

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

U.N.A.M-CINVESTAV- I.M.p

“PERFILES RADIALES DE CINÉTICAS DE
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS, TRATADOS EN BIOPILAS”

TESIS QUE PRESENTA:

ISRAEL ESPINOSA ESPINOSA

PARA OBTENER EL GRADO DE :

INGENIERO QUÍMICO

ASESORES:

Dra. En ing. De proc. JOSEFINA BARRERA CORTÉS

M. en B. MARCO ALEJANDRO MONTES DE OCA GARCÍA

MÉXICO, D.F.

enero DE 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AL CREADOR Y ESPIRITU SANTO

" Pues estoy seguro que
ni la muerte ni la vida
ni los ángeles ni los
principados ni lo presente
ni lo futuro ni las
potestades ni la altura ni
la
profundidad ni otra
criatura alguna podrá
separarnos del Amor de
Dios manifestado en Cristo
Jesús señor nuestro."

Rm 8, 38-39

DEDICATORIA

A mi padre Sr. Juan Espinosa E.

Quien con todo su amor, responsabilidad, fortaleza y determinación me ha motivado en mi vida y continúa impulsándome para superarme todos los días.

A mi madre Sra. Gloria Espinosa E.

A esa hermosa mujer de espíritu, llena de amor paciencia fortaleza y una interminable fuerza de voluntad, quien solo con su ejemplo y sin más palabras me demostró que nada es inalcanzable si te lo propones.

A mis hermanos Fabi, Fa , Jr. , Vick, Ka .

A todos ellos , ensalada de talentos , hermanos de sangre y vida, saben cuanto los quiero y es necesario resaltar una vez más en esta oportunidad, que agradezco a todos el cariño, experiencia, apoyo, comprensión y momentos compartidos.

A mis sobrinos Giovanna, Sharon, Mildred, Alexis, Amir , Carlitos.

A ellos, mis compromisos, le agradezco su ternura otorgada a manos llenas, su atención y aceptación de mi ser en sus hermosas vidas.

A mi Güera, Raquel Sánchez G.

Por el amor que no escatimas y demuestras siempre, la paciencia e incontables momentos maravillosos, que me hacen saber todos los días puedo contar contigo, por todo lo que me enseñaste sobre las buenas prácticas del buen ser humano, te agradezco Cordero de Dios .

A todos quienes confiaron en mi

A todos ellos quienes depositaron su confianza en mi, que vieron en mi la posibilidad, y me otorgaron esa valiosísima oportunidad, que do de ustedes muy agradecido.

AGRADECIMIENTOS

Ala Dra. Josefina Barrera Cortés por su enorme apoyo, paciencia y asesoría brindada en la realización de este estudio.

Al M en B. Marco Alejandro Montes de Oca García, por su valioso apoyo, asesoría, paciencia y disponibilidad que siempre demostró y brindó.

Al Dr. Benjamín Chávez Gómez por su asesoría, apoyo, y valiosos comentarios en la realización de este estudio

Al Dr. Fernando Esparza García por su valiosísima experiencia compartida y apoyo desinteresado.

Al Dr. Héctor Poggi Varaldo por sus útiles comentarios y apoyo brindado.

A la Dra. Rocío Guadalupe de la Torre Sánchez por su amistad, y apoyo que me brindó durante la realización de este estudio.

Al Dr. Efraín Manilla Pérez por su valiosa amistad y apoyo que me brindó durante la realización de este estudio.

Al M. en C. Marco Luna Guido por su confianza, apoyo, y colaboración que me ha brindado.

A la Q.F.B. Elvira Ríos Leal por su amistad, confianza, y enorme aportación para la realización de este estudio.

A la I.Q.B. Beatriz Altamirano por su paciencia, amistad, experiencia y disponibilidad brindada para la realización de este estudio

A la I.Q Edith Natividad Vázquez por su amistad y gran apoyo brindado al presente estudio

A la M. en C. Sayli Lagunes Escobar por su amistad, dedicación y gran esfuerzo para la realización de este estudio.

A mis compañeros del Área de Biotecnología del IMP Víctor Martínez, Juan Sermeño, Benjamín Chávez todos ellos valiosas personas y a mis compañeros del Laboratorio de Control Inteligente de Procesos que me apoyaron y confiaron en mí en este largo e interesante camino.

Al CINVESTAV por facilitar las instalaciones e infraestructura para llevar a buen termino este trabajo.

Al Instituto Mexicano del Petróleo, por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto Sermanat-2002-C01-0154, por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

<u>RÉSUMEN</u>	1
<u>INTRODUCCIÓN</u>	2
<u>I GENERALIDADES</u>	3
<u>1.1 Tecnologías de biorremediación</u>	4
<u>1.1.1 Biorremediación in situ</u>	7
<u>1.1.1.1 La fitorremediación</u>	7
<u>1.1.1.2 Bioventeo o inyección</u> <u>de aire</u>	7
<u>1.1.1.3 Atenuación Natural</u>	8
<u>1.1.2 Biorremediación ex situ</u>	9
<u>1.1.2.1 Tratamiento en lechos</u>	9
<u>1.1.2.2 Biorreactores</u>	10
<u>1.1.2.3 Biopilas</u>	10
<u>1.1.3 Ventajas y desventajas</u>	11
<u>1.1.4 Condiciones para su aplicación</u>	12
<u>1.1.5 Requerimientos</u>	12
<u>1.1.6 Diseño y aplicación de los</u> <u>sistemas de biotratamiento</u>	12
<u>1.2 Biodegradación del petróleo</u>	13
<u>1.2.1 Naturaleza y propiedades del</u> <u>Suelo</u>	14
<u>1.2.1.1 Clasificación de un suelo</u> <u>según su tamaño de grano</u>	15
<u>1.2.2 Factores que influyen en la</u> <u>biodegradación</u>	16
<u>1.2.2.1 Necesidad de nutrientes</u>	16
<u>1.2.2.2 Aireación</u>	17

1.2.2.3	Humedad	17
1.2.2.4	Temperatura	18
1.2.2.5	PH del suelo	19
1.2.2.6	Factores relativos al sustrato	20
1.2.2.7	Factores microbiológicos	21
1.2.2.7.1	Descomposición de los hidrocarburos	21
1.2.2.7.2	Ciclo de crecimiento microbiológico	22
1.2.2.7.2.1	Fase de latencia	23
1.2.2.7.2.2	Fase exponencial	23
1.2.2.7.2.3	Fase estacionaria	24
1.2.2.8.2.4	Fase de muerte	24
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1	Tratabilidad del suelo	25
2.1.1	Relación suelo/texturizante	25
2.1.2	Relación carbono/nitrógeno	26
2.1.3	Temperatura y pH	27
2.2	Aislamiento de flora microbiana nativa cultivable	28
2.3	Bopila	28
2.3.1	Formulas para la determinación de los perfiles radiales	28
2.3.2	Diseño del biorreactor	30
2.3.3	Proceso de biorremediación por Composteo	30

2.3.3.1 Supervisión y control del Biorreactor	31
2.3.3.2 Monitoreo de temperatura	31
III RESULTADOS	33
3.1 Tratabilidad del suelo	33
3.1.1 Efecto de la relación suelo/texturizante	33
3.1.2 Relación carbono/nitrógeno	33
3.2 Aislamiento de cepas nativas cultivables en caja petri	38
3.2.1 Bacterias	38
3.2.2 Hongos	42
3.2.2.1 Prueba para hidrocarbonoclastas	42
3.3 Resultados biorreactores	46
3.3.1 Perfiles radiales de parámetros del proceso de biodegradación de HTP	47
3.3.1.1 Perfil radial de temperatura	48
3.3.1.2 Perfil radial de concentración h⁺	50
3.3.1.3 Perfil radial de humedad	52
3.3.1.4 Perfil radial de producción de CO₂	54
3.3.1.5 Perfil radial de remoción de hidrocarburos totales de petróleo	56
IV CONCLUSIONES	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
APÉNDICE	65

PARTICIPACIÓN EN EL 13th INTERNATIONAL
BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION SYMPOSIUM
(IBBS-13)

.....97

RESUMEN

El presente trabajo comprende información sobre la investigación realizada en el área de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, contenidos en suelo.

El estudio se realizó sobre el efecto del flujo de alimentación de aire húmedo en dirección radial en una matriz sólida. Se determinaron los perfiles de las variables de operación: pH, humedad, producción de CO₂ y % de remoción de hidrocarburos degradables.

Se utilizó un reactor de 1.5 m² y 0.1m de altura. La matriz sólida esta conformada por suelo contaminado con HTP, un agente texturizante (bagazo de caña), operando bajo las siguientes condiciones: humedad del 52% de la capacidad de campo, relación de C/N/P/ de 100/10/1, alimentación de aire húmedo a 2, 4 y 6 L/min. y a una temperatura ambiente de 25°C.

El suelo contaminado fue colectado al sur de Veracruz. La elección del agente texturizante fue determinada por su disposición y su relación suelo-texturizante se determinó en ensayos de microcosmos. Para bioestimular los microorganismos se probaron con diferentes relaciones de nutrientes y sales minerales encontrando la óptima que favorecía una mayor remoción de HTP. Se adicionó además tergitol como un agente tenso activo para aumentar la disponibilidad de los contaminantes.

De acuerdo con los resultados obtenidos se infiere que el proceso de remoción de hidrocarburos se ve favorecido si se realiza bajo los siguientes parámetros: temperatura de 25±5 °C. Humedad de 52%. Ph 6 a 7 y flujo de aire húmedo de alimentación de 6 L/min. Al determinar los perfiles radiales de degradación se observó la mejor remoción en la región central y media de la biopila con un máximo de remoción del 32.20% de la fracción degradable.

Este estudio ha permitido analizar la relación existente entre las variables de operación y el fenómeno de remoción de HTP en función del tiempo.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas de hoy día es la contaminación de suelos. Esta puede ocurrir por diferentes vías, como son las emisiones, fugas, derrames accidentales, descargas de efluentes y residuos. Estas operaciones involucran, frecuentemente, mezclas complejas de sustancias, dentro de las cuales podemos citar el petróleo crudo, aceite refinado, pesticidas y metales pesados. Para hacer frente a esta problemática, se han desarrollado diferentes tecnologías de entre las cuales destaca la biorremediación.

La biorremediación tanto de efluentes como de suelos contaminados involucran la bioestimulación de la flora microbiana, exógena o endógena al suelo, mediante la adición de nutrientes, sales minerales, agua, aire y acondicionamiento del medio ambiente microbiano, principalmente. Otra acción frecuentemente realizada es la adición de algún texturizante (agroquímicos) con el fin de incrementar la porosidad del suelo y al mismo tiempo acelerar los procesos de degradación gracias a la flora microbiana que éste aporta.

Las líneas de investigación en el área de biorremediación han sido enfocadas a la identificación, aislamiento y caracterización de cepas degradadoras así como a la determinación de las condiciones ambientales que favorecen el proceso de degradación. Es importante mencionar que la mayor parte de la investigación involucra contaminantes específicos-modelo. En este estudio, se propone estudiar el efecto del flujo de aire sobre el proceso de remoción de hidrocarburos en un suelo contaminado real tratado en biopilas cilíndricas, y establecer rangos específicos de operación de los mismos.

Es importante mencionar que el conocimiento de los métodos de bioestimulación, como tal, son útiles para trabajos realizados a escala laboratorio. Para trabajos en campo, es necesario conocer, además, aspectos de transferencia de masa, momento y calor. En los procesos de biorremediación, el calor metabólico de los microorganismos incrementa la temperatura de una biopila. Este fenómeno tiene como consecuencia una reducción de humedad, de oxígeno y por tanto, una caída en los niveles de

eliminación de contaminantes.

La hipótesis de este estudio es demostrar la importancia que tiene la alimentación de aire en una biopila, tal alimentación de aire permitirá la distribución de aire húmedo en una matriz sólida favorecerá la formación de perfiles de temperatura, humedad y pH, como consecuencia se presentará la variación en la remoción de HTP en los que actúa la flora microbiana en los diferentes puntos de la biopila.

Este trabajo tiene por objetivo determinar los perfiles radiales de las cinéticas de remoción de hidrocarburos contenidos en suelo altamente contaminado y tratado en un biorreactor de forma cilíndrica. Como objetivos particulares se pretende 1.- Determinar las condiciones carbono-nitrógeno, suelo-texturizante, temperatura y pH, más adecuada para tratar un suelo altamente contaminado con hidrocarburos. 2.- Observar el desarrollo y características de la flora microbiana que participa en el proceso de remoción de hidrocarburos. 3.- Diseñar, instalar y monitorear (pH, temperatura, producción de CO₂, remoción de HTP y humedad), el sistema de biopila que permita el estudio radial de la remoción de HTP. 4.- Obtención de perfiles radiales de pH, temperatura, producción de CO₂, remoción de HTP y humedad, que permitan el análisis de remoción de HTP en biopila.

I GENERALIDADES.

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos constituidos principalmente de los elementos: hidrógeno, carbono y en menor proporción de nitrógeno, azufre y oxígeno. Dependiendo del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran el petróleo, se tienen diferentes propiedades que los caracterizan y determinan su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o solventes.

Las cadenas lineales de carbono asociadas al hidrógeno, constituyen las parafinas, cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas; al presentarse dobles uniones entre los átomos de carbono se forman las olefinas; las moléculas en las que se forman ciclos de carbono son los naftenos, y cuando estos ciclos presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos. (IMP, 2003)

Según la predominación de los compuestos característicos, se pueden clasificar los petróleos en:

1. Crudos parafínicos, presentan una proporción elevada de hidrocarburos tipo C_nH_{n+2} particularmente parafinas y ceras naturales (Pennsylvania, Libia);
2. Crudos nafténicos, con una cantidad más grande de naftenos, hidrocarburos de la serie anulares o cíclicos (Venezuela);
3. Crudos aromáticos, en los que se encuentran hidrocarburos bencénicos C_nH_m (Borneo);
4. Crudos sulfurados, que contienen sulfuro de hidrógeno y mercaptanos formados por la fijación de azufre sobre un hidrocarburo (Oriente Medio);

Crudos particulares, como los crudos bituminosos, que son los crudos de muy bajo contenido en azufre, y los crudos contaminados por ácidos, metales (vanadio, níquel, arsénico), sales, agua salada, etc.

1.1 Tecnologías de biorremediación.

El término biorremediación tiene que ser usado para describir el proceso de emplear microorganismos para degradar o remover desechos peligrosos, es una técnica de restauración de ambientes contaminados por operaciones industriales, derrames accidentales, descarga de efluentes y residuos orgánicos e inorgánicos. La biorremediación depende de la tolerancia de los microorganismos a la concentración del contaminante y de las características del suelo.

En la biorremediación se presenta la etapa de bioaumentación en la cual se agregan microorganismos al sitio contaminado, estos han sido adaptados o manipulados genéticamente para la degradación de contaminantes. La etapa de bioestimulación, consiste en la adición de los nutrientes necesarios para estimular el crecimiento de los microorganismos nativos del suelo.

El tratamiento de materiales peligrosos puede realizarse en el sitio contaminado (in situ) o fuera del sitio contaminado (ex situ). Un tratamiento in situ se ve afectado por las restricciones locales, regulaciones del estado, densidad poblacional o por otras causas que impidan su aplicación. Cuando esto ocurre, el residuo peligroso y el suelo o agua contaminada son llevados a otra parte para su tratamiento (ex situ). Tanto en el tratamiento in situ como en el ex situ, se debe evitar la actividad humana y animal.

Los métodos más empleados para la limpieza de los suelos contaminados son el lavado del suelo y la excavación, seguidos de la transferencia del agua o del suelo a recipientes para su almacenamiento o bien para su incineración. Estas tecnologías básicamente transportan el contaminante de un sitio a otro y son frecuentemente caras o ineficaces para tratar mezclas complejas de contaminantes, Cookson J.T. (1995).

Los procesos de remediación de suelos contaminados usando residuos industriales, ya han sido estudiados, los resultados de algunas investigaciones que se han hecho con relación al beneficio del uso de residuos industriales

como texturizantes en éstos procesos, muestran que la cantidad óptima a adicionar en un suelo contaminado, es del 6-15% Atchley, S. (1979) con relación al peso del suelo, se ha hecho investigación también, en procesos en los que se emplea la flora microbiana proveniente de los texturizantes para acelerar el proceso de biorremediación, así mismo, se ha demostrado la relación que existe entre la cantidad de carbono disponible para los microorganismos presentes en el suelo y la cantidad de Nitrógeno, Fósforo y sales minerales que ellos requieren para su asimilación (Alexander, M. 1998).

Los trabajos más destacados, se presentan a continuación, los cuales sirvieron de base durante la determinación de la relación suelo-texturizante y cantidad de nutrientes a adicionar para el desarrollo del presente estudio.

Mendoza C. (2000), utilizó como texturizante el bagazo de caña para la remoción de pentaclorofenol (100 ppm), probando relaciones suelo: bagazo de 45:55, 51:49, 65:35 79:21 y 85:15 en un tiempo de 15 días, determinaron que con la menor cantidad de texturizante (15%) igualaba las remociones del nivel mayor (85%) y era superior a los niveles intermedios.

Brown J.L.,(1998) su estudio de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos intemperizados utilizó cuatro agentes texturizantes aserrín, composta con alta concentración de nitrógeno, composta con baja cantidad de nitrógeno y arena.

Para llevar a cabo su estudio, mezclaron los cuatro agentes texturizantes a diferentes relaciones, obteniendo la mejor remoción (62%) con la mezcla de mayor cantidad de nitrógeno 35:50: 15 es decir suelo contaminado: aserrín-composta

Por otro lado Pérez, 2002, utilizaron como texturizante el bagazo de caña para la remoción de Hidrocarburos totales del petróleo (HTP) y bioestimularon tanto la flora nativa del suelo como a los asociados al bagazo de caña, que pudieran degradar a los HTP. La relación suelo: bagazo que utilizó fue 80:20, obteniendo una remoción del 60%. Asimismo aislaron cepas de hongos presentes en el

bagacillo de caña y demostraron que dichas cepas tienen la capacidad de crecer en crudo maya y contribuyen a la degradación de los HTP en un 35% en suelos intemperizados.

Las cepas de hongos aisladas del bagazo de caña con capacidad de crecer en crudo maya son: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus Níger*, *Cladosporium cladosporoides*, *Penicillium frequentans* y *Aspergillus terreus*.

Para efectos de remoción de hidrocarburos, generalmente la cantidad de Nitrógeno y fósforo presentes en el suelo contaminado es deficiente, por lo que es necesario adicionar compuestos químicos (fertilizantes comerciales), para satisfacer los requerimientos de los microorganismos.

