

EFFECTO DE LA BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN SOBRE LA REMOCIÓN DE CONTAMINANTES EN AGUA DEL PUERTO DE ISLA DE TOAS

DESIREE ALBURGUE¹, LAUGENY DÍAZ-BORREGO^{1,*}, JULIO MARÍN², EVER MORALES¹

¹ Universidad del Zulia. Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Biología, Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos. *e-mail: ldiaz@fec.luz.edu.ve

² Universidad del Zulia. Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería Civil, Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA)

Recibido: marzo 2016

Aprobado para publicación: julio 2016

RESUMEN

Los desechos resultantes de actividades domésticas e industriales del hombre, de manera directa o indirecta, llegan a los cuerpos de agua naturales, provocando cambios en sus propiedades físicas, químicas y biológicas. En este trabajo se evaluó el efecto de las técnicas de bioestimulación y bioaumentación sobre la remoción de contaminantes en agua del puerto de lanchas de Isla de Toas (Lago de Maracaibo, Venezuela). Se emplearon unidades experimentales (250 mL) que contenían agua del sitio de estudio contaminada con gasoil al 1 % v/v, observándose crecimiento microalgal y bacteriano para todas las condiciones de ensayo. Si bien no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos bioestimulados y bioaumentados en cuanto a la remoción de hidrocarburos totales del petróleo (TPH), se obtuvo un mejor comportamiento en los bioaumentados, con remociones de materia orgánica de 99,8 % en tratamientos con 0,5 y 1 mL/L de fertilizante, 40,8 % para TPH en el tratamiento con 1 mL/L de fertilizante, 87,5 % de fosfato en el tratamiento con 0,5 mL/L de fertilizante y 66,7 % de nitrato en el tratamiento con 1,0 mL/L de fertilizante. Se recomienda seguir investigando sobre las potencialidades de las técnicas de bioestimulación y bioaumentación con el uso de microorganismos autóctonos, en cuanto a la remoción de contaminantes presentes en aguas naturales.

Palabras clave: bioaumentación, bioestimulación, consorcio microbiano, hidrocarburos, microorganismos autóctonos

EFFECT OF BIOSTIMULATION AND BIOAUGMENTATION ON POLLUTANTS' REMOVAL IN WATER FROM TOAS ISLAND HARBOR

ABSTRACT

The wastewaters from domestic and industrial activities, directly or indirectly reach natural water bodies, causing changes in their physical, chemical and biological properties. In this work the effect of biostimulation and bioaugmentation techniques on pollutants' removal in water from Toas Island harbor (Maracaibo Lake, Venezuela) was evaluated. Experimental units (250 mL) containing study site water contaminated with gasoil 1% v/v were used. Microalgal and bacterial growth were observed for all test conditions. Although there were no significant differences ($p > 0.05$) between biostimulated and bioaugmented treatments in terms of the removal of total petroleum hydrocarbons (TPH), a better performance was obtained in the bioaugmented with removals of: 99,8% removal for organic matter in the treatment with 0.5 and 1 mL/L of fertilizer, 40.80% for total petroleum hydrocarbons (TPH) in the treatment with 0.25 mL/L of fertilizer, 87.5% for phosphate in the treatment with 0.5 mL/L of fertilizer and 66.7% for nitrate in the treatment with 1.0 mL/L of fertilizer. We recommend further investigations on the potential of biostimulation and bioaugmentation techniques with the use of autochthonous microorganisms in the removal of contaminants present in natural waters.

Keywords: bioaugmentation, biostimulation, hydrocarbons, indigenous microorganisms, microbial consortium

INTRODUCCIÓN

En el puerto de lanchas de Isla de Toas (Lago de Maracaibo), municipio insular Padilla (estado Zulia), se realizan

actividades de transporte marítimo con embarcaciones que utilizan combustible gasoil para su funcionamiento, lo que ocasiona problemas de contaminación de las aguas adyacentes por derrames continuos de hidrocarburos.

Esto puede llegar a generar serios problemas de impacto ambiental y de toxicidad en las comunidades tróficas propias del ecosistema acuático (Perhar & Arhonditsis 2014).

La biorremediación in situ es una técnica que permite eliminar, atenuar o transformar los compuestos contaminantes en la zona afectada, empleando la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas). La microbiota frecuentemente asociada a los espacios contaminados (autóctona), reúne características ecológicas y metabólicas muy valiosas, puesto que son degradadores naturales de los compuestos xenobióticos presentes (Barrios, 2011; Colin *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013).

El desarrollo de sistemas de tratamiento biológico que puedan degradar eficientemente las mezclas complejas de contaminantes en aguas naturales contaminadas, puede llevarse a cabo mediante la implementación de consorcios microbianos autóctonos. Estas asociaciones tienen la capacidad de utilizar las potencialidades metabólicas de grupos distintos de microorganismos para degradar y/o remover una amplia variedad de compuestos orgánicos y/o inorgánicos (Herrero & Stuckey, 2015; Shukla *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2015). Adicionalmente, las técnicas de bioestimulación y bioaumentación, mediante la incorporación de elementos nutritivos y de biomasa microbiana, respectivamente, contribuyen a potenciar las capacidades de los procesos de biodegradación durante el tratamiento biológico de aguas contaminadas (Andreolli *et al.*, 2015; Herrero & Stuckey, 2015; Olaniran *et al.*, 2006; Shukla *et al.*, 2014).

En esta investigación se evaluó el efecto de las técnicas de bioestimulación (fertilizante comercial) y bioaumentación (consorcio microbiano autóctono), sobre la remoción de contaminantes (fósforo, nitrógeno, materia orgánica e hidrocarburos) en agua superficial del puerto de lanchas de Isla de Toas, estado Zulia, Venezuela.

