,09966394
0,078818001	0,076650525	0,086534255	0,089746611	0,085719507	0,072223144
0,066961347	0,08591852	0,069401709	0,059305934	0,081610914	0,083697706
0,081861688	0,084406228	0,093483787	0,086871461	0,096837627	0,079367056
0,09896018	0,107304461	0,095285381	0,097328146	0,10861642	0,09881008
0,082519093	0,077825388	0,07810954	0,08065587	0,087419873	0,073937079
0,080123327	0,077507807	0,080617832	0,081926394	0,079499581	0,080278144
0,08919621	0,09757665	0,084638204	0,081440018	0,109226402	0,084949495
0,084406918	0,084937772	0,071125628	0,089940126	0,081515698	0,073856757
0,100595552	0,118538237	0,098512466	0,1092601	0,105574586	0,109018631

EV PROM	EXT PROM	Diferencia
8,96	9,08	-0,13
8,07	8,26	-0,19
7,41	7,49	-0,08
8,66	8,77	-0,11
10,05	10,16	-0,11
7,95	8,07	-0,12
7,94	8,06	-0,12
9,05	9,19	-0,14
8,02	8,18	-0,16
10,59	10,80	-0,21

Fecha: 06/08/2006

TPH evaporación	TPH extracción
-----------------	----------------

1	2	3	1	2	3
0,066619527	0,078479859	0,077981651	0,065894526	0,077112546	0,085479533
0,07650198	0,073269175	0,084433966	0,088878032	0,088842613	0,066218795
0,058902903	0,079599716	0,064635247	0,054133323	0,075831903	0,080146262
0,07582088	0,073423367	0,084181575	0,07317975	0,09335272	0,071625397
0,100865136	0,103857131	0,094999752	0,084959534	0,10876909	0,109198211
0,072687752	0,065208806	0,064621406	0,065374732	0,07849237	0,067598387
0,079484353	0,077274202	0,074903032	0,072780949	0,07761006	0,086024697
0,083206328	0,093895581	0,077894581	0,082835837	0,102433713	0,073098989
0,075434184	0,07494101	0,059481107	0,084602438	0,070592079	0,060173601
0,096400257	0,114187844	0,09575113	0,105477081	0,105480735	0,104324185

EV PROM	EXT PROM	Diferencia
7,44	7,62	-0,18
7,81	8,13	-0,32
6,77	7,00	-0,23
7,78	7,94	-0,16
9,99	10,10	-0,11
6,75	7,05	-0,30
7,72	7,88	-0,16
8,50	8,61	-0,11
7,00	7,18	-0,18
10,21	10,51	-0,30

Fecha: 23/08/2006

TPH evaporación	TPH extraccion
-----------------	----------------

1	2	3	1	2	3
0,06128461	0,067196496	0,070053132	0,062798934	0,067992061	0,070845159
0,073617618	0,071768005	0,079962327	0,075316397	0,075626394	0,075682419
0,061541766	0,063061201	0,066018137	0,063524319	0,063995502	0,066669415
0,062281204	0,060812876	0,059838199	0,073046165	0,058331979	0,054463521
0,097165059	0,102835336	0,096388236	0,103050336	0,101473715	0,096490908
0,061118583	0,061671408	0,061573	0,063905199	0,061248787	0,060454598
0,074201912	0,073417431	0,073183015	0,075001239	0,074279161	0,072985517
0,064376827	0,065699422	0,063948192	0,064958145	0,065195421	0,064653428
0,060549311	0,062999867	0,060014831	0,062616223	0,061938585	0,060009887
0,105687829	0,102648134	0,090701245	0,101852004	0,097159184	0,101421308

EV PROM	EXT PROM	Diferencia
6,62	6,72	-0,10
7,51	7,55	-0,04
6,35	6,47	-0,12
6,10	6,19	-0,10
9,88	10,03	-0,15
6,15	6,19	-0,04
7,36	7,41	-0,05
6,47	6,49	-0,03
6,12	6,15	-0,03
9,97	10,01	-0,05