La cantidad de nutrientes a adicionar depende de la cantidad de Carbono asimilable presente en el suelo, generalmente se recomienda relaciones de C/N/P de 100/10/2. Alexander, M. 1998, y de 100/10/1 Se han probado relaciones de 40/1/1, 100/9/1 y 124/1/1 para evaluar su efecto en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, siendo la más efectiva (remoción entre el 60 y 90%) la relación de 100/9/1. Brown, K., 1983

1.1.1 Biorremediación in situ

Existen tres tipos de sistemas que se aplican en la biorremediación in situ, en los cuales generalmente se hace circular aire y nutrientes a través de la región contaminada para promover el crecimiento de micro organismos aerobios (requieren oxígeno para su desarrollo) con el fin de degradar los compuestos contaminantes. El primero de ellos es el bioventeo, que provee el oxígeno por medio de bombas de vacío y los nutrientes por medio de inyectores a la zona afectada. Los otros sistemas consisten en tratar las regiones que se encuentran por arriba o por debajo del manto freático. En el primer caso, se distribuye el oxígeno en forma de peróxido de hidrógeno y los

nutrientes por medio de un inyector. En el otro, denominado aspersor de aire, se administra el oxígeno directamente en el manto freático y los nutrientes se distribuyen en el suelo con ayuda de inyectores (Fernández, 1998).

1.1.1.1 La fitorremediación,

En este tratamiento, parte de los residuos son usualmente acumulados en los tejidos de las plantas y/o degradados en sus raíces, para luego ser cosechados y removidos.

El tipo de tratamiento que se aplicaría a un sitio depende de la clase de contaminante presente, de las opciones de tratamiento disponibles y a la disposición final de las plantas removidas. (Madigan,1998).

1.1.1.2 Bioventeo o inyección de aire.

La técnica de bioventeo es un tratamiento de biorrecuperación de tipo "in situ", consistente en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección a presión de oxígeno (aire) en la zona no saturada del suelo a través de pozos de inyección. (Madigan,1998).

La aireación del suelo favorecer la eliminación de los hidrocarburos volátiles debido a la migración de la fase volátil de los contaminantes, y la biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se estimula la actividad bacteriana.

Los factores a tener en cuenta en la aplicación del bioventeo o inyección de aire natural son:

1. Se degradan más fácilmente las moléculas más pequeñas (hasta C₂₀), siendo los compuestos parafinados o de cadena lineal los primeros en ser biodegradables, en seguida son los compuestos aromáticos. En general, son favorables los compuestos de alta volatilidad cuya presión de vapor es mayor de 10 mm de Hg a 20°C.

2. Los suelos deben contener bajos contenidos en arcilla y ser lo más homogéneamente posible, con un valor de permeabilidad al aire adecuado ($\geq 10^{-10}$ cm².)
3. El principal problema es la biodisponibilidad de los contaminantes. Cuanto menor es la solubilidad de los contaminantes menor será la biodisponibilidad.
4. Los aportes de oxígeno deben ser suficientes, así como la existencia de fuentes de carbono, aceptores de electrones y energía suficiente.
5. No debe existir producto libre en flotación sobre el nivel freático.
6. Deben existir unas condiciones óptimas de pH 6-8, de humedad (12-30% en peso) potencial redox mayor de 50 mV, temperatura entre 0 y 40 °C. y los nutrientes del suelo en relación N:P de 10:1.
7. Necesidad de tiempos de adecuación cortos (meses) y costo medio-alto.

1.1.1.3 Atenuación Natural.

La atenuación natural, aunque no esta considerada como una técnica de descontaminación propiamente dicha, está englobada dentro de las técnicas de remediación in situ Su característica principal es la utilización de los procesos físico-químicos de la interacción contaminante-suelo y los procesos de biodegradación que tienen lugar de forma natural en el medio. Estos procesos se conocen como procesos de biotransformación natural. Esta técnica se aplica en aquellos casos donde exista la contaminación tanto en los suelos como en aguas subterráneas producida por hidrocarburos de tipo halogenado o no halogenado (Juana, B. 1999)

1.1.2 Biorremediación ex situ

En la biorremediación ex situ, los métodos que se emplean son los biorreactores, pilas de composteo y las biopilas. Los sistemas de biorreactores son principalmente usados para residuos líquidos. La velocidad de degradación se favorece con el empleo de biorreactores en el campo, porque se pueden

controlar las condiciones de operación del sistema. La desventaja de estos sistemas es su costo, que generalmente es elevado e involucra altas inversiones de capital, gastos de operación y de mantenimiento. Las unidades de tratamiento de suelo consisten en mezclar el suelo, agua con nutrientes, y la posible adición de microorganismos al suelo. Estos tratamientos son económicos, pero requieren grandes áreas de terreno por períodos largos de tiempo. Los procesos pueden ser usados para degradar residuos sólidos, semisólidos y líquidos. Su aplicación depende de la velocidad de carga del residuo y de los métodos disponibles (Juana, B. 1999).

La biorremediación de diferentes contaminantes está basada en el tipo de químico presente, el uso de microorganismos y control de las condiciones ambientales más adecuadas para el microorganismo. Se requiere de un equipo multidisciplinario donde intervengan microbiólogos. Para desarrollar un plan de biorremediación efectivo, costeable y ambientalmente seguro, es necesario tener un conocimiento de la ecología y de la evolución de las poblaciones microbianas degradativas.

1.1.2.1 Tratamiento en lechos.

Antes de iniciar un proceso de tratamiento en lechos, deben realizarse ensayos de laboratorio para determinar las condiciones óptimas para la biodegradación y cómo estas condiciones pueden mantenerse en el campo.

Por ejemplo, se han hecho pruebas de suelos para determinar la capacidad de retención de agua del suelo y la humedad óptima para la actividad microbiana en suelo.

La estructura del suelo se utiliza también para calcular la profundidad de volteo y para decidir si son necesarios aditivos, como materia orgánica o agentes esponjantes, para mejorar la tratabilidad del suelo.

Se hacen pruebas para determinar la relación C:N:P y para determinar si se necesitan aportes de nutrientes. A la vez, se mide el pH para determinar si es necesario ajustarlo para mantener la actividad microbiológica. Esta se mide mediante estudios de biodegradabilidad para calcular si la población

original de microorganismos es capaz de degradar los contaminantes, especialmente si éstos son relativamente persistentes. (Madigan, 1998)

1.1.2.2 Biorreactores.

Se utilizan en sitios donde se requiere un gran control del proceso, una degradación muy completa, o cuando los costos de composteo son muy altos (ver pag. 33). El suelo contaminado se mezcla con agua para formar una suspensión y favorecer el contacto contaminantes-microorganismos. La suspensión se alimenta a un biorreactor donde una cantidad controlada de aire es alimentada. El pre-tratamiento y manejo del suelo puede aumentar el costo (Fernández, S.J.M, 1998.)

1.1.2.3 Biopilas.

Formadas por suelo contaminado y materia orgánica (compost) en condiciones favorables para el desarrollo de los procesos de biodegradación de los contaminantes.

Las pilas de composteo pueden ser aireadas de forma activa, volteando la pila, o bien de forma pasiva, son montículos de suelo que en su interior contienen ductos por los cuales se provee el aire y el agua. En las pilas de composteo se adiciona algún material lignocelulósico como: bagazo, paja, viruta, pastos, etc., con el fin de aumentar la porosidad de la pila y favorecer la transferencia de oxígeno. (Juana, B.1999). El composteo puede ser aerobio o anaerobio (en ausencia de oxígeno), estos últimos se utilizan generalmente para residuos volátiles altamente peligrosos (Fernández, S.J., 1998)

En principio, las biopilas se pueden aplicar a la mayoría de los compuestos orgánicos, siendo más eficaz en los compuestos de carácter más ligero.

Entre los factores que influyen en la aplicación de biopilas destacan:

- Los hidrocarburos deben ser no halogenados y deben encontrarse en el suelo en concentraciones menores a 50000 ppm.
- Dada la necesidad de excavación y posterior depósito del suelo contaminado se requiere una superficie de trabajo relativamente grande cuyas dimensiones dependen del volumen del suelo a tratar.
- Necesidad de una densidad de poblaciones microbianas (10^6 UFC/ gramo de suelo) condiciones de humedad (40- 85 %) de capacidad de campo, temperatura (10 y 45 °C.), textura (baja proporción de arcillas), pH del suelo adecuadas (6 y 8) y baja presencia de metales pesados (≤ 25000 ppm).
- La concentración de nutrientes en el suelo cuyo rango normal de C:N:P sea de 100:10:1.
- El tiempo de actuación puede ser alto (meses a años) y el costo bajo.

1.1.3 Ventajas y desventajas

La principal ventaja del método de biorremediación está asociada a las bacterias y los hongos que tienen una gran habilidad para metabolizar, (transformar) diferentes compuestos químicos. Los residuos o subproductos del proceso biológico (bióxido de carbono y agua) son usualmente integrados geoquímicamente en el ambiente como productos inocuos. El proceso de biorremediación puede eficientarse si se aumenta la producción microbiana presente en el sitio contaminado.

La desventaja es que la transformación por métodos biológicos está sujeta al tiempo que se le dé al proceso y de las condiciones químicas y biológicas- La biorremediación depende de la tolerancia de los microorganismos a la concentración del contaminante y de las características del suelo, por lo que no se recomienda su aplicación en sitios que contengan compuestos radiactivos, metales pesados y cuando las condiciones micro ambientales sean desfavorables.

1.1.4 Condiciones para su aplicación

Para determinar el empleo de la biorremediación en la eliminación de contaminantes se consideran:

- (1) El objetivo de la acción de restauración (remediación) tomando en cuenta el tipo y grado de contaminación.
- (2) La amenaza que representa la contaminación.
- (3) El uso futuro del suelo.
- (4) La disposición de una solución técnica a los objetivos planteados.
- (5) Los factores económicos y sociales involucrados.
- (6) Normatividad ambiental.

1.1.5 Requerimientos

Los requerimientos para la biorremediación son presentados de arriba hacia abajo en la figura 1.1. En primer lugar existen microorganismos que pueden desarrollarse y tener la capacidad de producir enzimas bajo condiciones ambientales extremas, es decir, organismos que toleran disolventes orgánicos, que crecen en condiciones alcalinas o a altas temperaturas. Esto es importante porque muchos de los contaminantes no se encuentran en los ambientes propicios para el desarrollo de los microorganismos.

1.1.6 Diseño y aplicación de los sistemas de biotratamiento.

1. Fase de investigación y caracterización de la contaminación y del emplazamiento.
2. Análisis y elección de las medidas bio-correctivas.
3. Diseño y evaluación del sistema.
4. Control y seguimiento.
5. Análisis e interpretación de resultados.
6. Conclusiones.

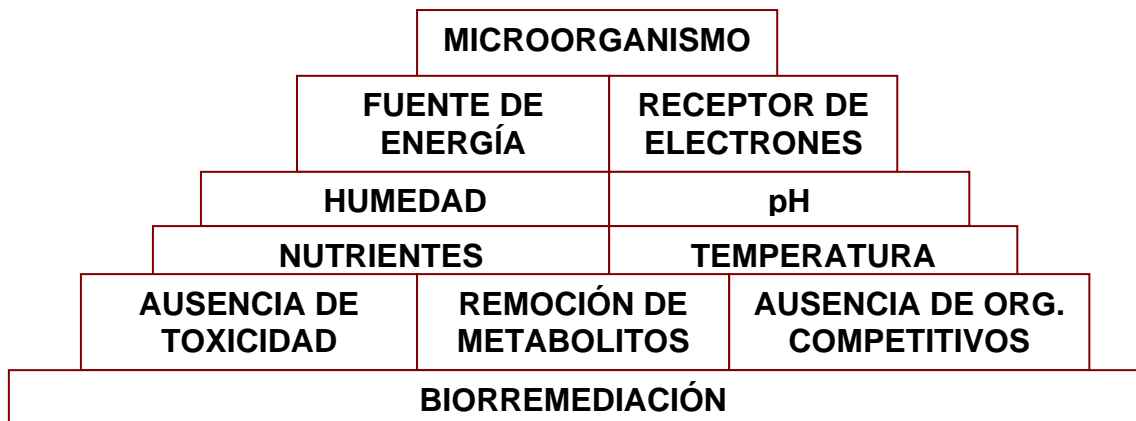


Figura 1.1. Requerimientos para llevar a cabo la biorremediación,

La fuente de energía y los receptores de electrones son incorporados por cada microorganismo a través de las reacciones de oxido-reducción; por ejemplo, la materia orgánica en los residuos se usa como sustrato por los microorganismos, los cuales la estabilizan; todos los compuestos orgánicos son fuentes de carbono y energía, que son donadores de electrones. Por otro lado, el tipo de receptor de electrones establece el metabolismo y por lo tanto las reacciones específicas de degradación. Los receptores de electrones más importantes son oxígeno, nitratos (NO_3^-) sulfatos (SO_4^{2-}) bióxido de carbono (CO_2) y algunos compuestos orgánicos (Fernandez, S. J., 1998).

1.2 Biodegradación del petróleo

Un frente de contaminación está determinado tanto por las características del contaminante como por las características del suelo. Respecto al contaminante, su distribución es función de sus características físicas y químicas, a decir: densidad, solubilidad y polaridad, principalmente.

En lo que respecta al suelo, son factores determinantes: la unidad de suelo, permeabilidad, estructura, tamaño de las partículas, contenido de humedad y materia orgánica, así como la profundidad del manto freático. Factores climatológicos como la temperatura y la precipitación pluvial también tienen una gran influencia.

1.2.1 Naturaleza y propiedades del suelo

El término suelo se refiere al material suelto de la superficie de la tierra. Los suelos proporcionan soportes físicos y nutrientes para el crecimiento de las plantas y los microorganismos.

Las propiedades físicas y químicas de los suelos influyen en gran manera sobre la aireación, la disponibilidad de nutrientes y la retención de agua y, por lo tanto en la actividad biológica. Las propiedades más importantes en las que engloban estos grupos son: el tamaño de partícula, la porosidad, la humedad, estado de aireación composición química, fracción orgánica, fracción de arcilla, capacidad de intercambio de cationes.

El tamaño de partícula afecta a la química de la superficie de los suelos y al tamaño de los poros. La cantidad de poros depende de la textura, estructura y contenido de materia orgánica del suelo. En suelos arcillosos donde el tamaño de partícula es del orden de micrómetros, predominan los tamaños de poro más pequeños, mientras que en los suelos arenosos, los poros de un suelo son mayores, siendo menor la cantidad total de poros. El agua, por lo tanto, los suelos de grano grueso drenan rápidamente.

Se necesita agua para el crecimiento de las plantas y microorganismos y por lo tanto, existe una estructura de poros óptima tal que retiene agua, al tiempo que una fracción importante de poros permanece rellena de aire.

1.2.1.1 Clasificación de un suelo según su tamaño de grano.

El suelo se clasifica según el tamaño de partículas, considerando tres componentes principales: arcilla, limo y arena. En general, la clasificación según tamaños está basada en el análisis granulométrico (figura 1.2). La arcilla pasa por un tamiz de 0.002mm, los limos quedan retenidos en el tamiz de 0.002mm pero pasa a través de 0.05mm y las arenas quedan retenidas en el tamiz de 0.05 aunque pasan a través del de 2mm. Además aquellas partículas que quedan retenidas en el tamiz de 2mm de paso se clasifican como grava o piedra.

Las cantidades de arena y arcilla en un suelo determinado definen al grupo al que pertenece dicho suelo. Se suele emplear un triángulo de texturas a la hora de clasificar un suelo según el tamaño del grano. Los pasos a seguir consisten en entrar al triángulo con el valor correspondiente al contenido de limos (porcentaje) del suelo y trazar una paralela hacia la izquierda del triángulo. Entonces, se entra con el valor correspondiente al contenido de arcilla, y se traza una línea horizontal paralela a la base. El área en la que las dos rectas se cortan será entonces la categoría a la que pertenece el suelo.

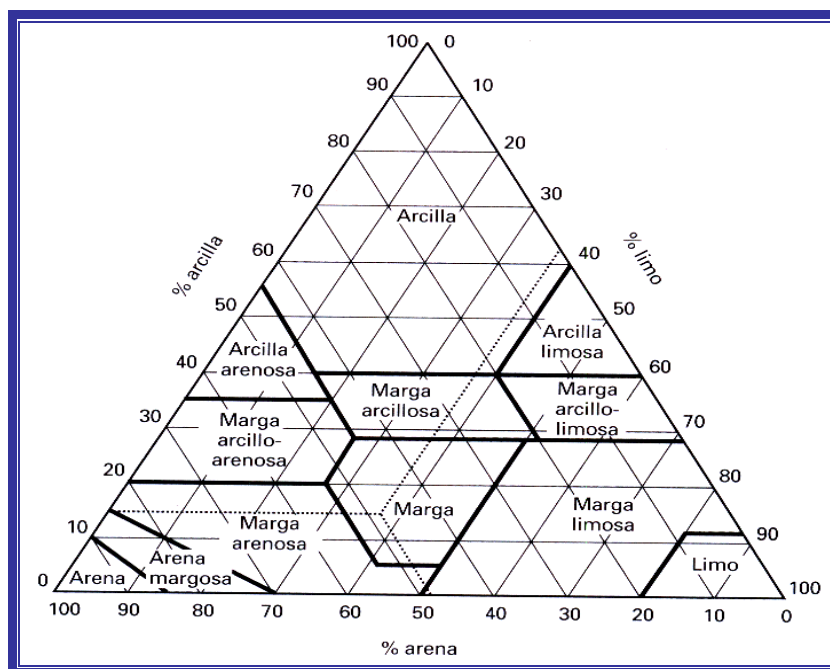


Figura 1.2 Diagrama triangular de clasificación de un suelo

1.2.2 Factores que influyen en la biodegradación.

La composición y la concentración de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes esta influenciada por los factores ambientales, de sustrato y microbiológicos. En los factores ambientales se incluyen humedad, aireación, temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes. Dentro de las propiedades del sustrato que pueden afectar a la biotransformación se incluyen toxicidad, concentración, solubilidad, volatilidad, separación de la fase sólida y estructura química.

Entre los factores microbiológicos se encuentran la presencia de microorganismos con rutas para la degradación de los compuestos de interés, aclimatación de las poblaciones microbianas y factores ecológicos.

1.2.2.1 Necesidad de nutrientes.

El metabolismo microbiano está orientado hacia la reproducción de los organismos, y requieren de constituyentes químicos, que estén disponibles para la asimilación y síntesis de nuevo material celular.