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

Recolección del agua superficial

En el puerto de lanchas de Isla de Toas, estado Zulia, Venezuela, se colectaron muestras puntuales de agua superficial a un metro de distancia del muelle aproximadamente, en envases plásticos con capacidad de 18 L, con ayuda de un captador de plástico previamente desinfectado con hipoclorito de sodio (5% v/v). Estas muestras se trasladaron inmediatamente al laboratorio en una cava con hielo a una temperatura aproximada de 4°C,

para instalar las unidades experimentales. Adicionalmente, se conservaron alícuotas de muestras para la caracterización fisicoquímica y microbiológica inicial del agua fresca.

Diseño experimental

Los ensayos de tratabilidad (tanto el control como los tratamientos) se realizaron a escala de 250 mL en botellas de vidrio (por triplicado), mediante la incorporación de gasoil al 1% v/v como fuente de hidrocarburos (previamente esterilizado por filtración con membrana de nitrocelulosa de 0,22 µm de tamaño de poro), empleándose las estrategias de bioestimulación y bioaumentación con fertilizante foliar (Nitrofoska®) a diferentes concentraciones (Tabla 1).

Tabla 1. Matriz experimental del estudio de tratabilidad para la remoción de contaminantes en el agua superficial del puerto de Isla de Toas

Unidad	Agua de Isla de Toas	Gasoil 1% v/v	Fertilizante Nitrofoska® (mL/L)			Inóculo con consorcio 20% v/v
			0,25	0,5	1,0	
Control	X	X				
Tratamiento 1 ^a	X	X	X			
Tratamiento 2 ^a	X	X		X		
Tratamiento 3 ^a	X	X			X	
Tratamiento 4 ^b	X	X	X			X
Tratamiento 5 ^b	X	X		X		X
Tratamiento 6 ^b	X	X			X	X

^a bioestimulados, ^b bioaumentados. Consorcio: bacteria-microalga

Las unidades experimentales se mantuvieron a temperatura constante de 30±2°C, fotoperíodo luz: oscuridad 12:12 horas a 6 klux, agitación manual diaria y 32 días de ensayo. Estas unidades fueron evaluadas cada cuatro días, mediante la medición de parámetros fisicoquímicos y microbiológicos, tales como pH, recuento bacteriano, densidad celular y pigmentos microalgales. Al inicio y final de los tratamientos también se cuantificaron las concentraciones de nitrato (NO₃⁻) por el método de reducción en columna de cadmio, ortofosfato (PO₄³⁻) por el método colorimétrico del ácido vanadomolibdofosfórico, nitrógeno total (NT) por el método volumétrico estándar (incluyendo el N-inorgánico), demanda química de oxígeno (DQO) por el método volumétrico previa digestión en reflujo cerrado e hidrocarburos totales del petróleo (TPH, siglas en inglés) por el método gravimétrico estándar (APHA, AWWA & WF, 2005).

Conformación del consorcio microbiano

El consorcio microbiano (bacterias-microalga) estuvo conformado por un cultivo mixto de tres cepas bacterianas (*Pseudomonas pertucinogena*, *Pseudomonas syringae* y *Sphingomonas paucimobilis*) previamente aisladas de muestras de agua provenientes del sitio de muestreo e identificadas por Hernández (2014), y un cultivo unialgal de *Chlorella* spp. (con sus bacterias asociadas), también obtenida del puerto de Isla de Toas. Estos microorganismos fueron mantenidos en medios de cultivo como agar de conservación para las bacterias y medio con agua destilada estéril y el fertilizante Nitrosfoka® a una concentración de 0,5 mL/L para la microalga, bajo condiciones de laboratorio en asepsia y aplicados a los tratamientos en una proporción del 20% v/v (Tabla 1).

Parámetros de crecimiento microbiano

Los parámetros microbiológicos evaluados fueron tres: estimación de densidad celular de microalgas por observación directa al microscopio de campo claro (Tortora *et al.*, 2007), determinación de pigmentos (clorofila total y carotenoides) por espectrofotometría (Jeffrey & Humphrey, 1975; Strickland & Parsons, 1972) y cuantificación bacteriana por el método de dilución en placas (APHA, AWWA & WF, 2005; Tortora *et al.*, 2007).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para detectar si hay diferencias significativas entre el control y los tratamientos, en cuanto a los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos establecidos. Seguidamente se aplicó una prueba Tukey a un nivel de significancia del 95 %, para determinar las diferencias entre los tratamientos. Estos análisis se realizaron utilizando el programa SPSS 10.0 para Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fisicoquímica del agua superficial

La caracterización fisicoquímica inicial del agua del puerto de Isla de Toas (Tabla 2) muestra que su composición excede los límites permisibles en la Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Aguas y Vertidos de Efluentes Líquidos (1995) para aguas marinas o de medios costeros destinadas a la cría y explotación de moluscos consumidos en crudo (tipo 3) y para aguas destinadas a balnearios, deportes acuáticos, pesca deportiva, comercial y de subsistencia (tipo 4), específicamente en

cuanto a residuos de petróleo (hidrocarburos), así como también para la descarga a cuerpos de agua naturales, en cuanto a DQO (350 mg/L) y TPH (20 mg/L) (Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Aguas y Vertidos de Efluentes Líquidos, 1995).