Fecha: 20/09/2006

TPH evaporación			TPH extracción		
1	2	3	1	2	3

0,050380022	0,055392429	0,058805893	0,051574376	0,057078803	0,056727098
0,07234669	0,073325904	0,074795377	0,072631725	0,073913484	0,075103854
0,059253703	0,06148186	0,061302385	0,060678792	0,062131109	0,061651134
0,055123666	0,053563634	0,048260567	0,056754827	0,050026543	0,05251206
0,098860883	0,097268745	0,09961783	0,099960483	0,098501859	0,100215537
0,05209546	0,050302672	0,052403132	0,05370586	0,05111795	0,053334655
0,074061162	0,073612841	0,073623407	0,074196735	0,073790745	0,074357855
0,060578392	0,059838264	0,061117797	0,060634294	0,061727893	0,061887194
0,054551381	0,049807487	0,053171122	0,049963352	0,053016711	0,056052869
0,101878496	0,099702139	0,090771943	0,102271712	0,099846557	0,091989749

EV PROM	EXT PROM	Diferencia
5,49	5,51	-0,03
7,35	7,39	-0,04
6,07	6,15	-0,08
5,23	5,31	-0,08
9,86	9,96	-0,10
5,16	5,27	-0,11
7,38	7,41	-0,03
6,05	6,14	-0,09
5,25	5,30	-0,05
9,75	9,80	-0,06

Fecha: 18/10/2006

TPH evaporación			TPH extracción		
1	2	3	1	2	3
0,050456464	0,05065155	0,050478103	0,050902666	0,051332548	0,051996843

0,071751644	0,071522273	0,071032867	0,07239056	0,071836373	0,071168638
0,058640529	0,058072889	0,058844622	0,058977867	0,058469414	0,059115974
0,046172039	0,048611953	0,048461897	0,049303033	0,04881977	0,048253327
0,098101239	0,097850071	0,097636075	0,099618179	0,098318774	0,098258398
0,045566003	0,045431121	0,045048166	0,046825645	0,045751232	0,046659291
0,070953705	0,07106448	0,071906494	0,071145103	0,071282651	0,072128599
0,058178428	0,058094928	0,056851782	0,058964376	0,058263428	0,057544405
0,04357234	0,044790981	0,039189694	0,044534039	0,043802067	0,039557035
0,089264196	0,093714361	0,093912885	0,094573657	0,096035642	0,094696555

EV PROM	EXT PROM	Diferencia
5,05	5,14	-0,09
7,14	7,18	-0,04
5,85	5,89	-0,03
4,77	4,88	-0,10
9,79	9,87	-0,09
4,53	4,64	-0,11
7,13	7,15	-0,02
5,77	5,83	-0,05
4,25	4,26	-0,01
9,23	9,51	-0,28

ANEXO 2

(Tablas de crecimiento bacteriano)

TIEMPO 0

	10⁴		10⁵		PROM 10⁴	TIEMPO 0
	1	2	1	2		
Control 1	157	136	63	81	147	
Control 2	14	23	0	0	19	
Biorremediación 1	94	41	57	26	68	
Biorremediación 2	171	188	58	18	180	
BioSulfactante 1	98	108	3	50	103	
BioSulfactante 2	110	91	13	10	101	
BioAumentación 1	66	110	3	9	88	
BioAumentación 2	83	59	10	6	71	
BioEstimulación 1	84	87	9	10	86	
BioEstimulación 2	97	57	15	3	77	

TIEMPO 1

	10⁵		10⁶		PROM 10⁵	TIEMPO 1
	1	2	1	2		
Control 1	12	34	2	3	23	
Control 2	30	14	8	1	22	
Biorremediación 1	0	47	0	3	47	
Biorremediación 2	50	45	2	1	48	
BioSulfactante 1	5	63	0	4	63	
BioSulfactante 2	10	8	5	2	9	
BioAumentación 1	9	2	0	0	6	
BioAumentación 2	13	7	2	2	10	
BioEstimulación 1	13	3	0	0	8	
BioEstimulación 2	46	4	0	0	25	