Los nutrientes son regularmente asimilados desde un número limitado de estados elementales y por lo tanto, la cantidad de nutrientes presentes y el estado de los mismos son importantes. Algunas bacterias pueden asimilar al nitrógeno como amoniaco (-3), nitrito (+3) y nitratos (+5). La asimilación de azufre es usualmente sólo desde el sulfato en estado de oxidación (+6). Los metales se asimilan desde el estado iónico en casi todos los casos (Crawford, R.L.,1996). Frecuentemente uno o dos nutrientes presentes en el ambiente limitan el crecimiento microbiano. El concepto limitación de nutrientes es extremadamente utilizado para predecir los impactos de los contaminantes en aguas y en el diseño y operación de los procesos de tratamiento biológico.

1.2.2.2 Aireación.

Los microorganismos varían en sus necesidades, o tolerancia de oxígeno. De hecho, los microorganismos pueden ser divididos en grupos dependiendo del efecto del oxígeno. Los aerobios son capaces de crecer con tensión de oxígeno total, en el aire el oxígeno es el 21% y muchos pueden soportar incluso concentraciones más altas los microaerofilos, por el contrario, son aerobios que pueden utilizar este gas sólo cuando su tensión es más baja que la del aire, usualmente por su limitada capacidad de respirar o porque contienen algunas moléculas o enzimas sensible al oxígeno(Bartha,1986).

Los organismos que carecen de sistemas respiratorios no pueden utilizar al oxígeno como aceptor terminal de electrones, tales organismos se llaman anaerobios, pero existen dos clases de anaerobios: los anaerobios-aerotolerantes, que pueden tolerar el oxígeno y crecer en su presencia aún cuando no pueden utilizarlo y los anaerobios estrictos (u obligados) que mueren en presencia del oxígeno, la razón por la que los anaerobios estrictos son destruidos por el oxígeno es probablemente por que son incapaces de eliminar algún producto tóxico derivado del metabolismo del oxígeno cuando se reduce el oxígeno, se producen algunos elementos tóxicos tales como el peróxido de hidrógeno H_2O_2 , superóxido O_2^- y radicales hidroxilo (OH). Muchos anaerobios estrictos son ricos en enzimas flavínicos que reaccionan espontáneamente con el oxígeno para dar estos productos tóxicos, por el contrario los aerobios poseen enzimas que descomponen los productos tóxicos tales enzimas no están presentes en los anaerobios.(Madigan.,1998)

1.2.2.3 Humedad

La humedad del suelo tiene gran influencia en la actividad microbiana. El agua es el mayor componente del protoplasma bacteriano y su suministro es esencial para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos. El agua también sirve como medio de transporte a través del cual los productos metabolizados salen al exterior de la célula.

El contenido suelo-agua influye en la aireación (transporte de oxígeno), en la solubilidad de los constituyentes del suelo y en el pH. Poca humedad en el suelo da como resultado zonas secas y por lo tanto poca actividad de los microorganismos.

Sin embargo, demasiada humedad inhibe el intercambio de gases y da como resultado zonas anaerobias y como consecuencia la eliminación de zonas aerobias y aumento de anaerobias ó anaerobias facultativas (Rhykerd et al, 1999) La aeración y humedad están directamente relacionadas por el espacio del poro no llenado con agua es llenado con gas.

La atmósfera en el interior del suelo generalmente contiene más CO₂ y menos O₂ que la atmósfera sobre el suelo como consecuencia de la respiración de microorganismos y raíces de las plantas, esto unido a la dificultad de movimiento del gas en el interior de los pequeños poros. Muchas bacterias aerobias trabajan u operan óptimamente a niveles de humedad entre 50 y75 por 100 de la capacidad de retención del suelo (capacidad de campo) (Buckman and Brady,1966). Se define la capacidad de campo como la humedad de un suelo que se ha saturado con agua y dejado drenar libremente durante 24 horas. Los gruesos que drenan fácilmente, generalmente tienen una capacidad de campo superior a los suelos más finos.

Por ejemplo, la capacidad de campo de un suelo arenoso puede ser tan baja como un 5 por 100 (peso seco), (US EPA, 1983). A menos que se hagan pruebas en el laboratorio, el contenido óptimo de humedad para la biodegradación aerobia puede ajustarse en un rango de un 60 por 100 a un 80 por 100 de la capacidad de campo.

1.2.2.4 Temperatura.

La temperatura del suelo afecta grandemente a la actividad microbiana y a la tasas de biodegradación. Generalmente, las especies de bacterias crecen bien en intervalos de temperatura relativamente reducidos. El rango de temperatura para una buena actividad microbiana (mesofílica) esta entre los

10°C. hasta 45°C. (Atlas, 2002) teniendo un intervalo de crecimiento óptimo de entre 25°C. y 35 °C., éste comprende la masa de bacterias del suelo (Simm G, 1990;). Las psicrófilas se desarrollan mejor a temperaturas por debajo de 20 °C.

Las termófilas crecen mejor a temperaturas de entre 45 °C y 65 °C. Dentro de cada división los diferentes grupos de bacterias tienen diferentes intervalos de temperatura óptima a la cual éstas se desarrollan.

Por regla general, de cálculo aproximado es que por cada 10 °C. de incremento en la temperatura, la tasa de biotransformación se incrementa alrededor del doble. (Madigan. 1998).

El incremento paralelo en la tasa de biotransformación con aumento de la temperatura se atribuye al incremento de la actividad microbiana, dando como resultado un aumento en la solubilidad del contaminante y su consecuente disminución por absorción en el suelo.

1.2.2.5 PH del suelo.

El pH del suelo puede afectar significativamente la actividad microbiana. El crecimiento de muchos microorganismos normalmente es máxima dentro de un intervalo de entre 6 y 8 .El rango de pH óptimo para la degradación de hidrocarburos en el suelo tiene que estar por lo regular entre valores de 6.5 a 8. (Morgan and Watkinson, 1989) por otra parte Dibble and Bartha (1979), concluyen que valores de pH de entre 7.7 a 7.8 fueron los óptimos en la degradación de hidrocarburos y sugieren que valores más bajos a estos, pueden resultar en una inhibición parcial de la degradación.

Y se ha observado anteriormente que en algunos hongos tienen regiones de crecimiento óptimo a niveles de pH menores de 5.

Condiciones altamente ácidas o alcalinas generalmente inhiben la actividad microbiológica y muchas bacterias se benefician de las condiciones neutras. El pH del suelo también afecta la solubilidad del fósforo, un nutriente importante para los microorganismos y el transporte de metales peligrosos en

el suelo. La solubilidad del fósforo se maximiza a niveles de pH de 6.5 y el transporte de metales se minimiza a valores de pH superiores a 6 (Steven and Clark.,1979).

En la naturaleza muchos suelos son ácidos. Al incrementar el pH, los compuestos de calcio o los que contienen calcio/magnesio, pueden ser adicionados al suelo, (óxido de calcio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio, carbonato de magnesio y escorias de silicato de calcio.).

Cuando hay una concentración alta de carbonatos o existe la presencia de residuos peligrosos, el pH del suelo resulta alto, debido a que estos compuestos son altos en pH, en estos casos se puede necesitar la acidificación ó la reducción del pH del suelo se puede realizar adicionando azufre elemental o compuestos que contengan azufre tales como el ácido sulfúrico, polisulfuro de amonio líquido y sulfatos de aluminio y hierro, (Dupont et al,1988).

1.2.2.6 Factores relativos al sustrato.

La estructura y el esqueleto de los compuestos orgánicos tienen un mayor impacto sobre la viabilidad para microorganismos y su biodegradabilidad. Algunos de los más difíciles de degradar (recalcitrantes) son los compuestos químicos que se encuentran en el suelo y agua subterráneos incluyendo polímeros sintéticos, compuestos clorados y aromáticos y plaguicidas, tales como DDT y clordano. Los compuestos que son demasiado largos para penetrar la célula microbiana y que no pueden ser modificados por enzimas extra celulares, tales como cloruro de polivinilo y polietileno no pueden ser degradados.

Los compuestos que tienen muy baja solubilidad en agua no pueden ser transportados al interior de la célula, de aquí que no sean fácilmente biodegradables.(Madigan.,1998)

Las moléculas con ciertas propiedades estructurales pueden tener un impedimento esteárico para un ataque enzimático. Los factores estructurales,

que inhiben la degradación de los compuestos incluyen la presencia de grupos amino, metoxi sulfatos y nitro, de pesos moleculares muy altos o cadenas de longitud larga; bencenos sustituidos en la posición meta; enlaces éter y cadenas ramificadas de carbonos.

1.2.2.7 Factores microbiológicos.

El petróleo es una rica fuente de materia orgánica, y fácilmente es degradable por diferentes microorganismos en condiciones aeróbicas. Entre la gran variedad de microorganismos, se encuentran las pseudomonas varias corinobacterias y micro bacterias e incluso algunas levaduras.

En determinadas circunstancias, como el almacenado en grandes tanques, el crecimiento microbiano no es deseable. Sin embargo, en otras situaciones, cómo cuando se produce algún vertido de petróleo, su utilización es de gran importancia para la biorremediación.

1.2.2.7.1 Descomposición de los hidrocarburos.

Las bacterias y hongos oxidadores de hidrocarburos son los principales agentes de la descomposición del petróleo y de sus derivados. Se ha demostrado que una gran variedad de bacterias (incluyendo cianobacterias), mohos y levaduras, así como determinadas algas verdes pueden oxidar dichas sustancias. Sin embargo, en ecosistemas acuáticos, las bacterias y las levaduras son los degradadores predominantes de hidrocarburos (Singer, M.E., 1984.). Es muy frecuente la contaminación a pequeña escala por petróleo en ecosistemas acuáticos y terrestres debido a actividades humanas y a otras naturales.

Por tanto, no es de extrañar que existan diversas comunidades microbianas capaces de utilizar hidrocarburos como donadores de electrones.

El metano el hidrocarburo más sencillo es degradado por un grupo especializado de bacterias, las bacterias metanotróficas, pero estos microorganismos no oxidan hidrocarburos de mayor número de átomos de carbono (Madigan., 1998).

Los microorganismos oxidadores de hidrocarburos se desarrollan rápidamente sobre la superficie del petróleo. No obstante, como los hidrocarburos alifáticos no son fermentables, y para que se produzca una oxidación significativa de los hidrocarburos es necesaria la presencia de O₂.

Si el petróleo va a parar a sedimentos anóxicos, su descomposición será muy lenta y puede permanecer en el mismo lugar durante muchos años. Incluso en ambientes tóxicos.

Los microorganismos oxidadores pueden actuar solo si hay otras condiciones ambientales como: temperatura, pH y concentración de nutrientes inorgánicos. (Coochson ,1995)

En la eliminación de derrames de petróleo los microorganismos actúan oxidándolo a CO₂, cuando se producen grandes vertidos las fracciones de hidrocarburos volátiles se evaporan rápidamente quedando los componentes aromáticos y alifáticos de cadena larga para que sean eliminados por los organismos. En los derrames en los que se han llevado a cabo estudios se ha visto que las bacterias oxidadoras de hidrocarburos han aumentado su número de 10³ a 10⁶ veces en poco tiempo después de producirse el derrame (Kastner ,1996).

1.2.2.7.2 Ciclo de crecimiento microbiológico.

La palabra crecimiento se define como un incremento en el número de células. El crecimiento es un componente esencial de la función microbiana (ver fig. 1.3, pag. 24) ya que una célula individual tiene un periodo de vida determinado en la naturaleza y la especie se mantiene solamente como resultado del crecimiento continuo de la población celular. La velocidad de

crecimiento es el cambio en el número de células o masa celular por unidad de tiempo.

Durante el ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. El tiempo requerido para que a partir de una célula se formen dos células se denomina tiempo de generación. El tiempo de generación varía ampliamente entre los microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1-3 horas, pero las conocidas como de crecimiento muy rápido, pueden hacerlo en tan solo 10 minutos, mientras que otras pueden tardar incluso días. (Ronald, M.A., 1981)

La curva de desarrollo microbiano puede dividirse en varias fases:

- De latencia
- Exponencial
- Estacionaria
- De muerte.

1.2.2.7.2.1 Fase de latencia

Cuando una población bacteriana se inocula en medio fresco, no ocurre crecimiento inmediatamente, sino después de cierto tiempo que se llama fase de latencia, que puede ser más larga ó más corta dependiendo de algunos factores (adaptación al medio, temperatura, tiempo de incubación, naturaleza del microorganismo, etc.) Si un cultivo en crecimiento exponencial se inocula exactamente en el mismo medio, no se observa la fase de latencia sino que sigue creciendo exponencialmente.

Se requiere una fase de adaptación cuando las células han sido dañadas mediante tratamientos por calor, radiaciones, o ambientes tóxicos, etc., también se requiere una fase de adaptación cuando se transfieren células de un medio rico a uno más pobre. Para adaptarse a este nuevo medio, es

preciso que se sinteticen enzimas que permitan metabolizar los compuestos presentes en el nuevo medio.

1.2.2.7.2.2. Fase exponencial.

Es la duplicación de la población microbiológica a cada período de tiempo. Una de las características del crecimiento exponencial es que la velocidad de incremento en el número de células es lenta inicialmente, para después incrementarse constantemente hasta lograr un máximo en el número de células

La mayoría de los microorganismos unicelulares crecen exponencialmente, pero las velocidades de crecimiento exponencial pueden variar esencialmente. Tal velocidad es influenciada por las condiciones ambientales: temperatura, composición del medio de cultivo, así como por las características genéticas del microorganismo en cuestión.

1.2.2.7.2.3 Fase estacionaria.

En un cultivo donde no se renueva el medio, el crecimiento exponencial no puede ocurrir indefinidamente. Cuando no es posible mantener un ritmo de crecimiento, lo que habitualmente sucede es que, o bien un nutriente esencial del medio se acaba, o algún producto de desecho se acumula en el medio hasta alcanzar concentraciones inhibitorias del crecimiento exponencial. La población entonces alcanza la fase estacionaria.

En la fase estacionaria no hay incremento neto del número de células. Sin embargo, aunque en esta fase no tiene lugar crecimiento alguno, todavía ocurren muchas funciones celulares, incluyendo el metabolismo energético y algunos procesos biosintéticos. Estando en fase estacionaria algunas células crecen y otras mueren, siendo el balance total de ausencia de incremento en el número de células a este fenómeno se conoce como crecimiento críptico.

1.2.2.7.2.4 Fase de muerte

Continuando con la incubación después que la población alcance la fase estacionaria lo último ocurre cuando se dice que las células entran en fase de muerte ó lisis celular.

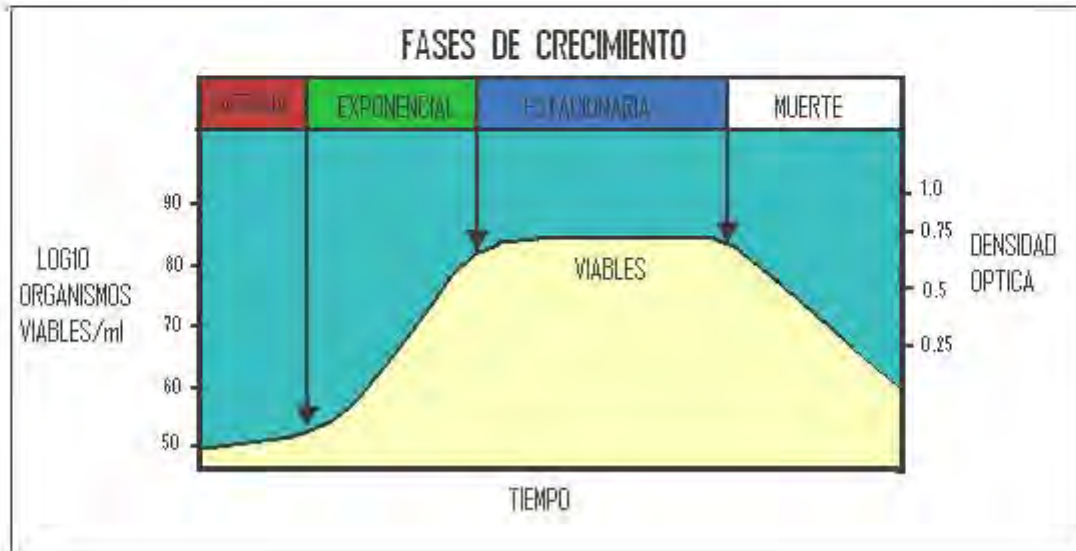


Figura 1.3 Curva de crecimiento típica para una población bacteriana

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tratabilidad del suelo

2.1.1 Relación suelo/texturizante

Se prepararon mezclas suelo-bagacillo, en el rango 0-100% v/v (0, 10, 15,20, 30 y 100% de bagacillo) manteniendo constante la relación C/N/P en cada uno de ellos (tabla 5.1) mediante la adición de nutrientes.

Se utilizó una relación C/N/P igual a 100/10/1, de acuerdo a la cantidad mínima recomendada en literatura para remediar suelos contaminados con hidrocarburos (Cunningham, J.C., Philp.,J.C.,2000). Las mezclas se prepararon modificando la masa del suelo y bagacillo, con relación a un volumen de suelo constante igual a 40 ml. Los volúmenes de suelo y bagacillo se determinaron en base a los valores de densidad aparente de éstos, ver Tabla 2.1. Las mezclas suelo-bagacillo-nutrientes y 55% de la CRA (Bartha, 1979) fueron tratadas en viales de 120 mL, los cuales fueron sellados con septas, casquillos metálicos y puestos a incubar durante 18 días, tanto a temperatura ambiente como controlada, 30°C. El efecto de la relación suelo/texturizante se analizó con relación a la producción de CO₂ (medición indirecta de crecimiento microbiano) y cuantificación de HTP residuales. Dado que se utilizó bagacillo no esterilizado, se corrió un blanco (vial conteniendo solo bagacillo), a fin de descartar el CO₂ producido por la flora microbiana del bagacillo.

Tabla 2.1. Diseño experimental para estudiar la relación suelo/texturizante.

% de Texturizante	Suelo (g)	bagacillo de caña (g)	solución nutritiva (ml)
0	17.220	0	7.7
10	14.98	0.270	8.5
15	14.637	0.405	8.8
20	13.776	0.540	9.2
30	12.054	0.810	9.9
100	0	2.700	14.85

La producción de CO₂ se determinó por cromatografía de gases en muestras de 1 ml, extraídas periódicamente de los viales. El análisis cromatográfico se realizó bajo las condiciones de operación presentadas en la Tabla 2.2. Después de cada muestreo de gas, los viales son aireados durante 6 minutos, con un flujo de 20mL/min, con el fin de desplazar el CO₂ acumulado. El tiempo de aireación fue calculado a partir del flujo de aire alimentado y el volumen del vial. Al término de este tiempo de tratamiento se tomaron muestras de suelo para determinar hidrocarburos residuales.