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica inicial (n=3) del agua superficial del puerto de Isla de Toas, estado Zulia (Venezuela) contaminada con 1% v/v de gasoil y límites permisibles de la normativa nacional

Parámetro	Media aritmética± desviación estándar	Agua tipo 3 ^a	Agua tipo 4 ^a	Descarga a cuerpos de agua ^a
Temperatura (°C)	30,2±0,1	-	-	c
pH	7,52±0,01	6,5-8,5	6,5-8,5	6-9
Salinidad (%)	0,41±0,02	-	-	-
Nitrito (mg/L)	< 0,025	-	-	10 ^d
Nitrato (mg/L)	0,03±0,01	-	-	10 ^d
Nitrógeno amoniacal (mg/L)	< 0,05	-	-	
Nitrógeno total Kjeldahl (mg/L)	2,24±0,11	-	-	40 ^e
Ortosfato (mg/L)	0,08±0,01	-	-	
Fósforo total (mg/L)	0,52±0,04	-	-	10
Demanda química de oxígeno (mg/L)	717,63±189,38	-	-	350
Hidrocarburos totales del petróleo (mg/L)	6211,66±2972,83	Ausentes ^b	Ausentes ^b	20 ^f

^a Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Aguas y Vertidos de Efluentes Líquidos (1995), ^b residuos de petróleo, ^c diferencia <3°C, ^d nitrito+nitrato, ^e N-total, ^f aceites minerales e hidrocarburos

Unidades experimentales con bioestimulación y bioaumentación pH

Las unidades experimentales control, así como los tratamientos bioestimulados 1 y 2, presentaron diferencias significativas (p<0,05) de los valores de pH con respecto al tratamiento bioestimulado 3 y los bioaumentados (4, 5 y 6). El rango de pH obtenido en esta investigación (7,06-7,30) se encuentra dentro de los valores considerados favorables para la biodegradación de hidrocarburos. Al respecto, Nievas *et al.* (2005), señalaron una mejor eficiencia en la biodegradación de desechos grasos de sentina para pH entre 6,5 y 7,5; usando una comunidad microbiana

nativa. Adicionalmente, los datos estuvieron dentro del rango permisible de la normativa venezolana para la descarga a cuerpos de agua naturales (6-9) (Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Aguas y Vertidos de Efluentes Líquidos, 1995).

Densidad microalgal

El entendimiento de la estructura y dinámica poblacional de las comunidades durante el proceso de tratamiento con consorcios microbianos autóctonos, permite diseñar estrategias de control para la optimización de las tasas de eliminación de nutrientes y otros contaminantes (Bacosa *et al.*, 2012; Ciesielski *et al.*, 2010). Considerando lo anterior, a continuación se explicará la dinámica poblacional del consorcio microbiano autóctono durante el proceso de tratamiento.

En las unidades control se observó un crecimiento regular con una densidad inicial de $2,50 \pm 4,33 \times 10^3$ cél/mL, seguido de una fase de adaptación entre los días 8 y 12, cuando su densidad celular se redujo a la misma concentración inicial. Posteriormente se observó un crecimiento exponencial hasta el día final del ensayo (32 días), con una densidad celular de $1,20 \times 10^4 \pm 1,66 \times 10^5$ cél/mL (Figura 1a), velocidad de crecimiento (μ) de $0,36$ div.días⁻¹ y tiempo de generación (td) de 1,90 días. El crecimiento microalgal en presencia de gasoil, sin la adición de fertilizante ni de microorganismos, posiblemente resultó del proceso de pre-adaptación de la biomasa autóctona a los hidrocarburos presentes en el agua del puerto (Shukla *et al.* 2014).

El tratamiento 1 partió de $4,50 \pm 6,72 \times 10^4$ cél/mL, alcanzando su fase exponencial a una densidad máxima de $6,17 \times 10^4 \pm 3,82 \times 10^3$ cel/mL (Figura 1b), con μ menor al control de $0,26$ div.días⁻¹ y td de 2,68 días. Los tratamientos 2 y 3 (Figuras 1c y 1d) presentaron una fase de aclimatación o adaptación más prolongada, debido además de la presencia de gasoil, al efecto del aumento de la concentración de fertilizante. Así, el tratamiento 2 presentó td de 1,48 días y mayor μ con respecto a los cultivos anteriores, de $0,47$ div. días⁻¹, comparativamente con el tratamiento 3 que exhibió rápido crecimiento y duplicación con μ de $0,30$ div.días⁻¹ y menor td de 2,34 días.

Por su parte, los cultivos bioaumentados con el consorcio de microorganismos más la adición de fertilizante, presentaron mayor densidad celular con respecto a los cultivos bioestimulados y al control, infiriéndose de la misma manera que estos microorganismos endógenos se encontraban pre-adaptados a la exposición de gasoil. Esta aseveración puede observarse por el acortamiento en la fase de aclimatación de los tratamientos bioestimulados (1, 2 y 3) y el control (Figura 1). De esta manera, los tratamientos bioaumentados 4, 5 y 6, iniciaron con una concentración microalgal de $7,71 \pm 5,84 \times 10^4$; $9,08 \pm 2,22 \times 10^4$; $8,67 \pm 2,72 \times 10^4$ cél/mL, respectivamente, y presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ellos, con una corta fase de adaptación hasta el día cuatro, a pesar de que cada tratamiento estaba compuesto por diferentes concentraciones de nutrientes. No obstante, luego de la fase exponencial estos tratamientos presentaron un comportamiento diferente en su dinámica poblacional, por la forma de aprovechamiento de esos nutrientes a distintas concentraciones (Figura 1e al 1g).

El tratamiento 4 (0,25 mL/L de fertilizante) exhibió un crecimiento exponencial hasta el día 20, con una densidad de $6,90 \pm 2,81 \times 10^6$ cél/mL. Seguidamente se reflejó la fase de declinación o muerte celular con unas fluctuaciones hasta el día 32, cuando el recuento celular llegó hasta $1,90 \pm 2,45 \times 10^6$ cél/mL (Figura 1e). En cuanto al tratamiento 5 (0,50 mL/L), se presentó una fase exponencial con una leve fluctuación entre los días 12 y 20, siendo este último el máximo exponencial con un recuento celular de $1,10 \times 10^7 \pm 1,06 \times 10^6$ cél/mL. Posteriormente se dio la fase estacionaria hasta el día 24 y una fase de declinación hasta el día 32 (Figura 1f), cuando la cantidad de células que morían era mayor a la cantidad de células que se dividían.