TIEMPO 2

	10⁴		10⁵		PROM 10⁴	TIEMPO 2
	1	2	1	2		
Control 1	12	10	1	0	12	
Control 2	22	25	2	1	15	
Biorremediación 1	48	46	5	2	47	
Biorremediación 2	43	40	4	3	42	
BioSulfactante 1	79	53	1	2	66	
BioSulfactante 2	80	36	9	3	58	
BioAumentación 1	84	161	29	16	123	
BioAumentación 2	122	56	5	2	89	
BioEstimulación 1	41	57	15	15	49	
BioEstimulación 2	85	135	8	14	110	

TIEMPO 3

	10³		10⁴		PROM 10³	TIEMPO 3
	1	2	1	2		
Control 1	356	356	150	150	356	P
Control 2	230	230	84	84	230	
Biorremediación 1	300	300	81	81	300	
Biorremediación 2	251	251	89	89	251	
BioSulfactante 1	1000	1000	97	97	1000	
BioSulfactante 2	713	713	78	78	713	
BioAumentación 1	1000	1000	80	80	1000	
BioAumentación 2	1000	1000	231	231	1000	
BioEstimulación 1	215	215	100	100	215	
BioEstimulación 2	500	500	115	115	500	

TIEMPO 4

	10⁴		10⁵		PROM 10⁴	TIEMPO 4
	1	2	1	2		
Control 1	110	95	11	10	103	P
Control 2	0	0	0	0	0	
Biorremediación 1	91	58	9	15	75	
Biorremediación 2	86	98	5	9	92	
BioSulfactante 1	100	100	10	10	100	
BioSulfactante 2	100	100	10	10	100	
BioAumentación 1	118	102	10	9	110	
BioAumentación 2	109	97	4	8	103	
BioEstimulación 1	96	79	0	7	88	
BioEstimulación 2	114	130	16	13	122	

TIEMPO 5

	10⁴		10⁵		PROM 10⁴	TIEMPO 5
	1	2	1	2		
Control 1	170	228	135	135	199	P
Control 2	53	212	68	42	133	
Biorremediación 1	404	380	112	76	392	
Biorremediación 2	204	92	136	100	148	
BioSulfactante 1	228	144	80	163	186	
BioSulfactante 2	312	280	76	64	296	
BioAumentación 1	360	200	48	80	280	
BioAumentación 2	210	234	64	52	222	
BioEstimulación 1	356	180	144	42	268	
BioEstimulación 2	32	148	28	61	90	

TIEMPO 6

	10⁴		10⁵		TIEMPO 5
	1	2	1	2	PROM 10⁴
Control 1	12	15	1	2	14
Control 2	10	11	1	0	11
Biorremediación 1	78	100	10	13	89
Biorremediación 2	103	112	12	10	108
BioSulfactante 1	101	102	10	15	102
BioSulfactante 2	98	89	9	12	94
BioAumentación 1	15	18	2	4	17
BioAumentación 2	20	17	3	1	19
BioEstimulación 1	10	9	2	1	10
BioEstimulación 2	12	12	2	2	12

ANEXO 3

(Fotos de Placas de crecimientos y aparatos)



Muestra de tierra impactada con crudo



Foto del suelo después de ser cernido



Foto de pases de enriquecimiento DBT antes y despues



Materiales para el cernido del suelo



Foto de pases de enriquecimiento Naftaleno antes y después



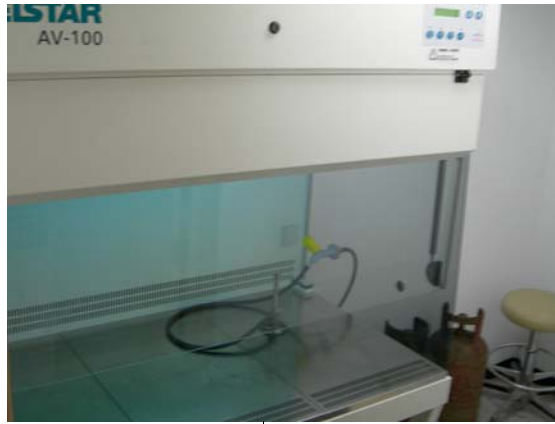
Balanza digital



Incubadora



Controlador de la campana de flujo laminar



Campana de flujo laminar



Instituto de Tecnología Avanzada

ANEXO 4

(PCR)