Considerando el alto porcentaje de HTP contenidos en el suelo a tratar, la cuantificación de éstos se realizó por gravimetría. Para propósitos de cuantificación, el suelo es previamente secado a temperatura ambiente, molido y depositado (1 g) en empaques de papel filtro, para su tratamiento de extracción en sistema soxhlet (U.S., E.P.A., 8015M). La recuperación de hidrocarburos se realiza en matraces bola de peso conocido, utilizando diclorometano como solvente.

Tabla 2.2. Condiciones de operación del cromatógrafo (Equipo Gowmac) para la identificación de CO₂

Gas acarreador	He
Flujo	20 ml/min
Temperatura del detector	150°C
Temperatura del inyector	120 °C
Temperatura de la columna	35 °C
Atenuación	4
Volumen de inyección	1ml
Columna	Empacada: Porapack , XE-LB

2.1.2 Relación carbono/nitrógeno.

La relación carbono/nitrógeno (C/N) se modificó en el rango 100/5-100/20. Este estudio se realizó a nivel microcosmos, en viales de 120 ml. En

cada vial se depositaron mezclas suelo/texturizante de 40 g, con un 10% en volumen de texturizante.

La relación carbono/nitrógeno se calculó en base a los HTP contenidos inicialmente en el suelo. La cantidad de suelo y nitrógeno, adicionada en forma de sulfato de amonio, se muestra en la Tabla 2.3. El estudio del efecto de la relación C/N, se determinó analizando la producción de CO₂ así como HTP residuales.

Tabla 2.3. Diseño experimental del efecto de la relación carbono/nitrógeno. (suelo 19.516 g; texturizante 0.54 g; (KH₂PO₄) 0.0710 g)

% de Nitrógeno	Sulfato de Amonio (g)
5	0.9210
10	2.3025
15	3.6840
20	5.0655

2.1.3 Temperatura y pH.

Este estudio se realizó a nivel microcosmos en muestras de 40 g de suelo, depositadas en viales de 120 ml e incubados durante 18 días, a 30°C. Considerando que el pH del suelo a tratar es de bajo (3.5) y que los microorganismos degradadores de HTP se desarrollan mejor en rangos de pH y temperatura de 6 a 8 y 30-35°C., respectivamente (Cunningham, J.C, 2000), el estudio se realizó en muestras de suelo con pH ajustado a 7.0 con carbonato de calcio y sin ajustar a 7, así como con y sin control de temperatura.

El efecto de la temperatura y pH, en el proceso de degradación de HTP, se determinó al analizar las cinéticas de producción de CO₂ así como los HTP residuales al término del tratamiento. El análisis de producción de CO₂ se

realizó periódicamente (cada 3 días), durante 18 días, por cromatografía de gases (ver Tabla 2.2).

2.2 Aislamiento de flora microbiana nativa cultivable

El aislamiento de cepas se realizó a partir de muestras de suelo extraídas periódicamente (15, 21, 30, 45 y 51 días) de la biopila, funcionando bajo condiciones normales de operación (600 ml/min de aire, pH de 7, 20°C. y 55% de CRA). El aislamiento se realizó en cajas petri, adicionando 100 microlitros de una dilución seriada de suelo, en el intervalo 10^{-1} a 10^{-6} . El cultivo en caja petri se realizó durante 72 horas, a 30°C. El aislamiento estuvo orientado a identificar bacterias y hongos por lo cual se utilizó agar nutritivo y agar Sabureau, como medios de cultivo. Las colonias de cepas cultivadas fueron resemebradas para verificar su pureza y capacidad para degradar hidrocarburos.

Con la intención de tener una idea general del tipo de microorganismos presentes en el suelo, en el caso de las bacterias se realizó tinción de gram para determinar morfología celular, (Ramírez, R., 2001.), y en el caso de los hongos, microcultivos mas tinciones con azul de algodón (Bradshaw, L.J., 1976). Es importante mencionar que los hongos no pudieron ser cultivados por dilución seriada del suelo; éstos fueron obtenidos directamente del biorreactor, al desmontar la biopila (día 51), y sembrados directamente en las cajas petri conteniendo agar sabureau.

La capacidad de degradación de las cepas de hongos y bacterias aisladas se realizó a nivel microcosmos, en viales de 120 ml. En cada vial se depositaron 30 ml de un medio de cultivo de tipo mineral (medio Rennie modificado por Ferrera C.R. (2002) y 6000 ppm de extracto de hidrocarburo como fuente de

carbono. El criterio para determinar la capacidad de degradación de hidrocarburos fue el crecimiento microbiano, cuantificado como producción de CO₂ y turbidez del medio de cultivo (Ferrera C.R., 2002).

2.3 Biopila

2.3.1 Formulas para determinar los perfiles radiales de las cinéticas del proceso de biodegradación de TPH, en sistemas de composteo.

Se aplicó un diseño experimental del tipo factorial para evaluar la contribución del flujo de aire en el proceso de remoción de HTP contenidos en un suelo intemperizado contaminado. Se estudió tres niveles de flujo de aire 2, 4 y 6 l/min. Se considera el paso del flujo a través de la biopila a distancias de 0.5, 1 y 1.5 m.

El valor experimental introducido para la variable Producción de CO₂ es el resultado del la cuantificación experimental mediante el uso del cromatógrafo de gases, un ensayo en microcosmos y la ecuación:

$$PV = nRT$$

Considerándolo como un gas ideal.

El valor de pH se proporcionó directo del medidor de H+.

El valor de la humedad experimental se determino mediante la ecuación:

$$H = \frac{(\text{Hum.I} - \text{HumF})}{\text{Hum.I}} * 100$$

Donde H es la humedad del suelo en %; Hum.I , representa la humedad inicial (g) desplazada a partir de 1 g de suelo. HumF , es la humedad final (g)

desplazada a partir de 1 g de suelo tratado. La temperatura registrada es obtenida por sensores de temperatura acoplados al sistema de biopila (°C.).

El % de remoción se calculó mediante la ecuación:

$$F = \frac{(HTP I - HTP F)}{HTPI} * 100$$

Donde F es la eficiencia de remoción de hidrocarburos en %; HTPI, es el contenido inicial de hidrocarburos totales de petróleo en el suelo, base seca (mg/Kg.); HTP F, es el contenido final de hidrocarburos totales de petróleo al final del tratamiento, base seca (mg/Kg.). Considerando que los asfáltenos son hidrocarburos difíciles de degradar, la F reportada está referida a la fracción de HTP degradables.

2.3.2 Diseño del biorreactor

Se diseñó un biorreactor de forma cuadrangular de dimensiones 1.5mx1.5m y 10 cm de altura. Para propósitos de monitoreo de temperatura, pH, humedad, producción de CO₂ y TPH residuales, en la tapa superior del reactor fueron trazados 3 círculos concéntricos a lo largo de los cuales se realizaron ocho perforaciones de 1cm de diámetro, equidistantes todas, una de la otra (Figura 2.2, pag.32). Al centro de la tapa superior del biorreactor se practicó un orificio para introducir una espreea que permitiera la alimentación de aire humidificado; la humidificación del aire se realizó haciendo pasar el aire a través de un lecho de agua mantenida a temperatura ambiente. La espreea se colocó a una altura de 5 cm desde el fondo del biorreactor. El biorreactor se ubicó en una cámara de 1.5mx1.5m de base y altura promedio de 2.5m, construida con láminas de asbesto. La cámara se mantuvo a temperatura constante (25°C) como se observa en la figura 2.1, mediante una calefacción de 500 KW.



Figura 2.1. Sistema de biorremediación de hidrocarburos por composteo.

2.3.3 Proceso de biorremediación por composteo

Suelo previamente secado y molido hasta un tamaño de tamiz de 4 hilos por pulgada cuadrada (≈ 4 mm de apertura de malla) fue mezclado con bagacillo de caña en una proporción 85:15 % en volumen. A esta mezcla se le adicionó un medio de cultivo a base de sales minerales (KH_2PO_4 , 1.7 g/l; MgSO_4 , 1 g/l; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g/l; FeCl_3 , 0.0025 g/l) y fuentes de carbono (extracto de levadura) y nitrógeno (sulfato de amonio). La fuente de nitrógeno (N_2) se adicionó en una relación C:N=100:15, con relación al contenido de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) del suelo (Jorgensen, K., 2000 y Kastner, M., 1996). Las sales minerales fueron disueltas en 71.75 litros de agua.

Este volumen satisface los requerimientos del CRA del suelo y bagacillo de caña, que son del 55% y 5.5% respectivamente (Alexander, 1999). La mezcla se preparó inicialmente en lotes de 15 Kg, hasta completar un total de 100 Kg de peso total. Para aumentar la disponibilidad de los hidrocarburos, se adicionó Tergitol[®] como surfactante en un 0.5%.

2.3.3.1 Supervisión y control del biorreactor

La mezcla de suelo, preparada como se describió en la sección anterior, fue puesta en el biorreactor para su tratamiento a temperatura de 20°C, pH de 7 y humedad inicial de 55%. El pH de 7, se fijó mediante la adición de carbonato de calcio en un porcentaje aproximado del 1% en peso. Al biorreactor se le alimentó un flujo de aire húmedo, en el rango 2-6 l/min; se realizaron tres corridas por duplicado alimentando flujos de aire de 2, 4 y 6 l/min. Durante el tratamiento, que duró 54 días, se monitoreó periódicamente: temperatura, pH, Humedad y HTP residuales. El monitoreo de temperatura se realizó en línea y en forma continua (cada media hora), mediante un sistema diseñado en el laboratorio para tal propósito (Mobilo[®]).

El pH (potenciómetro), Humedad por gravimetría (Gandoy W. 1991) y HTP (extracción en sistema de Soxhlet; U.S. E.P.A. 8015M) residuales fueron determinados en muestras de suelo extraídas periódicamente del biorreactor.

2.3.3.2 Monitero de temperatura

Se utilizó un sistema de monitoreo automático diseñado en el laboratorio, llamado MONICON. Este sistema está conformado por 10 sensores construidos con transistores LM35, que permiten registrar la temperatura en °C, y precisión de $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$.

La velocidad de registro de temperatura y el número de lecturas a registrar, está determinada por la capacidad y características del CPU disponible.

En el presente estudio, la temperatura se registró en 9 puntos como se muestra en la figura 2.2. Los datos reportados como perfiles de temperatura, son un promedio de tres lecturas registradas en línea, directamente del reactor.



Figura 2.2. Esquema de alimentación de aire, puntos de muestreo y medición de temperatura.

III RESULTADOS

3.1 Tratabilidad del suelo

3.1.1 Efecto de la relación suelo/texturizante,

En la Tabla 3.1 se presentan los datos experimentales de CO₂ obtenidos por cromatografía de gases y en la Figura 3.1, las cinéticas correspondientes a cada porcentaje de bagacillo en función del tiempo.

Tabla 3.1. Producción de CO₂ a nivel microcosmos para distintas relaciones suelo/texturizante.

Tiempo (días)	Producción de CO ₂ (mg de CO ₂ /gr de suelo).				
	0%	10%	15%	20%	30%
2	0,0037	0,0085	0,0047	0,0104	0,0081
5	0,0099	0,0129	0,0132	0,0187	0,0212
7	0,0122	0,0114	0,0147	0,018	0,0152
9	0,0038	0,0073	0,0042	0,0044	0,0081
11	0,0023	0,0029	0,0021	0,0034	0,0013
14	0,0082	0,0089	0,0107	0,0117	0,012
16	0,0082	0,0124	0,0123	0,0157	0,0140
18	0,0123	0,0111	0,0110	0,0090	0,020

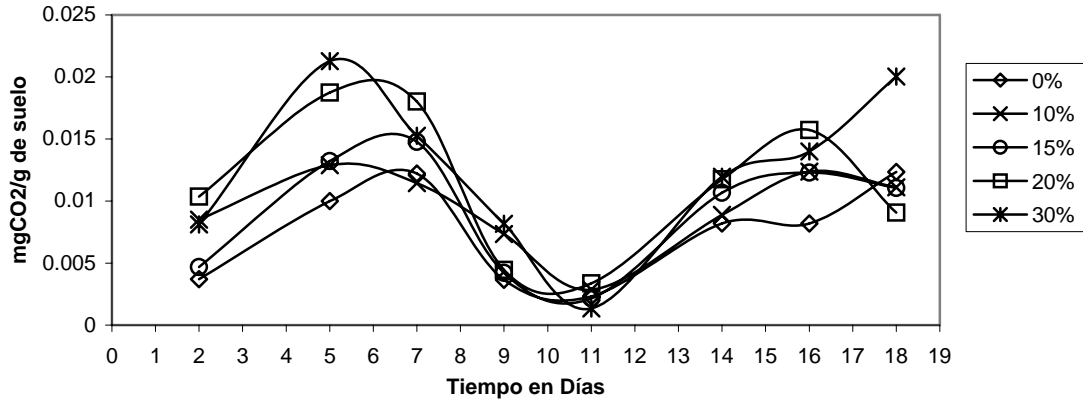


Figura 3.1. Cinéticas de producción de CO₂ a nivel microcosmos para diferentes relaciones suelo/texturizante.

De acuerdo a la concentración de CO₂ reportada en la Tabla 3.1, la producción de CO₂ aumenta con la concentración de texturizante, obteniéndose la mayor producción en los viales con el 30% de texturizante. De acuerdo con las cinéticas mostradas en la Figura 3.1, el mayor incremento de CO₂ entre sistemas se observa al aumentar el contenido de texturizante de 15 a 20%.

Este aumento podría indicar que el crecimiento microbiano está determinado por la concentración de nutrientes disponibles, ya que al aumentar aún más el contenido de texturizante sin esterilizar, la producción de CO₂ aumenta, pero no en la misma magnitud. En vista de estos resultados observados se sugirió continuar el tratamiento de suelo a nivel piloto, adicionando 15% de texturizante.

Tabla 3.2. Concentración de hidrocarburos residuales en el estudio del efecto de la relación suelo/bagacillo de caña. Concentración inicial de hidrocarburos: 449445 ±16117 ppm.

% de texturizante	% HTP removidos	Diferencia con respecto a la mayor remoción
0	0	100
10	7.6	6.8
15	8.1	0
20	2.1	74.3

Comparando el nivel de degradación en cada uno de los viales con la producción de CO₂, se observa que la actividad microbiana no es congruente en todos los casos con el nivel de remoción de hidrocarburos. De acuerdo con los valores de remoción presentados en la Tabla 3.2, se podría decir que el mayor nivel de remoción se obtuvo en el sistema con el 15% de texturizante. No obstante, al mostrar la concentración residual de hidrocarburos en forma gráfica, junto con la desviación estándar correspondiente a cada determinación, ver Figura 3.2, se observan resultados bajos a 15 y 30%; considerando la desviación estándar de los niveles de degradación reportados, se observa que a pesar de que el 30% no produjo la mayor remoción, es una de los resultados con menos error, si se compara con el 10% que reporta un valor mas cercano al máximo nivel de remoción alcanzado; por lo que los resultados del sistema con 30% de texturizante, siguen siendo interesantes para éste estudio.

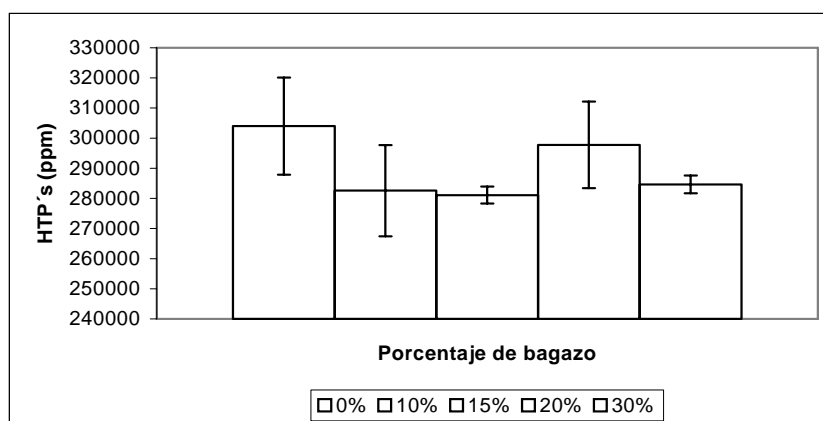


Figura 3.2. Efecto del contenido de texturizante en el proceso de remoción de HTP tratados en fermentación sólida.

Con relación al bajo nivel de remoción alcanzado, se sugiere que las condiciones de tratamiento no fueron las más adecuadas. Se han considerado varios factores entre los cuales podrían destacarse los siguientes: tiempo de tratamiento insuficiente, no disponibilidad de nutrientes, baja concentración de nutrientes y flora microbiana insuficiente. Se considera que la producción de CO₂ pudo ser producida por el consumo de los nutrientes fácil de asimilar como

es la levadura adicionada junto con el medio de cultivo o los azúcares residuales contenidos en el bagacillo de caña.

Posiblemente si el tratamiento se hubiera dejado más tiempo, los microorganismos hubieran podido disponer de la fracción de hidrocarburos menos compleja.

3.1.2 Relación carbono/nitrógeno.

La figura 3.3 muestra la cinética de producción de CO₂ (mg de CO₂ /gr de suelo), registrados durante 10 días.

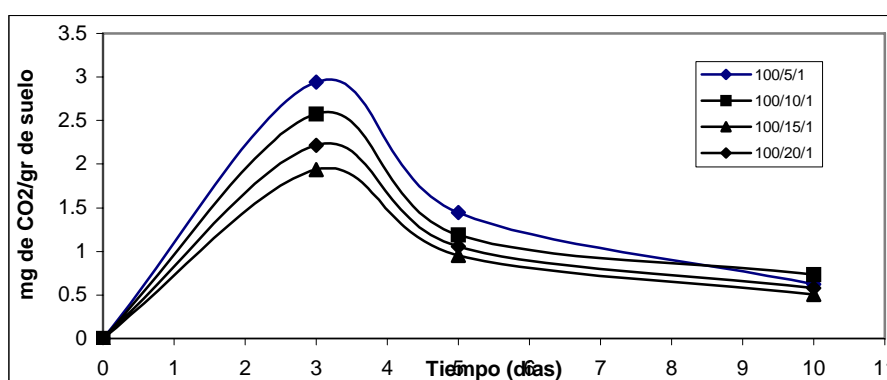


Figura 3.3. Cinética de producción de CO₂ en sistemas con distinta relación C/N.

Después de 10 días se determinó la cantidad de hidrocarburos residuales. (ver figura 3.4) Los resultados muestran una remoción entre 7 y 17%, que supera en más del 90% a la remoción que se obtuvo en los sistemas que se mantuvieron a temperatura ambiente, en condiciones ácidas y con bajas concentraciones de nutrientes.