El tratamiento 6 (1,0 mL/L) mostró la mayor concentración celular a los 32 días ($2,86 \times 10^7 \pm 4,67 \times 10^6$ cél/mL, Figura 1g), con un crecimiento exponencial a partir del día cuatro y una leve variación a los 28 días de ensayo. Para esta condición se obtuvo μ de $0,39$ div.días⁻¹ y td de 1,80 días; mientras que los tratamientos 4 y 5 reflejaron μ de $0,41$ y $0,39$ div.días⁻¹ y td de 1,68 y 1,77 días, respectivamente.

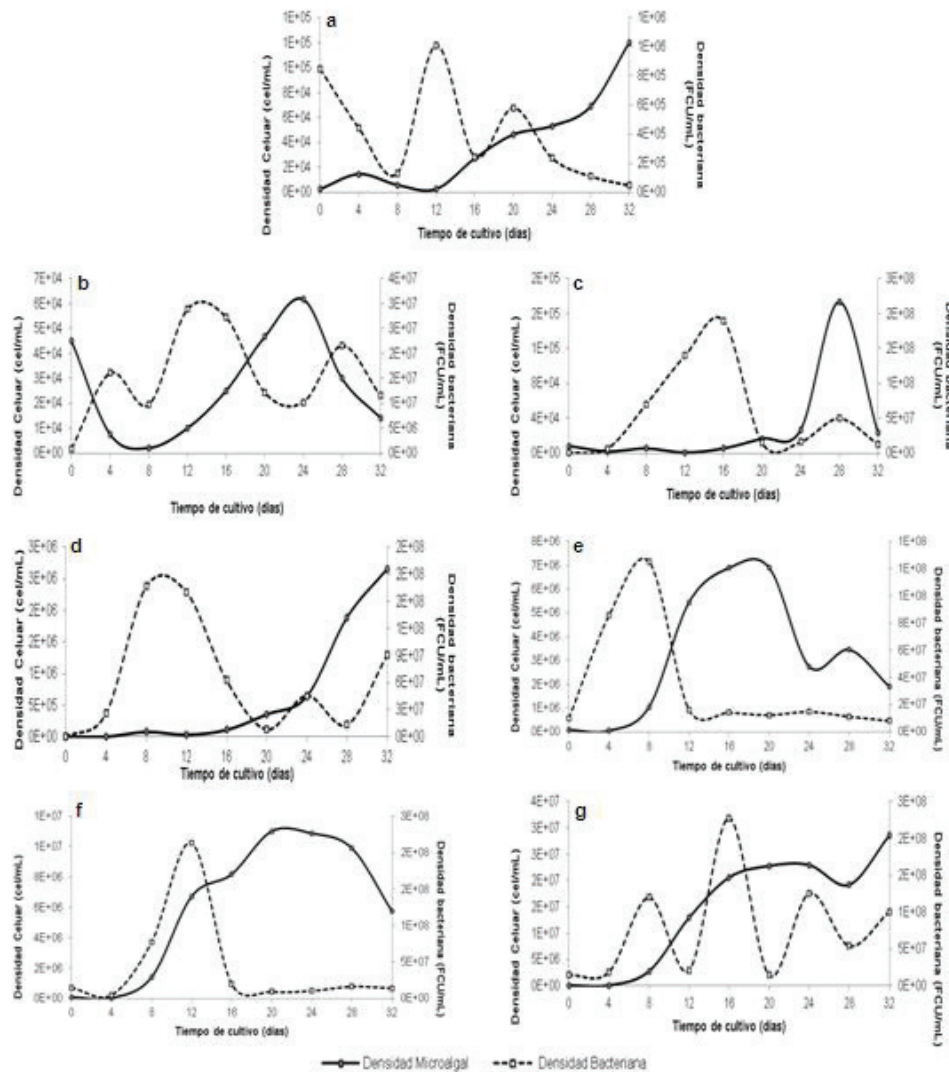


Figura 1. Densidad celular de la microalga *Chlorella* spp. y densidad bacteriana en las unidades experimentales con agua del puerto de Isla de Toas en presencia de gasoil 1 % v/v. a) Control, b) Tratamiento bioestimulado 1 (0,25 mL/L de fertilizante), c) Tratamiento bioestimulado 2 (0,5 mL/L de fertilizante), d) Tratamiento bioestimulado 3 (1,0 mL/L de fertilizante), e) Tratamiento bioaumentado 4 (0,25 mL/L de fertilizante), f) Tratamiento bioaumentado 5 (0,5 mL/L de fertilizante), g) Tratamiento bioaumentado 6 (1,0 mL/L de fertilizante)

En términos generales, todas las unidades de tratabilidad presentaron crecimiento microalgal, lo que determina la posibilidad de usar la microalga autóctona *Chlorella* spp. para la remoción de contaminantes en las aguas costeras de la isla, puesto que se adapta a las condiciones de exposición a hidrocarburos. En la investigación realizada por Portilla (2010), se estableció que la máxima densidad celular de la microalga *Chlorella* spp. para una proporción del fertilizante Nitrofoska® de 1,0 mL/L fue de $4,39 \times 10^6$ cél/mL, la cual resulta menor a la obtenida en el presente estudio para el tratamiento 6 bioaumentado (1,0 mL/L). No obstante, en el tratamiento 3 bioestimulado (1,0 mL/L) se alcanzó un recuento máximo de $2,66 \times 10^6$ cél/mL, siendo menor al reportado por este autor. Estas diferencias se pueden

atribuir a las condiciones particulares de experimentación y de desempeño de las cepas microalgales.