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

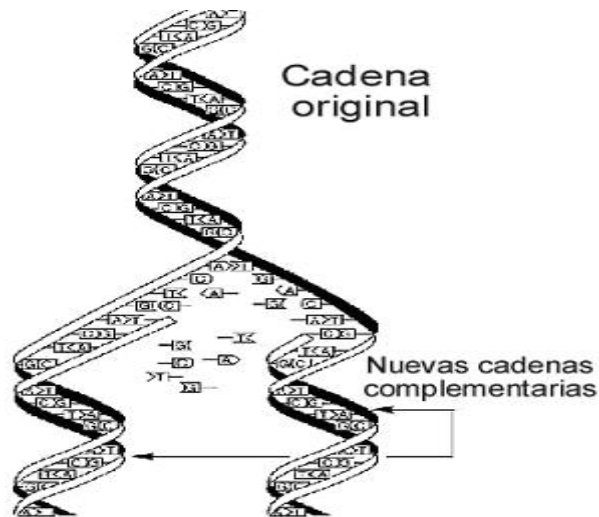
Desde que Watson y Crick publicaron el modelo de la estructura en doble hélice del ácido desoxirribonucleico o ADN, se ha producido una verdadera revolución que ha llevado a crear una nueva rama de la ciencia, la Biología Molecular, cuyo objetivo fundamental es la comprensión de todos aquellos procesos celulares que contribuyen a que la información genética se transmita eficientemente de unos seres a otros y se exprese en los nuevos individuos, es decir, aquellos procesos celulares en los que participan los ácidos nucleicos; por tanto utiliza varias herramientas y técnicas para su estudio.

Los ácidos nucleicos son el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), se consideran como polímeros de alto peso molecular, y se localizan principalmente en el núcleo de las células. Están constituidos por nucleótidos formados por una molécula de azúcar (ribosa para el ARN y desoxirribosa para ADN), una base orgánica nitrogenada (adenina, guanina, citosina y timina para el ADN y adenina, guanina, citosina y uracilo para el ARN), y un grupo fosfato.

El ADN es una estructura de forma helicoidal constituida por dos cadenas complementarias entre si; en la parte externa se localizan las moléculas de azúcar-fosfato y en la parte central se encuentran las bases orgánicas nitrogenadas unidas las de una cadena con las de la otra, a través de puentes de hidrógeno, lo que da así estabilidad a la doble hélice; las dos cadenas tienen sentidos opuestos, una va en sentido 5'→3' y la otra lo hace en sentido 3'→5'.

El ADN regula la naturaleza y composición de las células, transmite la información hereditaria, determina la estructura de las proteínas y a través de enzimas controla el resto de las funciones celulares.

Estas actividades las lleva a cabo al realizarse una copia de un fragmento de la molécula o de toda, ya sea que se requiera la síntesis de una proteína o la transmisión de la información genética de la célula. Para que ambas situaciones se realicen eficientemente, las dos cadenas de ADN deben separarse.



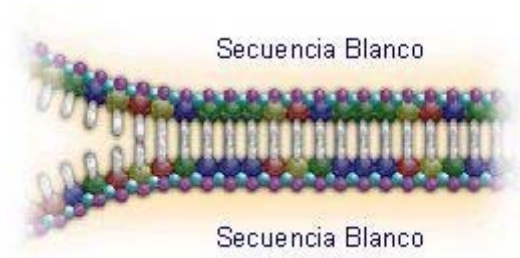
La reacción en cadena de la polimerasa (conocida como **PCR** por sus siglas en inglés, *Polymerase Chain Reaction*) permite amplificar más de un millón de veces un ADN obtenido a partir de una región seleccionada del genoma, siempre y cuando se conozca una parte de su secuencia de nucleótidos. Esta técnica fue ideada en 1989 por Kary B. Mullis que obtuvo el premio Nobel de Química en 1993 por dicho invento.