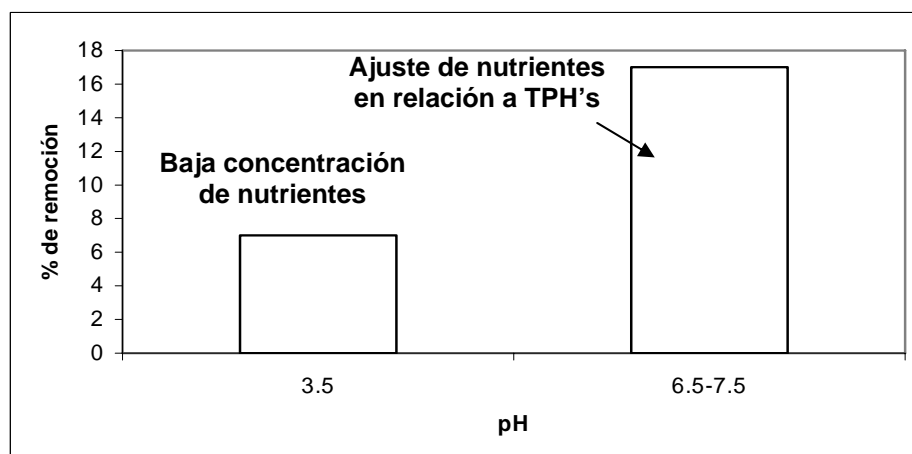


Figura 3.4. Porcentaje de remoción de hidrocarburos en sistemas con pH 3.5 y pH 7.

Los porcentajes de remoción de hidrocarburos alcanzados en los sistemas con distinto contenido de Nitrógeno se muestran en la figura 3.5. En esta figura se observa que la mayor remoción de HTP, se obtiene en el sistema de relación C/N igual a 100/15 y que corresponde al 44.8% de la fracción de HTP degradables.

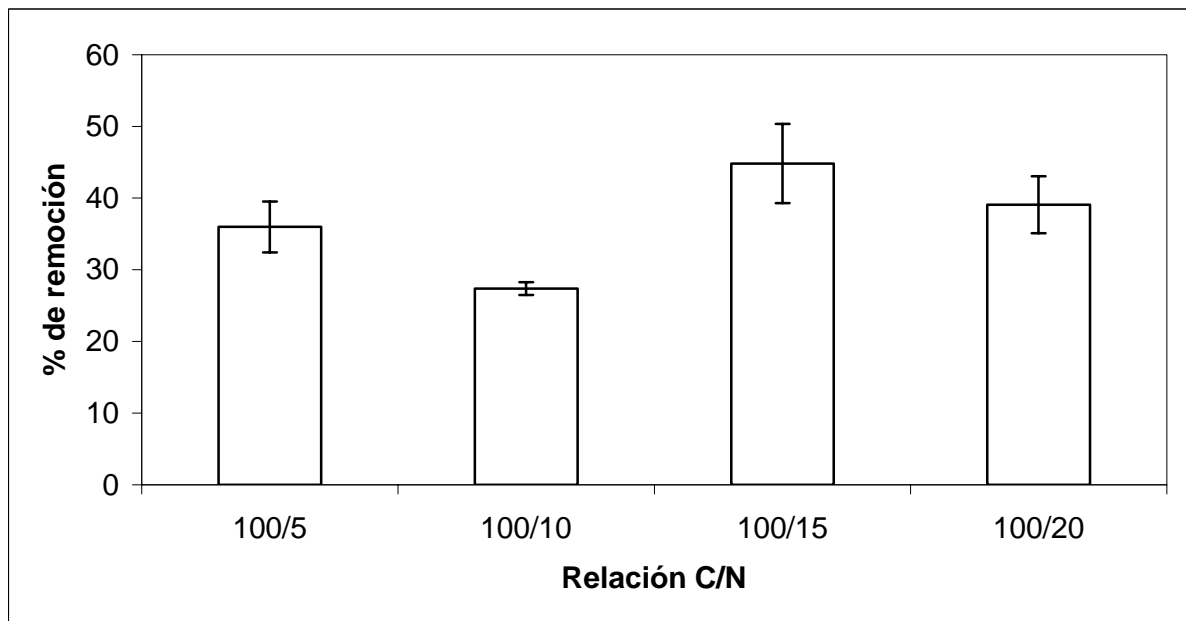


Figura 3.5 Efecto de la relación C/N en la remoción de HTP.

El porcentaje de Nitrógeno se calculó con base en los hidrocarburos totales presentes en el suelo. La máxima remoción alcanzada fue del 22.4 % de los hidrocarburos totales que corresponde al 44.8% de la fracción degradable.

Una vez estudiado el nivel de contaminación, contenido en el suelo (500 000 ppm) para el proceso de biorremediación de suelos temperizados. Se determinó la relación óptima de operación: suelo-texturizante (15%) y C/N, (100/15) , además de encontrar los valores de pH (6.5 a 7.5) y temperatura (30 °C) dentro de los valores aceptados por la literatura (Cunningham,C.J.,2000, Alexander, M.1999, Juana, B.,1999) para una remoción favorable. Se obtuvo

un nivel de remoción en microcosmos del 44.8% de los hidrocarburos degradables, en un tiempo de aproximadamente 20 días.

3.2 Aislamiento de cepas nativas cultivables en caja petri

3.2.1 Bacterias

Se observó el crecimiento de 18 colonias de bacterias en agar nutritivo. En la figura 3.6 se observa la evolución del crecimiento bacteriano en función del día de muestreo. Analizando la figura, es importante destacar que conforme evoluciona el biotratamiento se produce una selección microbiana donde predominan las cepas con mayor capacidad para degradar hidrocarburos. (Fredericks, K.M. , 1996) llevó acabo la degradación de hidrocarburos en microcosmos a diferentes relaciones de nutrientes inorgánicos y con un conjunto de bacterias que presentó durante la evolución del tratamiento una importante selección de estas, que se reflejó en la producción de CO₂ similar a la presentada en la sección anterior de este trabajo.

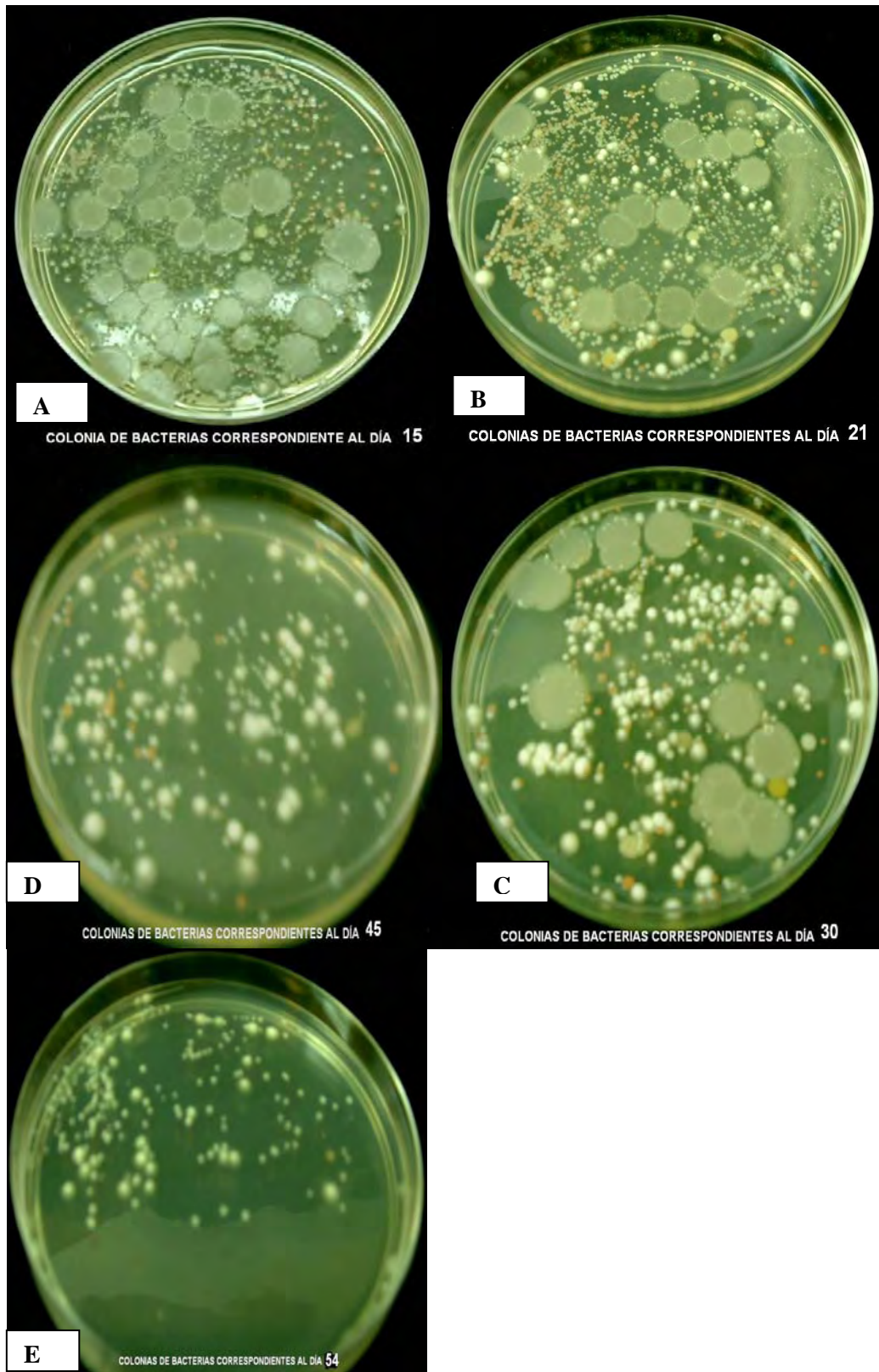


Figura 3.6 Evolución poblacional .(A-día15, B-día 21, C-día 30, D-día 45 y E-día 54) de bacterias presentes en el proceso de biorremediación de un suelo altamente contaminado con HTP.

En la figura 3.7 se presentan fotografías de cepas de bacterias aisladas en agar nutritivo y con capacidad de degradar HTP (ver sección 2.2) y en la tabla 3.3, se describen las características morfológicas celulares de éstas.

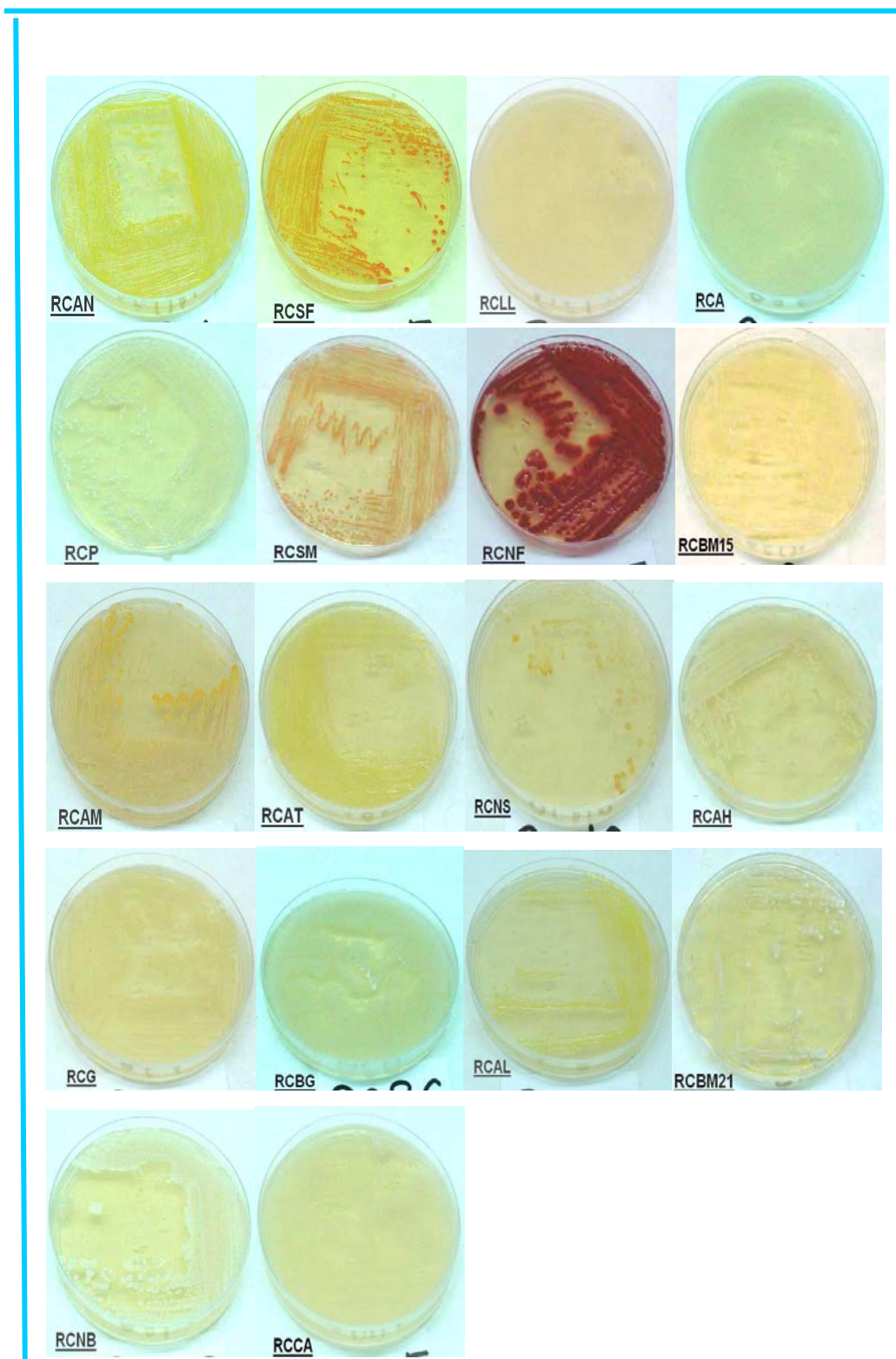


Figura 3.7 Cepas puras de bacterias hidrocarbonoclastas presentes en un suelo con un alto contenido de HTP (≈ 500000 ppm)

Tabla 3.3 Morfología colonial de las cepas de bacterias degradadoras de hidrocarburos.

Cepa	Forma	Bordes	Elevación	Color	Textura	Tamaño
RCP	Puntiforme	Entero	Convexa	Blanquecina	Cremosa	Chica
RCBM15	Circular	Entero	Convexa	Blanquecina	Cremosa	Mediana
RCBM21	Circular	Entero	Convexa	Blanquecina	Cremosa	Mediana
RCAL	Puntiforme	Entero	Plana	Amarillo	Viscosa	Chica
RCA ¹	Rizoide	Filamentoso	Plana	Blanquecina	Cremosa	Grande
RCNS	Circular	Ondulado	Umbonada	Naranja seca	Seca	Chica
RCAH	Circular	Entero	Plana	Amarillo Fuerte	Cremosa	Mediana
RCSM	Circular	Entero	Convexa	Salmon	Cremosa	Mediana
RCSF	Circular	Entero	Convexa	Salmon fuerte	Cremosa	Mediana
RCBG	Circular	Ondulado	Plana	Blanquecino	Cremosa	Grande
RCNB	Circular	Lobulado	Elevada	Blanquecina	Cremosa	Mediana
RCLL ²			Elevada	Blanquecina	Viscosa	Grande
RCG	Amiboide	Lobulada	Umbonada	Naranja opaca	Seca	Mediana
RCNF	Circular	Ondulado	Plana	Naranja fuerte	Viscosa	Mediana
RCAT	Puntiforme	Entero	Plana	Amarillo Transparente	Viscosa	Chica
RCAM	Circular	Entero	Elevada	Melón	Cremosa	Mediana
RCCA	Circular	Entero	Convexa	Crema	Cremosa	Mediana
RCAN ³	Circular	Entero	Convexa	Amarillo naranja	Cremosa	Mediana

¹ Crece muy rápido y se extiende sobre toda la caja. ² Produce mucho surfactante. ³ Con el paso del tiempo toma el color de amarillo-Naranja

En la Figura 3.8 se presenta una comparación de las eficiencias de remoción de HTP calculadas para todas las cepas de bacterias y hongos.

En esta figura se muestra que aproximadamente el 74% de las cepas muestran eficiencias de remoción de HTP, entre el 20-30%, en tanto que el 15%, eficiencias de remoción > 40%. No obstante, las cifras mostradas, se considera que las eficiencias de remoción son aceptables considerando el alto nivel de contaminación inicial del suelo tratado, 500000 ppm.

De acuerdo con trabajos reportados en la literatura (Cruz,R.M., Cerrato, F.R., 2002), la biorremediación del suelo estudiado podría mejorarse, aplicando tratamientos secuenciales más cortos con la subsecuente adición de nutrientes.

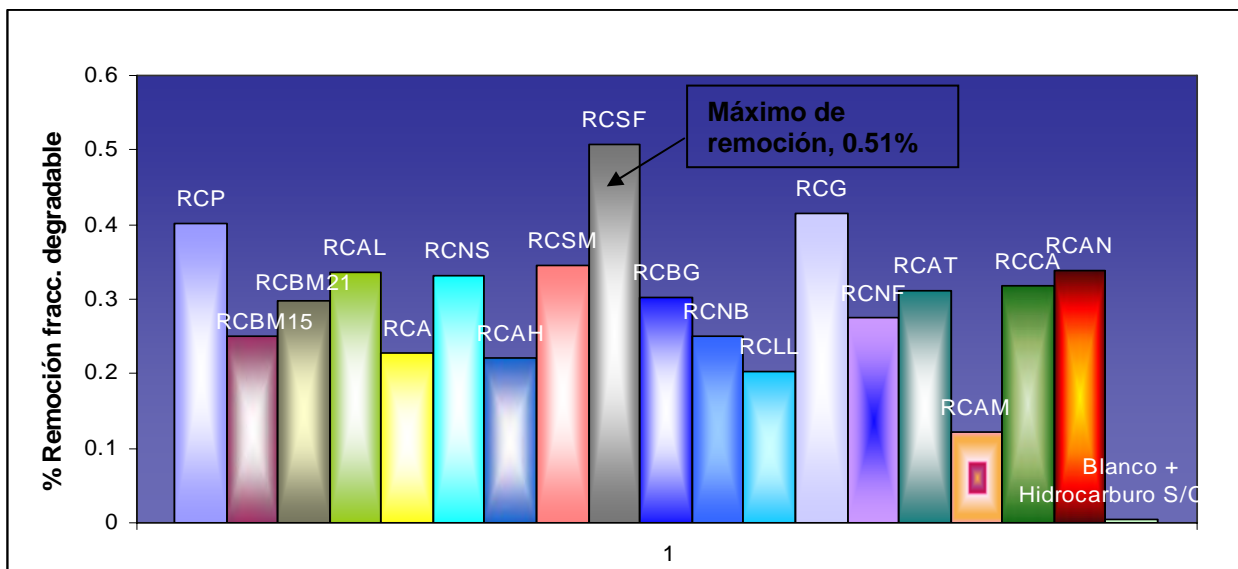


Figura 3.8 Comparación de porcentajes de remoción de HTP de las cepas identificadas como hidrocarbonoclastas.