Densidad bacteriana

Las unidades control y el tratamiento 1 presentaron menor densidad bacteriana con respecto a los tratamientos 2 y 3 (bioestimulados) (Figura 1), con diferencias significativas a nivel de 95% de confianza. Se evidenciaron fluctuaciones en los recuentos bacterianos a través del tiempo, puesto a medida que aumentaba la densidad celular de las microalgas, disminuía la densidad bacteriana y viceversa; esto posiblemente por fenómenos de competencia entre los grupos microbianos (Zeng *et al.* 2015).

Las unidades bioaumentadas mostraron la mayor densidad bacteriana en comparación con los tratamientos bioestimulados y control, con recuentos bacterianos medios de $3,30 \pm 4,22 \times 10^7$; $4,22 \pm 6,78 \times 10^7$; $7,74 \pm 7,29 \times 10^7$ UFC/mL, para los tratamientos 4, 5 y 6, respectivamente. El perfil de crecimiento del control y los tratamientos bioestimulados (Figura 1) presentaron fluctuaciones en la densidad poblacional bacteriana, posiblemente porque el agua del puerto de lanchas de la isla es pobre en nutrientes (Tabla 2), lo que requiere un mayor tiempo de adaptación de los microorganismos a la adición de nutrientes para la estimulación del crecimiento (Bacosa *et al.*, 2012).

Los tratamientos 4 y 5 (Figuras 1e y 1f) presentaron un perfil de crecimiento más definido en comparación a los otros. En el tratamiento 4 las bacterias no reflejaron una fase de adaptación a las condiciones de cultivo, lo que indica la adecuada cantidad de nutrientes a 0,25 mL/L de fertilizante y una adaptación previa a la exposición con gasoil. En los tratamientos 5 y 6 la fase de aclimatación resultó ser un poco más prologada hasta el día cuatro; además, en el tratamiento 6 (Figura 1g), se observaron fluctuaciones en los recuentos bacterianos durante todo el ensayo, lo que pudo resultar de la concentración de fertilizante empleada (1,0 mL/L), o de la competencia entre las bacterias del consorcio y las provenientes del agua del puerto de lanchas de la isla. En este sentido, Bacosa *et al.* (2012), explicaron el papel de los principales grupos bacterianos de un consorcio en el catabolismo preferencial de hidrocarburos aromáticos, donde *Burkholderia* spp. fue identificado como el principal degradador, mientras que *Achromobacter* spp., *Alcaligenes* spp. y *Rhodanobacter* spp., si bien no participan de las reacciones de descomposición, utilizan los intermediarios metabólicos de otros géneros para su crecimiento.

En resumen, todas las unidades de ensayo presentaron crecimiento abundante de bacterias en presencia de gasoil, particularmente después de cierta estabilización de las condiciones experimentales (día 12). Así mismo, Riaño *et al.*, (2012) describieron el decrecimiento de la población de microalgas y el incremento de cianofitas y bacterias, en la etapa final de la biodegradación de efluentes de industrias procesadoras de pescado con un consorcio microbiano. En el presente estudio, la densidad de bacterias durante las pruebas de tratabilidad tuvieron el siguiente orden en cuanto a la densidad bacteriana $T6 > T3 > T2 > T5 > T4 > T1 > \text{control}$. Al comparar los tratamientos aplicados con respecto al control, se demuestra que la adición de nutrientes fue crucial para mantener una cierta densidad poblacional bacteriana en las unidades.

Producción de pigmentos

La producción de clorofila total (clorofila *a+b*) y carotenoides por parte de la microalga *Chlorella* spp., tanto en los tratamientos bioestimulados como en los bioaumentados y control, estuvo en correspondencia con el crecimiento microalgal (Figura 2). Tal como lo describió Rosales-Loaiza *et al.* (2008) para la microalga salina *Dunaliella viridis*, se observó que el contenido de clorofila dependió de la biomasa microalgal. El comportamiento en la producción de clorofila *a* fue similar al comportamiento de los tenores de clorofila total. Los tratamientos bioestimulados, bioaumentado 4 y control no presentaron diferencias significativas en cuanto a la producción de pigmentos ($p > 0,05$), mientras que sí fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) con respecto al tratamiento bioaumentado 5, y este a su vez con respecto a los demás tratamientos y el control. Esto quiere decir que la adición de inóculo y concentraciones elevadas de nutrientes tuvieron un efecto positivo en la producción de clorofila total.

Por otra parte, la producción de pigmentos por *Chlorella* spp. para los tratamientos bioestimulados y bioaumentados mostraron un patrón de crecimiento en correspondencia con las concentraciones de nutrientes (fertilizante Nitrofoska®), es decir, a medida que aumentaba el aporte de nutrientes, incrementaba la concentración de pigmentos fotosintéticos. Esto sugiere que los elementos nutritivos como nitrógeno y fósforo contenidos en el fertilizante estimulan el crecimiento de la microalga y, en consecuencia, aumenta la producción de pigmentos por parte de esta microalga (D'Alessandro & Antoniosi 2016).

La mayor producción de pigmentos fotosintéticos se reflejó a los 32 días de ensayo en el tratamiento 6 (1,0 mL/L de fertilizante), con valores en clorofila total de $36,10 \pm 13,53$ $\mu\text{g/mL}$ y carotenoides de $5,18 \pm 1,26$ $\mu\text{g/mL}$, correspondiente con la mayor densidad microalgal registrada. Esta unidad, al igual que los tratamientos 3, 5 y control, expresaron un aumento constante de ambos pigmentos (clorofila total y carotenoides) durante el tiempo, lo que se corresponde con el incremento de la densidad celular. Los pigmentos naturales tienen un papel importante en el metabolismo de fotosíntesis y la pigmentación en las algas, además de poseer actividades biológicas beneficiosas, tales como antioxidante, anti-cancerígeno, anti-inflamatorios, anti-obesidad, anti-angiogénico y neuroprotector (D'Alessandro & Antoniosi 2016), lo cual se traduce en un valor económico adicional para este tipo de tratamiento.