Para la PCR se utilizan dos oligonucleótidos sintéticos de unos 15 a 20 nucleótidos que son complementarios a las zonas flanqueantes de la región que se quiere amplificar. Estos oligonucleótidos (habitualmente conocidos por su nombre en inglés, "primers") actúan como cebadores para la síntesis in vitro de ADN la cual está habitualmente catalizada por una enzima llamada *Taq polimerasa*. Dicha enzima se aísla de una bacteria termófila, denominada *Thermus Aquáticus*, que es capaz de crecer a temperaturas elevadas (79 a 85 °C). A esta temperatura dicha enzima mantiene una óptima actividad. La temperatura óptima a la que actúa la *Taq polimerasa* permite el uso de elevadas temperaturas para la unión de los primers y para la extensión, de esta manera se aumenta el nivel de exigencia de la reacción y se reduce la extensión de los primers unidos inespecíficamente al ADN.

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres etapas:

1. **Desnaturalización del ADN.** Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C, que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas. Para conseguir la completa separación de las hebras de toda la muestra esta temperatura debe mantenerse 5 minutos. Si el ADN solo se desnaturaliza

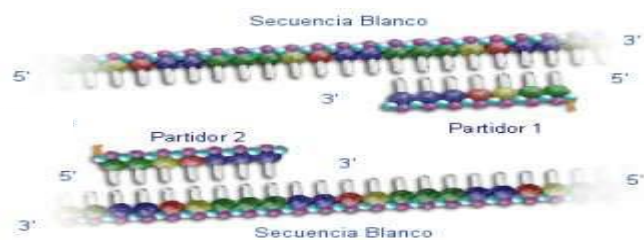
parcialmente éste tenderá a renaturalizarse rápidamente, evitando así una eficiente hibridación de los primers y una posterior extensión.



2. **Hibridación con Cebadores.** Esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 40 y los 60°C para que se pueda producir la unión de los primers a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar. La temperatura de fusión o annealing (T_m , “melting temperature”) depende de varios factores y es relativamente específica para cada primer. La longitud de los primers y la secuencia son críticas en la designación de los parámetros de una amplificación, una fórmula simple para calcular la T_m es la siguiente:

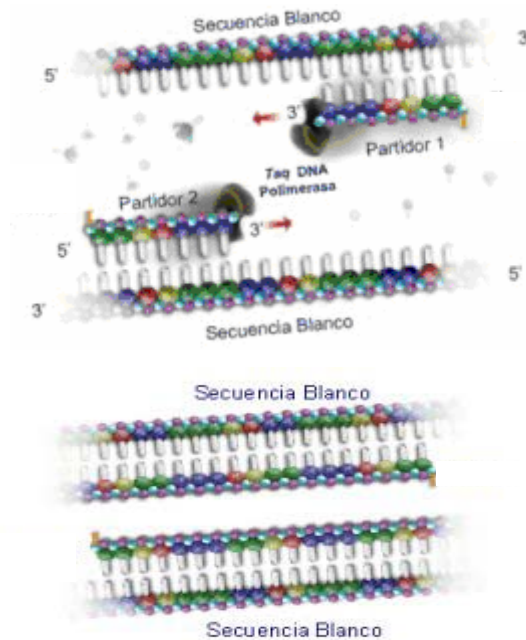
$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$$

No obstante, cada primer exige una serie de estudios experimentales para determinar su temperatura de annealing específica ya que si la temperatura es muy baja la unión se hará de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá una unión completa.