3.2.2 Hongos

Se aislaron 6 hongos diferentes (Figura 3.9), de los cuales 4 fueron identificados hasta género como degradadores de HTP. De acuerdo a la identificación por microcultivo de éstos 4, 2 son *Aspergillus*, del género *expansum* y *candidus*, el tercero es *Penicillium* y el cuarto *Cladosporium*. Existe el registro ya comprobado de la capacidad degradativa (Rivera, C. et. al.) para los hongos *Aspergillus*, y *Penicillium* en un suelo contaminado con 322841mg Kg⁻¹ de hidrocarburo Maya, estos microorganismos rizosfericos tuvieron capacidad de adaptación y crecimiento en un cultivo puro con petróleo como fuente de carbono y energía.

Los hongos que lograron desarrollarse en un medio de cultivo cuya única fuente de carbono fue el hidrocarburo de petróleo son:

- Hongo A Posible *Aspergillus expansum*
- Hongo B Posible *Aspergillus candidus*
- Hongo C Posible *Penicillium*
- Hongo D Posible *cladosporium*
- Hongo E , F No degradadores

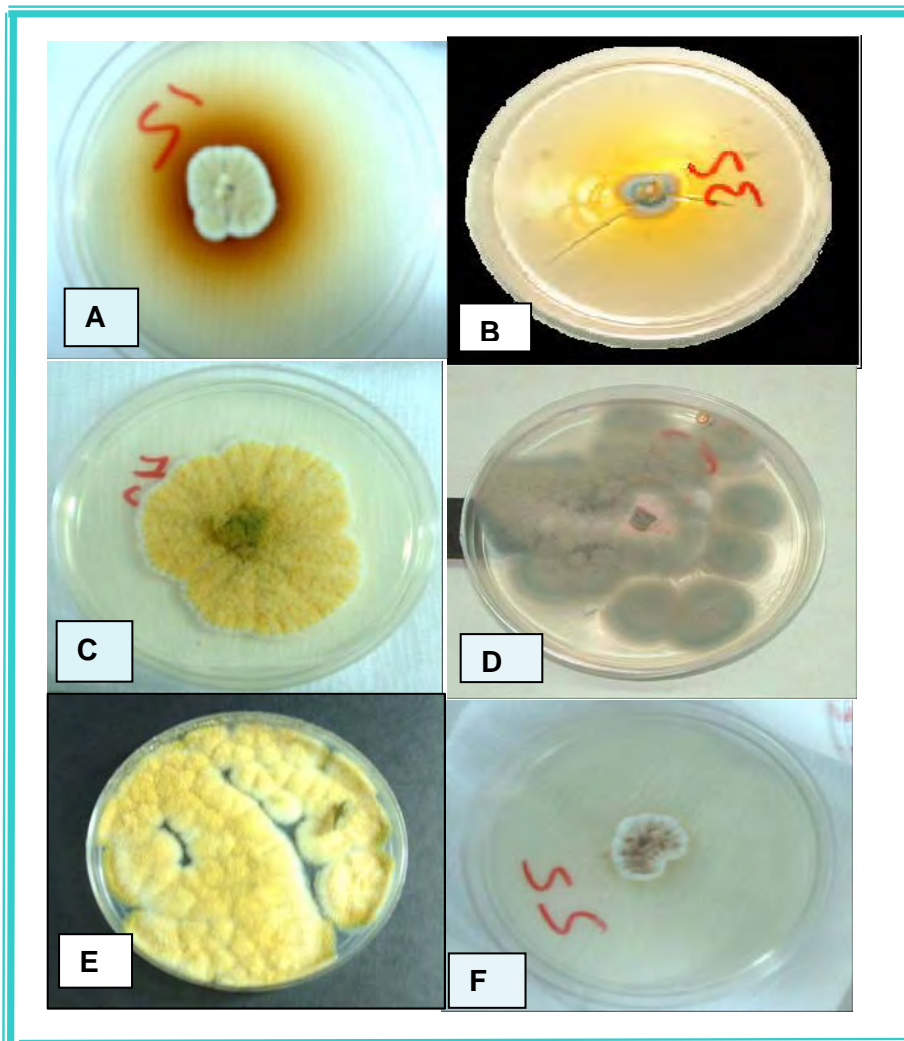


Figura 3.9. Hongos aislados de un biorreactor operado a 20°C, pH de 7 y 6 l/min de aire.

3.2.2.1 Prueba para hidrocarbonoclastas

Se sembraron y aislaron 6 tipos de hongos, en el medio de cultivo agar Saboreu, se activaron encubándolas a 30°C durante 72 hrs., enseguida se tomó una asada del hongo desarrollado y se inoculó en medio mineral de Rennie completo, por 72 hrs., a 30°C y a 150 rpm y por último en Renni modificado, donde la única fuente de carbono es el hidrocarburo, el resultado. 4 resultaron degradadores de hidrocarburos (figura 3.10). De estos últimos se realizaron una serie de micro cultivos (ver figura 3.11) y la posterior tinción con azul algodón para identificarlos morfológicamente (Teofilo, H. ,1990 y Martinez, M.E., 1988.).

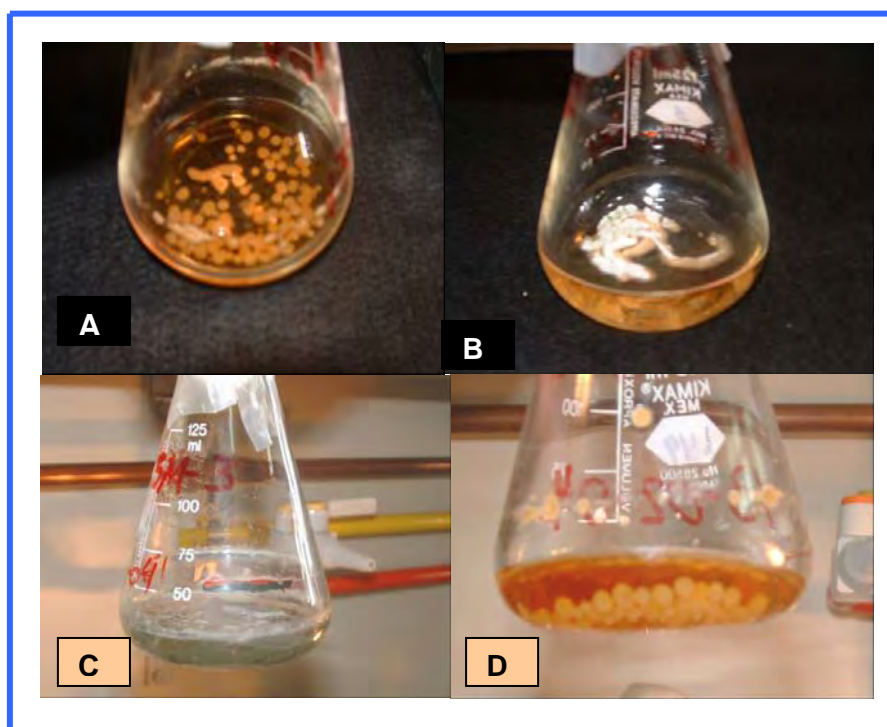


Figura 3.10 Prueba de hidrocarbonoclastas en medio líquido para hongos.

- A Posible *Aspergillus expansum*, B Posible *Penicillium*, C Posible *cladosporium* , D Posible *Aspergillus candidus*.

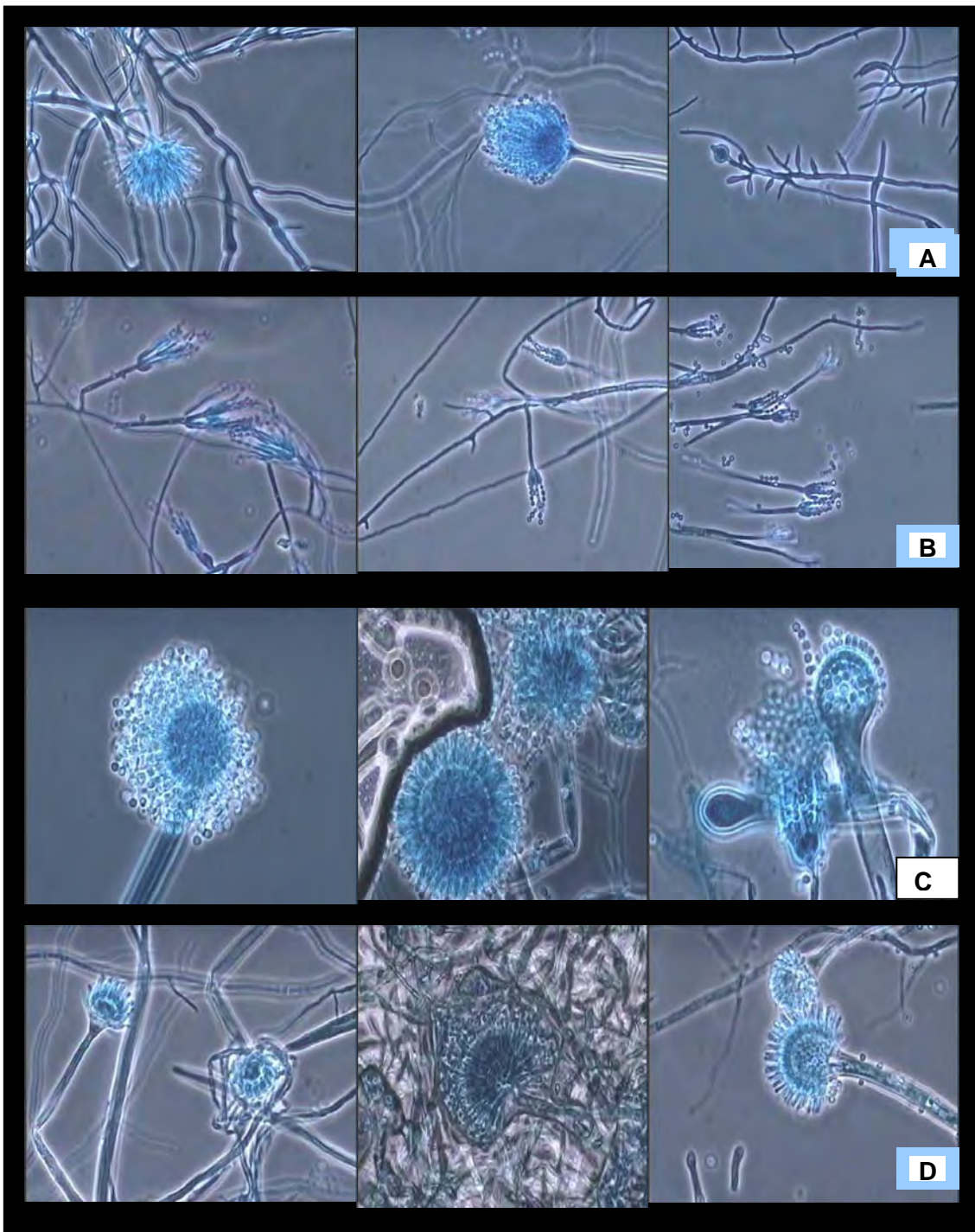


Figura 3.11. Morfología celular de los hongos aislados considerados como hidrocarbonoclastas. A) *Aspergillus candidus*; B) *Aspergillus cladosporium*; C) *Aspergillus expansum*; D) *Penicillium*.

3.3 Resultados biorreactores

En la tabla 3.4 se presenta el análisis de varianza del estudio del efecto del flujo de aire en el proceso de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. De acuerdo con el valor de probabilidad (P(F) 0.0001) calculado, el flujo de aire tiene un efecto significativo del 96.45, en el proceso de remoción de hidrocarburos.

Los porcentajes de HTP removidos, al operar la biopila con 2, 4 y 6 l/min son respectivamente. 7.19%, 20.68% y 32% de la fracción degradable. Estos resultados concuerdan con resultados reportados por otros investigadores, respecto a aumentar los niveles de remoción de hidrocarburos, por efecto de un suministro adicional de aire. Morrison , 1997, por ejemplo, reporta que el suministro de aire a una biopila con suelo contaminado por combustible diesel, incrementó la remoción hasta un 87%. Por su parte, Rhykerd , 1999, logró reducir hasta en un 82%, la contaminación producida por crudo, originada por barriles de crudo abandonados.

Tabla 3.4, Análisis de varianza del estudio del efecto del flujo de aire en la biorremediación de un suelo altamente contaminado con HTP

FUENTE	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS MEDIOS	VALOR DE F	Prob≥F
Modelo	2013.05	8	251.63	26.24	≤0.001
Flujo de aire	196.75	4	49.19	5.13	0.0062
Error puro	172.59	18	9.59		
Correlación total	2185.64	26	-----		

3.3.1 Perfiles radiales de parámetros del proceso de biodegradación de HTP

Se analizó el perfil radial de los parámetros pH, humedad (*H*), producción de CO₂ y HTP residuales. Los perfiles fueron trazados para tres flujos diferentes de aire: Biopila número 1 (B-1) de 2 l/min. Biopila número 2 (B-2) de 4 l/min y Biopila número 3 (B-3) a 6 l/min., suministrados al biorreactor. La evolución radial de los parámetros analizados fue comparada con relación a valores iniciales mantenidos constantes al inicio del montaje de cada biopila. El valor inicial de los parámetros es el siguiente: pH 6.5-7.5, H 55% y 500,000 ppm (50%).

En la sección de metodología se mencionó que el proceso se llevó a cabo dentro de una cámara mantenida a temperatura constante (20-25°C aproximadamente). A este respecto es importante mencionar que no obstante la idea de realizar el proceso a temperatura constante, la temperatura fue monitoreada en el seno de la matriz sólida, con el objetivo de detectar incrementos de temperatura producidos por efecto del calor metabólico de la flora microbiana nativa presente (Atchley, H. 1979,). La evolución de temperatura monitoreada dentro de la biopila se presenta en la Figura 3.12, para los flujos de aire 2, 4 y 6 l/min. En cada gráfica se indica con los símbolos rombo, cuadrado y triángulo, el flujo de aire en la región central, media y perimetral del reactor, respectivamente. Comparando los perfiles trazados por cada uno de los símbolos mencionados, podemos decir que no existe una variación de temperatura en la dirección radial del biorreactor. Este comportamiento podría ser explicado por la existencia de un equilibrio de temperatura desarrollado entre la atmósfera de la cámara de temperatura constante y el biorreactor. Esta explicación es posible si se considera la altura del biorreactor, que es de 10 cm.

3.3.1.1 Perfil radial de temperatura.

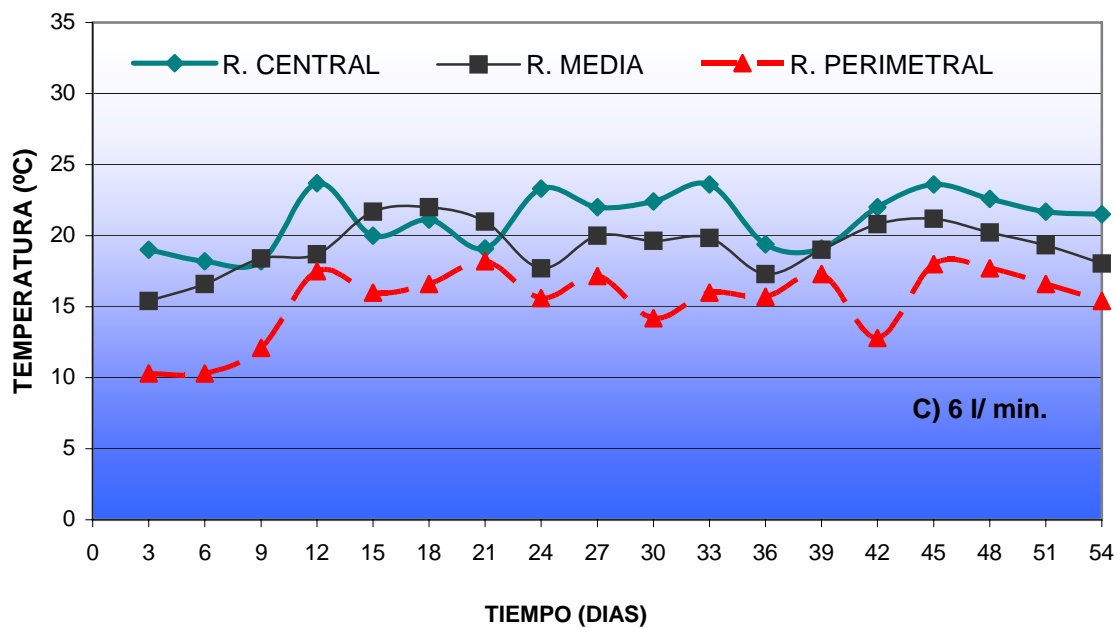
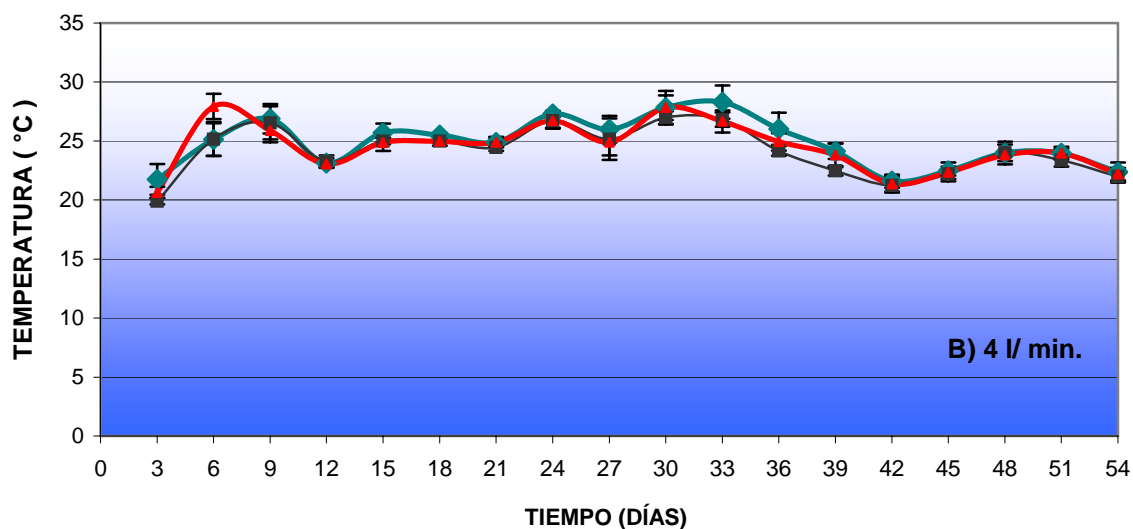
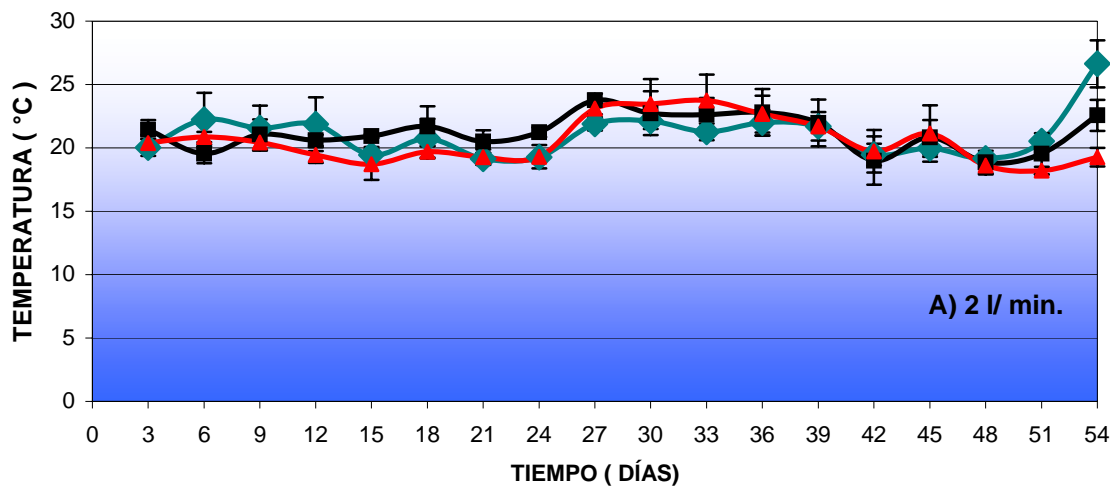


Figura. 3.12 Perfiles de temperatura desarrollada en los Biorreactores operados a flujo de aire constante de: A) 2 l/min, B) 4 l/min y C) 6 l/min.