Remoción de contaminantes

Las concentraciones finales (día 32 de experimentación) de los contaminantes evaluados en las unidades experimentales con agua superficial del puerto de Isla de Toas, en presencia de gasoil 1% v/v, se presentan en la Tabla 3.

La mayor remoción de contaminantes ocurrió en los tratamientos bioaumentados (4, 5 y 6), reflejando así una eficiencia variable en función de los nutrientes y la biomasa aportada. Los mejores valores de remoción fueron los siguientes: en los tratamientos 5 (0,5 mL/L) y 6 (1 mL/L) se removió la materia orgánica en un 99,8 %; en el tratamiento 4 con 0,25 mL/L de fertilizante, se logró remover el 40,8 % de TPH; en el tratamiento 5 (0,5 mL/L) 87,5 % de ortofosfato; y en el tratamiento 6 (1,0 mL/L) 66,7% de nitrato.

Las eficiencias encontradas son comparables a las reportadas en otros trabajos. Tam & Wong (2000) indicaron una remoción de fósforo en un 95 % usando la microalga *Chlorella vulgaris*, mientras que Guoan *et al.* (1996) lograron una eficiencia de 90 % para fosfato en agua residual aplicando esta misma especie de microalga. En cuanto a los hidrocarburos, Xu *et al.* (2013) observaron tasas de biodegradación para naftaleno, fenantreno, pireno y petróleo crudo de 53, 21, 32 y 44%, respectivamente, empleando un consorcio microbiano aislado de una fosa petrolera.

Eweis *et al.* (1999) y Flathman *et al.* (1995) establecieron que un microorganismo es adecuado para procesos de biorremediación mientras sea capaz de degradar el sustrato con una eficiencia de 30-40 %, lo cual se cumplió bajo las condiciones del presente estudio en los tratamientos bioaumentados.

No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) para las remociones de TPH entre los tratamientos bioestimulados y bioaumentados, pero sí con respecto al control. No obstante, la remoción de contaminantes como nitrógeno total, fosfato y materia orgánica sí mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos bioestimulados y bioaumentados y con respecto al control (Tabla 3).

A pesar de que los mayores porcentajes de remoción se evidenciaron en los tratamientos bioaumentados, en los bioestimulados también se pudieron eliminar los

contaminantes aunque en menor medida. Las menores remociones con los tratamientos bioestimulados se obtuvieron en el control, posiblemente como resultado de la baja concentración de nutrientes y escasa densidad microbiana, tal como fue establecido por Kadlec *et al.* (2000).

Si bien las concentraciones finales de TPH en los tratamientos bioestimulados y bioaumentados no lograron cumplir con los límites de descarga de la normativa ambiental (20 mg/L, Normas para la Clasificación y el Control de la Calidad de los Cuerpos de Aguas y Vertidos de Efluentes Líquidos 1995), los niveles de NO_3^- , NT, PO_4^{3-} y DQO sí estuvieron por debajo de los límites permisibles (Tablas 2 y 3), haciendo de esta tecnología una alternativa viable para la remoción de contaminantes en zonas de puertos marítimos.

CONCLUSIONES

La microalga *Chlorella* spp. se adapta a las condiciones de contaminación por hidrocarburos, aumentado su densidad celular y la producción de pigmentos fotosintéticos en los tratamientos bioestimulados y bioaumentados, mientras que la cantidad de bacterias asociadas se comportó de manera inversa. La mayor remoción de contaminantes ocurrió en los tratamientos bioaumentados.

Con el ensayo de tratabilidad se definió el perfil de crecimiento del consorcio microbiano y de los microorganismos nativos del agua, bajo las condiciones de experimentación establecidas, lo cual permite conocer la estructura y dinámica de la comunidad microbiana durante el proceso de biodegradación, así como diseñar estrategias de control para la optimización de las tasas de eliminación de nutrientes y otros contaminantes.

Las concentraciones finales de NO_3^- , NT, PO_4^{3-} y DQO lograron mantenerse por debajo de los límites permisibles de la legislación venezolana para la descarga a cuerpos de agua. Si bien no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los tratamientos bioestimulados y bioaumentados en cuanto a la remoción de TPH, se obtuvo un mejor comportamiento en los bioaumentados. Se recomienda seguir investigando sobre las potencialidades de las técnicas de bioestimulación y bioaumentación con el uso de microorganismos autóctonos, en cuanto a la remoción de contaminantes presentes en aguas naturales.