3. **Extensión con Taq Polimerasa.** Durante este paso la *Taq Polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del primer utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad. Normalmente una extensión de 20 segundos es suficiente para fragmentos menores de 500 pb, y 40 segundos para fragmentos por encima de 1.2Kb. Un factor importante en el transcurso de las

diferentes fases es el tiempo de rampa. Este se define como el tiempo invertido en pasar de una temperatura a otra y depende del diseño y de las características del aparato donde se realiza automáticamente este proceso, el termociclador. En las nuevas generaciones de termocicladores, este factor se ha ido optimizando para hacerlo mínimo.



El proceso se repite un número determinado de veces o ciclos, generalmente 30, y se consigue un aumento o amplificación exponencial del número de copias del fragmento de ADN que sirvió como molde.

Una ventaja de la técnica es que amplifica únicamente el fragmento de ADN que queremos, aunque esté en cantidades mínimas (alta sensibilidad) o en presencia de grandes cantidades de ADN semejantes (alta especificidad). La reacción es eficaz incluso si la muestra de ADN se encuentra muy poco purificada, es decir, que se encuentre en presencia de otros componentes.

2.2.9.1 Componentes de la PCR

- **Buffer de Amplificación.** Los buffer de PCR que se utilizan normalmente contienen KCl, Tris y MgCl₂. El MgCl₂ es el componente que más influye en la especificidad y rendimiento de la reacción ya que los iones Mg²⁺ son necesarios para la actividad de la *Taq polimerasa*, es decir, actúan como cofactores de la polimerasa. La concentración óptima de MgCl₂ está en torno a 1.5 mM si se emplean concentraciones de 200 μM de cada uno de los dNTPs. No obstante, a veces es necesario probar con diferentes cantidades de Mg²⁺ ya que un exceso

del mismo origina una acumulación de productos inespecíficos y una cantidad insuficiente hace que disminuya el rendimiento de la amplificación.

- **Primers.** A la hora de elegir unos primers para amplificar un determinado fragmento de ADN hay una serie de reglas a seguir:

1. La *longitud de cada uno de los primers* debe estar comprendida entre 18 y 24 bases ya que se ha comprobado que primers de mayor longitud (30-35 bases) no aumentan el rendimiento y los primers cortos carecen de suficiente especificidad.
2. Ambos primers deben tener una *T_m* similar (como mucho la diferencia entre ambas temperatura debe ser de 5°C).
3. La *relación bases púricas: bases pirimidínicas* debe ser 1:1 (o como mucho 40-60%).
4. Para evitar la formación de *dímeros de primers* es necesario comprobar que los primers no contengan secuencias complementarias entre sí.

Los *dímeros de primers* consisten en fragmentos de doble cadena cuya longitud es muy próxima a la de la suma de los primers y se producen cuando un primer es extendido a continuación del otro. El mecanismo exacto por el que se forman estos dímeros no está completamente determinado. La observación de que primers con los extremos 3' complementarios favorecen su formación sugiere que el paso inicial se debe a interacciones transitorias que aproximan los extremos complementarios.

- **Desoxinucleótidos Trifosfatos.** Las concentraciones de dNTPs que suelen usarse están en torno a 200 µM para cada uno de ellos. En un volumen de reacción de 25 µl con esta concentración de dNTPs se sintetizarían entre 6 a 6.5 µg de ADN. La concentración de dNTPs y de MgCl₂ va relacionadas ya que el Mg se une a los dNTPs con lo que concentraciones elevadas de dNTPs inhibirían la reacción al no tener la *Taq polimerasa* suficiente Mg como para incorporar dNTPs. Para una concentración de 200 µM de cada dNTP se suele añadir MgCl₂ a una concentración de 1.5 mM.
- **Taq-Polimerasa.** Las cantidades óptimas de *Taq polimerasa* necesarias para la síntesis de ADN están alrededor de 2 unidades en 25 µl de volumen final de reacción. La actividad de este enzima se ve influenciada por la concentración de dNTPs, de Mg²⁺ y de algunos iones monovalentes de manera que concentraciones elevadas de los mismos inhiben dicha actividad. Por otro lado,

pequeñas concentraciones de KCl estimulan la actividad sintética de la Taq en un 50 a 60% con un máximo aparente cuando su concentración es de 50 mM. Existen algunos datos relacionados con la influencia de ciertos reactivos que se emplean antes de la amplificación y que alteran la actividad de la Taq. Por ejemplo, concentraciones 1M de urea estimulan la actividad, el SDS a bajas concentraciones que la inhibe al igual que concentraciones mayores del 10% de etanol.