En una composta, la flora microbiana se desarrolla en el intervalo de temperatura 15-45 °C. No obstante, el crecimiento óptimo se presenta en el rango 25-35°C (Juana,B.E.,1999). De acuerdo con Mandigan, (1998), por cada 10 °C de incremento en la temperatura de una composta, la tasa de biotransformación de crudo puede duplicarse. Durante los estudios de biotratabilidad del suelo contaminado, a 30 °C se determinaron los mejores niveles de remoción. Los hongos es la flora microbiana que mejor realiza el trabajo de biodegradación de HTP y considerando que a 30°C solo se observó el crecimiento de bacterias, en el presente estudio se trabajó en el intervalo de temperatura que fue posible alcanzar, 20-25°C. De acuerdo con experiencias pasadas, en este rango de temperatura se obtuvieron los máximos niveles de remoción de HTP mediante hongos, principalmente (De la Torre, 2002).

Para el monitoreo de la temperatura se empleó el software Mobilo®, Equipo basado en 9 sensores de temperatura que emplean transistores modelo LM35 con precisión en °C y con variación de ± 2 °C. El registro de temperatura fue cada 30 minutos durante 24 horas y por el tiempo que duró la prueba.

El efecto del flujo de aire sobre cada prueba (2, 4 y 6 l/min.) demuestra la importancia para mantener una temperatura constante.

El comportamiento de la biopila a 2 y 4 l/min. Figura 3.12 – A y B. Fue de forma muy similar su temperatura promedio fue de en el intervalo de 20 a 25 °C, sin embargo para la prueba a 6 l/min. Existe una gran diferencia en cada una de las zonas (central, media y perimetral) donde observamos en la figura 3.12- C una temperatura promedio de 20 a 25 °C para las dos primeras mientras que para la perimetral su temperatura se mantuvo entre los 18 y 19 °C esto debido tal vez a la observación del incremento de la humedad suministrada a través del aire humidificado de alimentación que no permitía el adecuado aprovechamiento y evaporación de ésta para la flora microbiana.

3.3.1.2 Perfil radial de concentración H⁺

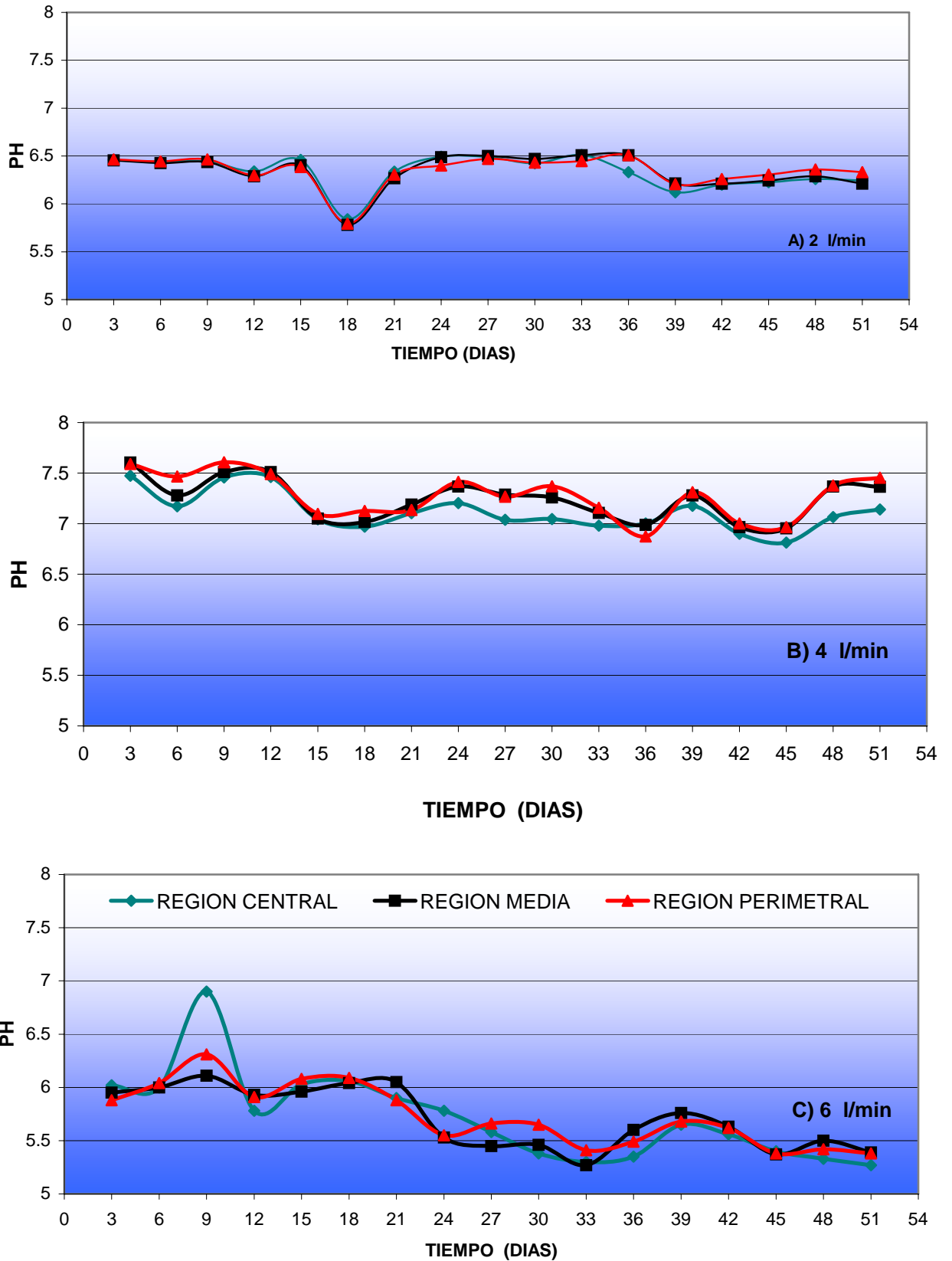


Figura. 3.13 Perfiles de pH desarrollado en los Biorreactores operados a flujo de aire

constante de: A) 2 l/min, B) 4 l/min y C) 6 l/min

Cambiar el pH inicial de un suelo no es un trabajo fácil, considerando las características “buffer” del suelo mismo. En el presente trabajo, el pH del suelo se cambió gradualmente adicionando carbonato de calcio en solución, junto con los nutrientes. Es importante mencionar que en algunas corridas, el pH del suelo no logró incrementarse hasta 7, a pesar de adicionar una mayor cantidad de carbonato de calcio respecto a la inicialmente calculada para este efecto. Este fenómeno se observa en el pH inicial mostrado en la figura 3.13, de la A a la C.

Analizando las cinéticas de pH en función del tiempo, se observa una ligera velocidad de descenso de pH ($\Delta\text{pH}/\Delta t$, $t = \text{tiempo}$), que incrementa de 0.0035 (a 2 l/min) a 0.014 (a 6 l/min) en función del flujo de aire suministrado a la biopila. Este descenso de pH indica un cambio en el proceso metabólico de la flora microbiana nativa, por lo cual se podría esperar que al aumentar el flujo de aire, se incremente el % de remoción de HTP. De acuerdo con Cookson (1995), el pH óptimo para biodegradar HTP, está en el rango 6-8. En el presente estudio, el pH registrado en las biopilas operadas a 2 y 4 l/min de aire, está dentro de este rango, por lo cual se podrían esperar obtener porcentajes de remoción de HTP razonables. En el caso del biorreactor operado a 6 l/min, no obstante que se registró un pH en el rango 5.4-6.3, no se descarta la degradación de hidrocarburos, considerando los trabajos desarrollados por Sudarat, B. (2000), quien reporta remoción de HTP, mediante hongos, a un pH de 5.

Con relación a los perfiles radiales de pH, en la Figura 3.13, no se observan cambios significativos cuando se alimentan flujos de aire bajos, de 2L/min. La separación entre los perfiles que describen las cinéticas de pH en las regiones central, media y periférica, se empiezan a observar cuando el flujo de aire se incrementa a 4 l/min y más aún a 6 l/min. Estos resultados nos podrían predecir la posibilidad de detectar un mayor nivel de remoción de HTP en la parte central del biorreactor, que en la periferia.

3.3.1.3 Perfil radial de humedad.

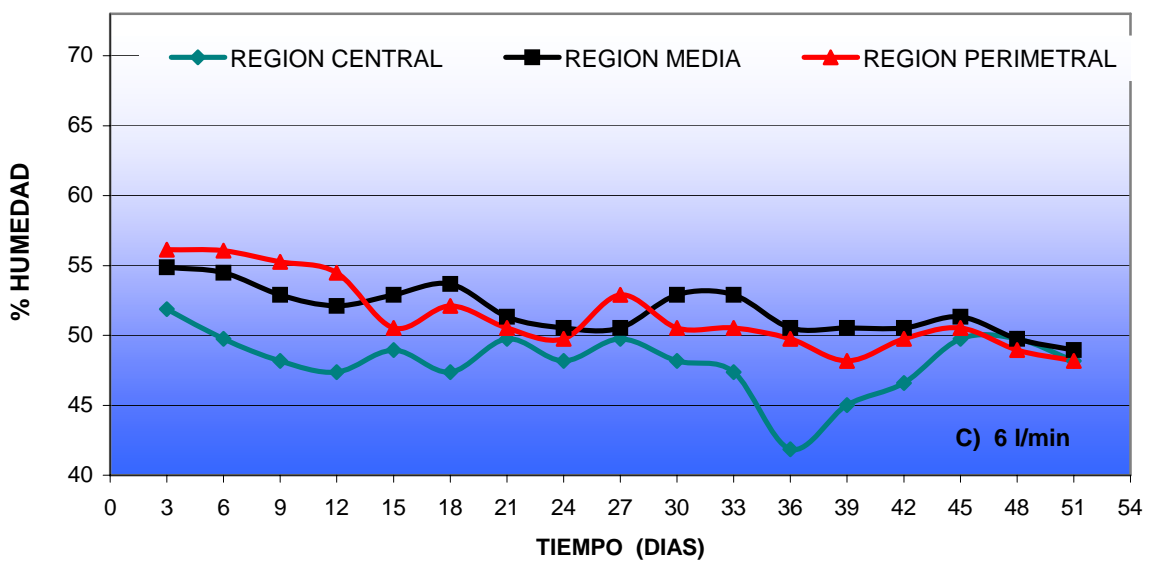
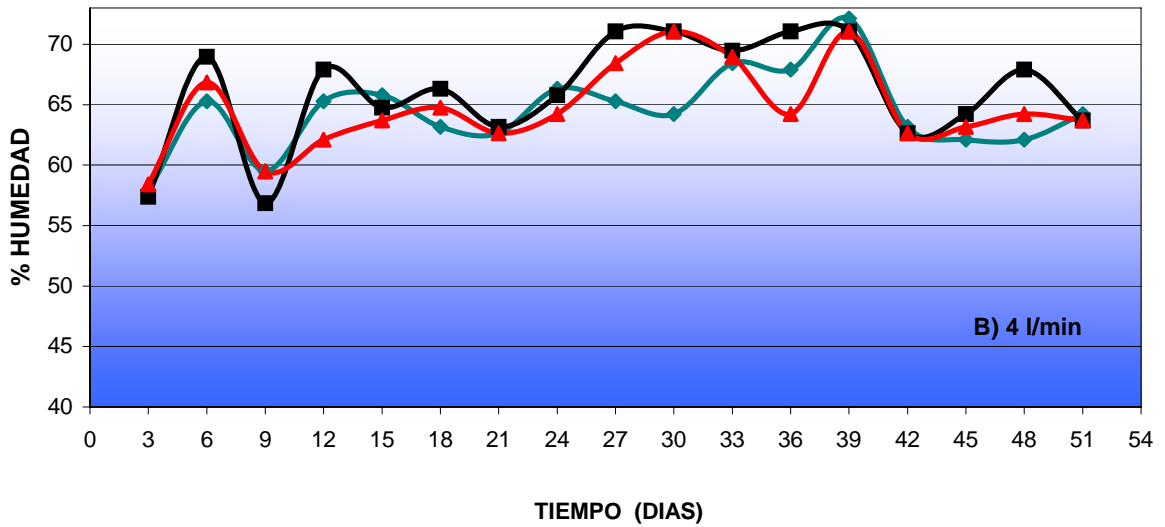
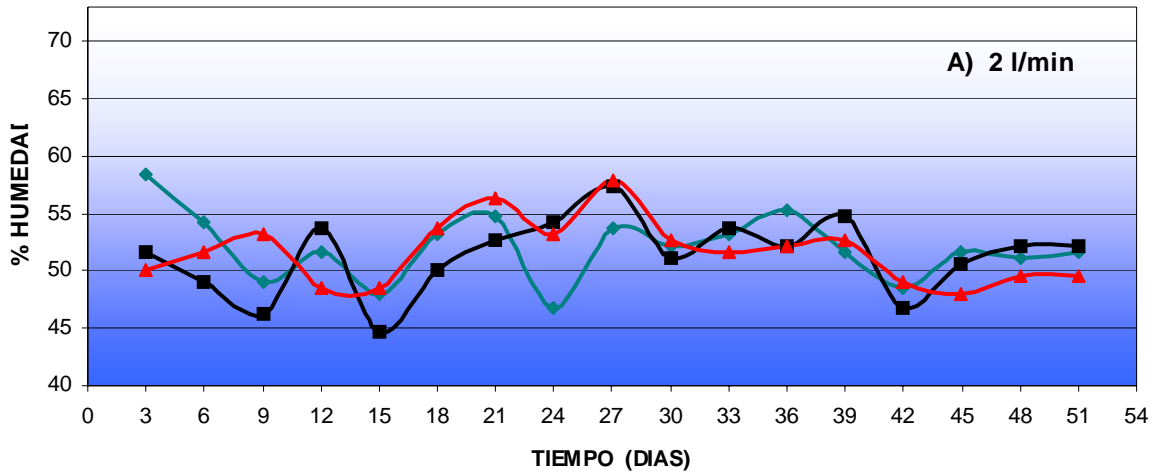


Figura. 3.14 Perfiles de Humedad desarrollados en los Biorreactores operados a flujo de aire constante de: A) 2 l/min, B) 4 l/min y C) 6 l/min.

En la figura 3.14 se presentan las cinéticas de humedad obtenidas en tres posiciones radiales, al operar el biorreactor a 2, 4 y 6 l/min de aire. Comparando las cinéticas de humedad en términos del flujo de aire alimentado a los biorreactores, se observan diferentes patrones de comportamiento sin una tendencia asociada al flujo de aire alimentado. En el biorreactor aireado con 2 l/min de aire, por ejemplo, los perfiles radiales de humedad son prácticamente horizontales, en el rango 50-55%, este comportamiento podría indicar inactividad metabólica de la flora microbiana del suelo. En el caso de los biorreactores aireados con 4 y 6 l/min de aire, los perfiles de aireación muestran tendencias opuestas. El biorreactor aireado con 4 l/min de aire, describe perfiles de humedad crecientes, en el rango 55-70%, en tanto que en el biorreactor aireado con 6 l/min, los perfiles de humedad decrecen hasta un 46%.

Es importante mencionar que el objetivo de inyectar aire húmedo al biorreactor es el mantener una humedad constante en la matriz sólida (Batelle, 1989). No obstante, fenómenos presentes como es la pérdida de energía por fricción, podría provocar un incremento en la humedad de la matriz sólida, por efecto de la condensación del vapor de agua arrastrado por el aire. Si la actividad metabólica de la flora microbiana es alta, la humedad adsorbida por la matriz sólida podría favorecer los procesos metabólicos de los microorganismos, y estos a su vez, la evaporación del agua debido al consecuente incremento de temperatura (Mandigan, 1998,). En un proceso metabólico activo constante, la humedad en la matriz sólida debería alcanzar un valor constante determinado por el equilibrio de los fenómenos condensación- evaporación Aguilera, L. S. 2001.

Este equilibrio se infiere en el biorreactor alimentado con 6 l/min de aire. En el caso del biorreactor alimentado con 4 l/min de aire, se puede suponer que la actividad metabólica no es muy alta, por lo cual podría predominar el efecto de condensación de vapor de agua (aire húmedo + ambiente a 25°C), lo que incrementa la humedad de la matriz sólida.