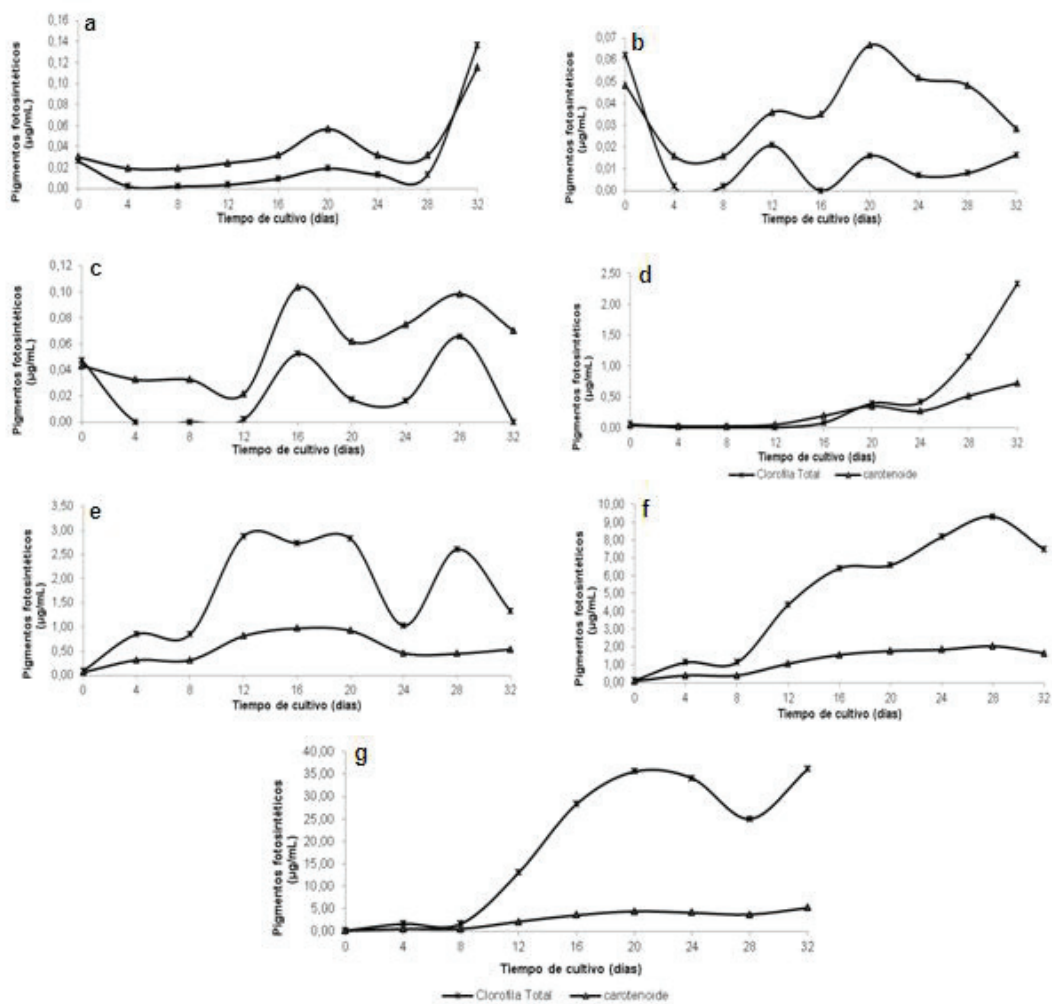


Figura 2. Pigmentos fotosintéticos de microalga *Chlorella* spp. a) Control, b) Tratamiento bioestimulado 1, c) Tratamiento bioestimulado 2, d) Tratamiento bioestimulado 3, e) Tratamiento bioaumentado 4, f) Tratamiento bioaumentado 5, g) Tratamiento bioaumentado 6

Tabla 3. Concentraciones finales (día 32) de contaminantes en las unidades experimentales bioestimuladas y bioaumentadas (media aritmética±desviación estándar, n=3), para el tratamiento del agua superficial del puerto de Isla de Toas en presencia de gasoil 1% v/v

Tratamiento	Parámetro				
	NO ₃ ⁻ (mg/L)	NT (mg/L)	PO ₄ ⁻³ (mg/L)	DQO (mg/L)	TPH (mg/L)
Control	0,02±0,01 ^a	1,45±0,21 ^a	0,06±0,02 ^a	3,65±0,07 ^a	6564,50±416,49 ^a
Tratamiento bioestimulado 1 (0,25 mL/L de fertilizante)	0,02±0,01 ^a	1,45±0,07 ^a	0,04±0,01 ^{a,b}	1,95±0,07 ^b	3652,00±571,34 ^b
Tratamiento bioestimulado 2 (0,5 mL/L de fertilizante)	0,01±0,00 ^a	1,30±0,00 ^{a,b}	0,02±0,01 ^{b,c}	1,85±0,21 ^{b,c}	3952,00±138,59 ^b
Tratamiento bioestimulado 3 (1,0 mL/L de fertilizante)	0,02±0,01 ^a	1,20±0,00 ^{a,b}	0,03±0,01 ^{b,c}	1,70±0,57 ^{b,c}	3535,00±403,05 ^b
Tratamiento bioaumentado 4 (0,25 mL/L de fertilizante)	0,01±0,00 ^a	1,15±0,07 ^b	0,03±0,01 ^{b,c}	2,15±0,21 ^b	3675,00±190,92 ^b
Tratamiento bioaumentado 5 (0,5 mL/L de fertilizante)	0,01±0,00 ^a	1,15±0,07 ^b	0,01±0,00 ^c	1,55±0,07 ^c	3893,50±299,11 ^b
Tratamiento bioaumentado 6 (1,0 mL/L de fertilizante)	0,01±0,00 ^a	1,20±0,00 ^{a,b}	0,02±0,00 ^{b,c}	1,30±0,00 ^c	3752,00±328,10 ^b

Letras diferentes en una misma columna representan diferencia estadística en cuanto a las remociones, según Prueba de Tukey (p<0,05).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue cofinanciado por el Ministerio del Poder Popular para Educación Universitaria, Ciencia y Tecnología, mediante el Observatorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (ONCTI), Proyecto PEII Nro. 2011001259, y por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de La Universidad del Zulia, Proyecto Nro. CC-0592-14