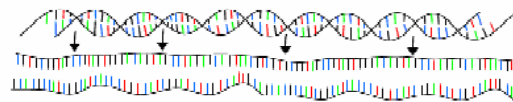
- **ADN molde o “Template”**. Es el ADN del cual queremos copiar un determinado fragmento, es, por tanto, el ADN que la Taq polimerasa utiliza como molde para la síntesis de nuevas cadenas polinucleotídicas. La cantidad de ADN necesaria para la PCR depende de varios factores:
 1. Del *marcador* que se va a amplificar: hay marcadores cuyos primers son más específicos o bien cuyas condiciones de amplificación están mejor optimizadas que las de otros. Por esta razón puede darse el caso de que cierta cantidad de ADN (sobre todo cuando jugamos con cantidades mínimas) amplifique para unos marcadores pero no para otros. Por ello, cuando en un laboratorio se va a utilizar un nuevo marcador es necesario hacer un estudio de validación en él que se incluye un estudio de sensibilidad. De dicho estudio de sensibilidad puede sacarse como conclusión cuál es la mínima cantidad de ADN que amplifica en condiciones estándar.
 2. **Calidad del ADN**: Cuando se trabaja con ADN cuya calidad es óptima no suele haber problemas en la amplificación y cantidades del mismo por encima e incluso por debajo de los 5 ng rinden buenos resultados. El problema aparece cuando la calidad del ADN obtenido no es la idónea, bien porque esté degradado o bien porque dicho ADN vaya ligado a una serie de contaminantes que pueden inhibir la actividad de la polimerasa. Si el ADN está degradado por la acción de enzimas de restricción el que obtengamos o no resultado en la amplificación va a depender de que el fragmento a amplificar haya sido dañado o no. En el caso en el que tengamos ADN sin degradar pero unido a una serie de contaminantes habría que intentar diluir al máximo la muestra para disminuir dichos contaminantes, pero siempre dentro de un rango de ADN que no esté por debajo del límite de sensibilidad de la PCR.

Una vez amplificada la molécula del DNA que se desea, se coloca la muestra en gel de poliacrilamida, en el que se agrega azul de bromofenol que nos permitirá visualizar cómo la muestra corre a través del gel, para lo que se emplea corriente eléctrica a 100 mV, durante 30 a 40 minutos.

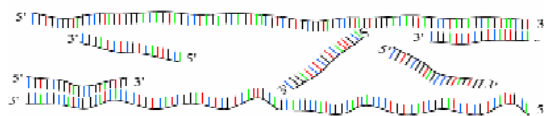
De acuerdo con el tamaño de la molécula de ADN, será la distancia que correrá en el gel; posteriormente este se tiñe con bromuro de etidio que permite visualizar la extensión en forma de bandas con el empleo de luz ultravioleta. La banda obtenida se compara con un marcador de peso molecular para poder establecer su tamaño y así verificar si corresponde al fragmento que se busca o se puede correr al mismo tiempo que un control conocido y establecer comparaciones entre ambas bandas ^[21].

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

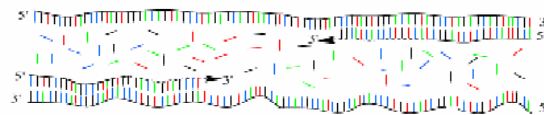
30-40 ciclos en tres pasos:



Paso 1: Desnaturalización
1 min a 94°C



Paso 2: Hibridación
45 seg a 55°C
Comienzan a actuar los
Primers o Cebadores



Paso 3: Elongación
2 min a 72°C
Sólo actúan los dNTPs