REFERENCIAS

- ANDREOLLI, M., LAMPIS, S., BRIGNOLI, P., VALLINI, G. (2015). Bioaugmentation and Biostimulation as Strategies for the Bioremediation of a Burned Woodland Soil Contaminated by Toxic Hydrocarbons: A Comparative Study. *Journal of Environmental Management* 153; pp. 121-131.
- APHA, AWWA, WEF. (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. New York: American Public Health Association. 21th Edition. 1427 p.
- BACOSA, H. P., SUTO, K., INOUE, C. (2012). Bacterial Community Dynamics During the Preferential Degradation of Aromatic Hydrocarbons by a Microbial Consortium. *International Biodeterioration & Biodegradation* 74; pp. 109-115.
- BARRIOS, Y. (2011). Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. *Biología Aplicada* 28(2); pp. 60-68
- CIESIELSKI, S., KULIKOWSKA, D., KACZOWKA, E., KOWAL, P. (2010). Characterization of Bacterial Structures in Two-Stage Moving-Bed Biofilm Reactor (MBBR) During Nitrification of the Landfill Leachate. *J. Microbiol. Biotechnol* 20; pp. 1140-1151.
- COLIN, V. L., VILLEGAS, L. B., ABATE, C. M. (2012). Indigenous Microorganisms as Potential Bioremediators for Environments Contaminated with Heavy Metals. *International Biodeterioration & Biodegradation* 69; pp. 28-37.
- D'ALESSANDRO, E. B. & ANTONIOSI, N. R. (2016). Concepts and Studies on Lipid and Pigments of Microalgae: A Review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 58; pp. 832-841.
- EWEIS, J., ERGAS, S., CHAG, D., SCHOROEDER, E. (1999). *Principios de biorrecuperación*. 1ra edición en español. Madrid: McGraw-Hill. 1327 p.
- FLATHMAN, P., JERGER, D., EXNER, J. (1995). *Bioremediation Field Experience*. Lewis Publisher. 274 p.
- NORMAS PARA LA CLASIFICACIÓN Y EL CONTROL DE LA CALIDAD DE LOS CUERPOS DE AGUAS Y VERTIDOS DE EFLUENTES LÍQUIDOS (Decreto N° 883). (1995). *Gaceta Oficial de la República de Venezuela*.
- GUOAN, Y., JIANYI, Y., YUANXIANG, W. (1996). The Effects of pH and Temperature on Orthophosphate Removal by Immobilized *Chlorella vulgaris*. *Biotechnol. Lett.* 18; pp. 893-896.
- HERNÁNDEZ, D. (2014). Biodegradación de gasoil por bacterias aisladas de agua contaminada con hidrocarburos en Isla de Toas, estado Zulia. Trabajo especial de grado no publicado, Universidad del Zulia. Venezuela.
- HERRERO, M. & STUCKEY, D. C. (2015). Bioaugmentation and its Application in Wastewater Treatment: A review. *Chemosphere* 140; pp. 119-128.
- JEFFREY, S. & HUMPHREY, G. (1975). Nuevas ecuaciones espectrofotométricas para la determinación de clorofilas a, b, c1, y c2 en las plantas superiores, las algas y el fitoplancton natural. *Biochemistry Physiology* 167; pp. 191-198.
- KADLEC, R. H., KNIGHT, R. L., VYMAZAL, J., BRIX, H., COOPER, P., HABERL, R. (2000). *Constructed Wetlands for Pollution Control*. Scientific and Technical Report No. 8. International Water Association. Londres. 156 p.
- NIEVAS, M. L., COMMENDATORE, M. G., ESTEVES, J. L., BUCALÁ, V. (2005). Effect of pH Modification on Bilge Waste Biodegradation by a Native Microbial Community. *International Biodeterioration & Biodegradation* 56; pp. 151-157
- OLANIRAN, A. O., PILLAY, D., PILLAY, B. (2006). Biostimulation and Bioaugmentation Enhances Aerobic Biodegradation of Dichloroethenes. *Chemosphere* 63; pp. 600-608.

- PERHAR, G. & ARHONDITSIS, G. B. (2014). Aquatic Ecosystem Dynamics Following Petroleum Hydrocarbon Perturbations: A review of the Current State of Knowledge. *Journal of Great Lakes Research* 40(3); pp. 56-72.
- PORTILLA, A. (2010). Evaluación del rendimiento de producción de aceite en cuatro microalgas nativas de las provincias ecuatorianas de Orellana, Esmeraldas, Imbabura y Pichincha en diferentes condiciones de iluminancia y de medio de cultivo a nivel de laboratorio. Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). Ecuador.
- RIAÑO, B., HERNÁNDEZ D., GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C. (2012). Microalgal-based Systems for Wastewater Treatment: Effect of Applied Organic and Nutrient Loading Rate on Biomass Composition. *Ecological Engineering* 49; pp. 112-117.
- ROSALES-LOAIZA, N., AVENDAÑO, D., OTERO, A., MORALES, E. (2008). Crecimiento, producción de pigmentos y proteínas de la microalga *Dunaliella viridis* (Chlorophyta) en cultivos semicontinuos. *Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas* 42(3); pp. 323-334.
- SHUKLA, S. K., MANGWANI, N., RAO, T. S., DAS, S. (2014). Biofilm-mediated Biorremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. Chapter 8. *Microbial Biodegradation and Bioremediation* pp. 203-232.
- STRICKLAND, J. & PARSONS, T. (1972). *A Manual of Sea Water Analysis*: Canada Fisheries Research Board Bulletin 167; pp. 310-345.
- TAM, N. F. Y., WONG, Y. S. (2000). Effect of Immobilized Microalgal Bead Concentrations on Wastewater Nutrient Removal. *Environ. Pollut.* 107(1); pp. 145-151.
- TORTORA, G., FUNKE, C., CASE, L. (2007). *Introducción a la microbiología*. 9^{na} edición. Editorial Médica Panamericana S.A. 959 p.
- XU, N., BAO, M., SUN, P., LI, Y. (2013). Study on Bioadsorption and Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons by a Microbial Consortium. *Bioresource Technology* 149; pp. 22-30.
- ZENG, X., GUO, X., SU, G., DANQUAH, M. K., ZHANG, S., LU, Y., SUN, Y., LIN, L. (2015). Bioprocess Considerations for Microalgal-based Wastewater Treatment and Biomass Production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 42; pp. 1385-1392.