3.3.1.4 Perfil radial de producción de CO₂.

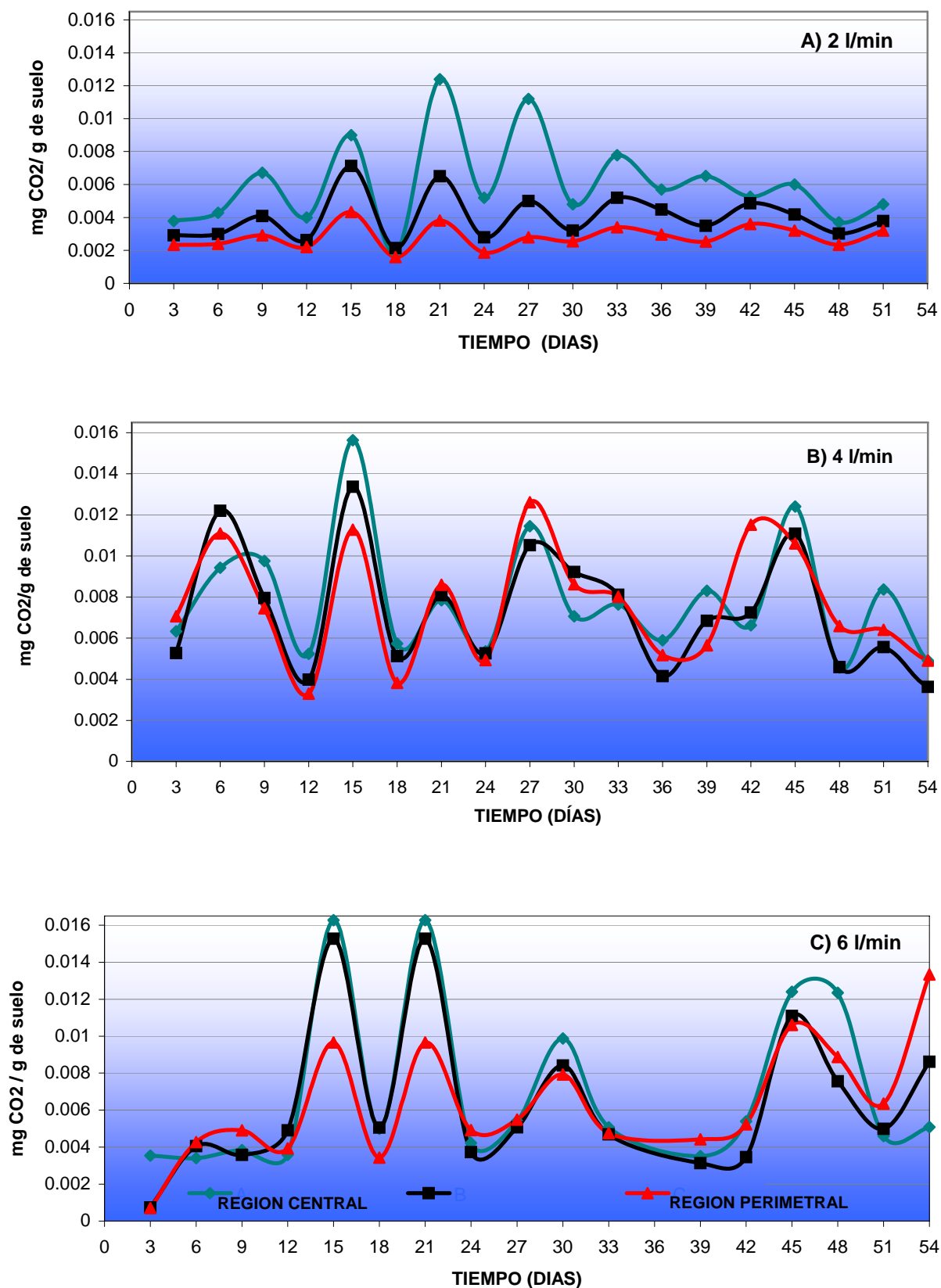


Figura. 3.15 Perfiles de producción de CO₂ desarrollados en los Biorreactores operados a flujo de aire constante de: A) 2 L/min, B) 4 L/min y C) 6 L/min

Analizando la evolución de los perfiles de producción de CO₂, en función del tiempo y mostrados en la Figura 3.15, se observa un incremento en la actividad metabólica de la flora microbiana nativa del suelo, en función del flujo de aire alimentado al biorreactor. Al alimentar 2 l/min de aire, la producción de CO₂ muestra una tendencia cíclica constante durante todo el tiempo que duró el biotratamiento del suelo, comprendida en el intervalo 0.002-0.012 mgCO₂/g de suelo. Al incrementar el flujo de aire a 6 l/min, los perfiles de producción de CO₂ muestran un comportamiento cíclico no homogéneo, donde el tiempo de aparición de picos de CO₂, se alarga en función del tiempo. Al inicio, por ejemplo se observa una producción máxima de CO₂ (0.016) en los días 15 y 21. Después de este tiempo disminuye la producción de CO₂ para incrementar posteriormente hasta los días 27 y 46.

Esta tendencia cíclica podría indicar la sucesión de poblaciones microbianas, normalmente presentes en todo proceso de composteo, situación que presento Roling, M. (2002) al llevar acabo la degradación de hidrocarburos en microcosmos con un conjunto de bacterias que presentó durante la evolución del tratamiento una importante selección de éstas, que se reflejo en la producción de CO₂ y en el conteo realizado.

Es importante destacar en el caso de la producción de CO₂, la manifestación de perfiles radiales cuando el flujo de aire es de 2 l/min, como se muestra en la Figura 3.15A. De acuerdo con la altura de los perfiles de las cinéticas de CO₂ trazadas, la producción de CO₂ es mayor al centro del biorreactor, que en la periferia, donde la producción de CO₂ es prácticamente despreciable.

3.3.1.5 Perfil radial de remoción de hidrocarburos totales de petróleo.

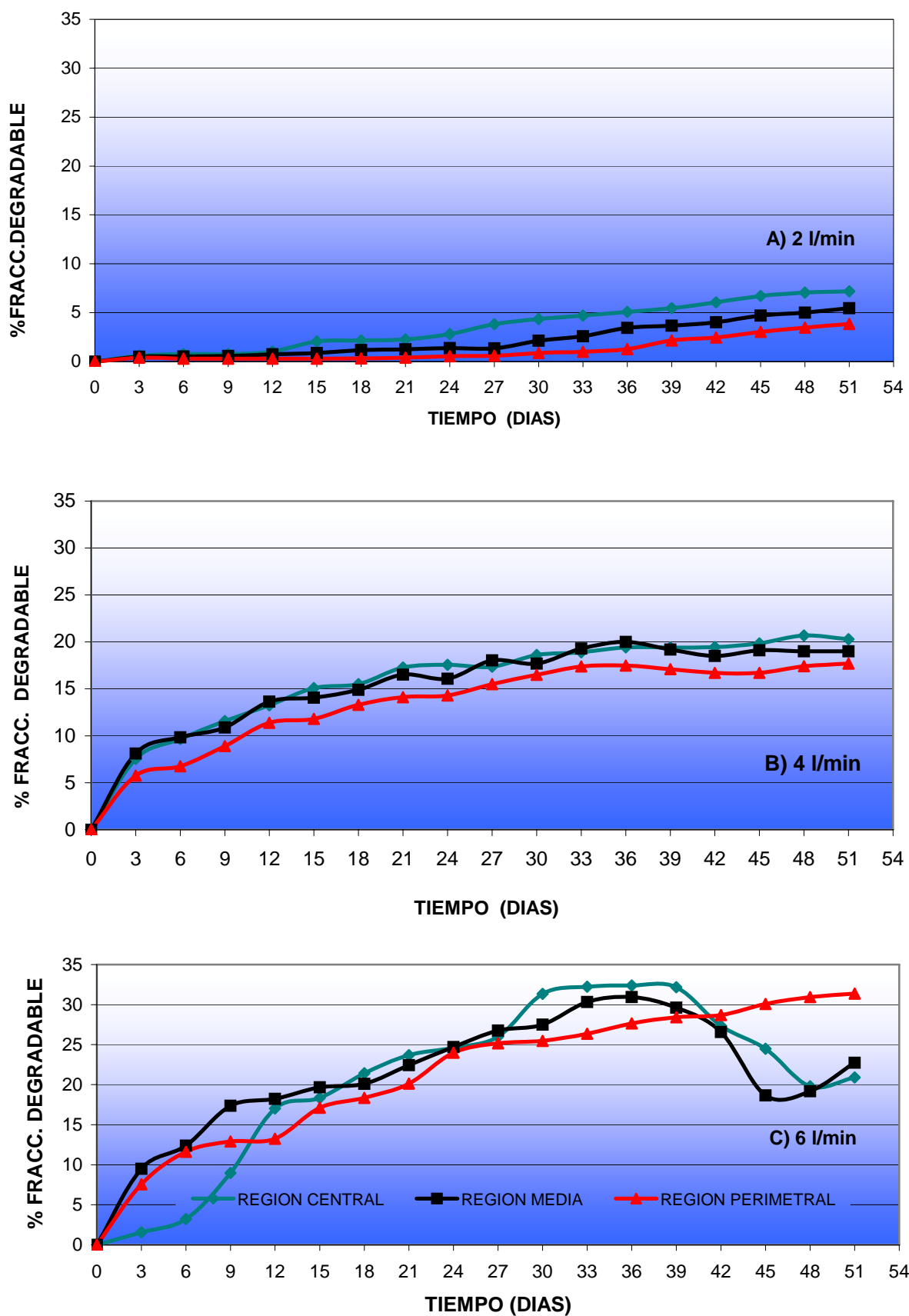


Figura.3.16 Perfiles de % de remoción de HTP desarrollados en los Biorreactores operados a flujo de aire constante de: A) 2 l/min, B) 4 l/min y C) 6 l/min.

Los perfiles de las cinéticas de remoción de HTP son presentados en la Figura 3.16 para los flujos 2, 4 y 6 l/min. Comparando los perfiles de remoción para los diferentes flujos de aire alimentados al biorreactor, podemos decir que el flujo de aire es determinante en los procesos de degradación de hidrocarburos y que para las dimensiones del biorreactor estudiado, el más adecuado es de 6 l/min, con el cual se obtuvieron los porcentajes máximos de degradación y que corresponden al 32% de la fracción de hidrocarburos factibles a degradar.

Analizando la tendencia de los perfiles mostrados en esta figura, un flujo de aire de 2 l/min es insuficiente para activar el metabolismo de la flora microbiana, lo cual se deduce por la forma asintótica de las cinéticas de remoción de HTP trazadas. En el caso de los perfiles obtenidos al alimentar 4 y 6 l/min de aire, la tendencia es completamente diferente, inician con una velocidad de degradación alta, que disminuye en función del tiempo. La velocidad de remoción de hidrocarburos calculada en el biorreactor alimentado con 6 l/min de aire, tanto la inicial como la final, fue del doble con relación a la calculada para el biorreactor alimentado con 4 l/min.

La tendencia de los perfiles de las cinéticas de % de remoción de HTP a mantenerse constantes con el transcurso del tiempo, podría deberse a un equilibrio termodinámico determinado por la cantidad de oxígeno disponible en cada biorreactor (Dibble and Bartha, 1979).

IV Conclusiones

La aireación forzada de una biopila, para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos es la variable más importante, obteniendo una contribución del 96.45%. El nivel máximo de remoción de HTP degradables es del 32% a 6L/min. Porcentaje aceptable considerando las características del suelo. (500 000 mg/Kg) que contiene hidrocarburos intemperizados y añejados de aproximadamente 30 años. (IMP, 2001). de los cuales un 50% pertenece a la fracción de los asfáltenos.

Se determinó la relación óptima de operación: suelo-texturizante (15%) y C/N, (100/15) , además de encontrar los valores de pH (6.5 a 7.5) y temperatura (30 °C) dentro de los valores aceptados por la literatura (Cunningham,C.J.,2000, Alexander, M.1999, Juana, B.,1999) para una remoción favorable. Se obtuvo un nivel de remoción en microcosmos del 44.8% de los hidrocarburos degradables, en un tiempo de aproximadamente 20 días.

Fueron identificados 4 tipos de hongos hasta género como degradadores de HTP. De acuerdo a la identificación por microcultivo de éstos 4, 2 son *Aspergillus*, del género *expansum* y *candidus*, el tercero es *Penicilium* y el cuarto *Cladosporium*. Existe el registro ya comprobado de la capacidad degradativa (Rivera, C. et. al.) para los hongos *Aspergillus*, y *Penicilium* en un suelo contaminado con 322841mg Kg^{-1} de hidrocarburo Maya, estos microorganismos rizosfericos tuvieron capacidad de adaptación y crecimiento en un cultivo puro con petróleo como fuente de carbono y energía.

Otros factores de relevancia que damos cuenta en este estudio es la temperatura, la humedad y el contenido de materia orgánica, estas propiedades son también determinantes en la biodegradación de contaminantes dado que favorecen la absorción de compuestos orgánicos(Alexander, 1999). La aireación es el factor determinante en el intercambio de oxígeno, este ayuda a mantener una temperatura constante, no permite la

existencia de zonas anaerobias en un proceso aeróbico y permite definir el tiempo de tratamiento de un suelo.

Las biopilas como alternativa de tratamiento, han demostrado ser eficientes en el proceso de remediación de suelos con un alto nivel de contaminación de HTP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamassu, W. y Korus, A.R. Engineering of Bioremediation processes: needs and limitations., Mc-Graw-Hill., 1998., pp.13-35

Alexander, M., , Biodegradation and Biorremediation. Academic, Press. E.U.A1998, pp. 128-129-215

Aguilera,L. Soto, O., Saucedo, G.,Gutierrez,, M., A model for composting hydrocarbon contaminated soil by using water activity and porosity as response variables., Chemical Engineereing Journal, 2001, 81:197-202

Amato, M. Determination of Carbon C and ¹⁴C in plant and soil. Soil Biology Biochemistry., 1983.15:611-612

A.O.A.C. 14.003, Official Methods of Analysis. 14th. Ed. Association of Oficial Analytical Chemists., Washinton,.D.C. U.S.A. 1984.

API., Petroleum Industry Environmental performance, 6 th , Annual Report. American Petroleum Institute, Washington, D.C. U.S.A. 1998,pp.123-127.

Atchley, S., Clark, J. Variability of temperature, pH and moisture in an aerobic composting process. Applied and Environmental Microbiology. 1979,38(6):1040-1044

Atlas, R., Bartha,R. (2002). Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Addison-Wesley, E.U.A., pp. 21-32.

Bartha, R. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. Microbial Ecology., 1986, 12:1555-172

Battaglia, A., Morgan, D.J. Ex situ forced aeration of soil piles:a physical model. Environment Progress., 1994, 13(3):178-187

Baver,D.L. Física de los suelos., Ed. UTHEA, México,1986. 145-147

Boonchan., S. Brito, M.I. Satnley, G., Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal bacterial cocultures Applied., Evironmental Microbiology. 2000, 66:1007-1019

Bradshaw,L.J, Microbiología de Laboratorio.,Ed. El Manual Moderno,S.A. , México, D.F. 1976,13-25

Brown K. Donnelly, K. Devel L.,Effects of mineral nutrients, sludge applications rate, and applications frequency on biodegradation of two oil sludges. Microbiology Ecol. 1983, 9: 363-373.

Brown, J. L. , Syslo, J., Yi-Hua, L. , Getty,S., Vemuri, R. y Nadeau, R. , On-site treatment of Contaminated Soils: An Approach to Bioremediation of
Buckman, H. O. and Brady N., Naturaleza y propiedades del suelo., 3^a Ed. Montaner, España, 1966. 184-245

Cajuste,L.J. El fósforo aprovechable en los suelos, Chapingo, México, UACH;1986. (Serie de cuadernos de edafología, 6)

Cookson, J.T. (1995) Boiremediation Engineering: Design and Application . McGraw Hill.

Crawford, R., Crawford, D., (1996), Bioremediation principles and Aplications. Cambridge, University Press, EUA.

Cunningham, J.C y Philp,J.C. Comparison of Bioaugmentation and Biostimulation in Ex situ treatment of Diesel Contaminated Soil. Land Contamination And Reclamation.,2000,8(4):261-268.

Cruz, R.M., Cerrato, F.R. y Haller,V.V., Poblaciones microbianas en perfiles de de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. Agrociencia., 2002,36:149-160.

Cruz, R.M., Cerrato, F.R. y Haller,V.V., Vázquez, R.R y Linares, F.L. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo., Terra., 2002, 20:423-434

De la Torre Sánchez R. (2002). Caracterización de un cultivo sólido aplicado a la remoción de hidrocarburos. Tesis de Maestria. CINVESTAV-IPN.

Dibble,J.T. and Bartha, R. The effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. Applied an Environmental Microbiology, 1979, 37:727-739.

Domínguez, M., Revah. S., Barrios-González, J., Optimization of bagasse, nutrients and inicial moisture ratios on the yield of penicillin in solids state fermentation., World Journal of Microbiology and Biotechnology., 2001,17:751-756.

Dua,M., Slingh,A., Sethunathan, N. y Johri, A.K. Biotechnology and Bioremediation: successes and limitations., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 59:143-152.

Dupont, R., Sims, R., Sims J., Sorensen, D., (1988). In situ Biological Treatment of Hazardous Waste-Contaminated Soils. Bioremediation Systems 2. ED. Donald Wise, CRC Press Florida.

EPA. Hazardous Waste Land Treatment. Municipal Environmental Research Laboratory. Office of Research and Development. U.S.A. Cincinnati, Ohio. 1983,15-21.

Fahnestock, M.F., Smith, L. A. y Wickramanayake, G.B. Biopile Design and Construction Manual. 1996.,. 37-52

Fernández, S.J.M., Ruiz., A. G., Rodríguez, V.R. La biorremediación como alternativa al tratamiento de suelos contaminados., Avance y Perspectiva, 1998, 17:293-302.

Ferrari, M.D. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y su aplicación en la biorremediación de suelos y lodos contaminados. Revista Argentina de Microbiología., 1996, 28:83-98

Finger, S. , Match, R., Regan, T., Aerobic microbial growth in semisolid matrices., Heat and Mass transfer limitation. Biotechnology and Bioengineering., XVIII, 1976,1193-1218.

Fitzpatrick, M., Tan, S. Recent advances in the determination of total petroleum hydrocarbons in soil Chemistry in New Zeland., 1993.,22-54

Fredericks, K.M. Adaptation of bacteria from one hydrocarbon to another. Nature, 1966., 209: 1047-1048

Fritsche, W., Guenther, T. Hofrichter, M., Sack, U., Metabolisms of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi of different ecological groups. Biol. Abwasserreinig. 1994., 4:167-182

Gama, R.R.M., Millán, L. B., Chávez, M.A., Madrazo, V. O., Reyes, T.G., García,V. L., Gómez, H.L., Rodríguez, M. I., Manual de prácticas de microbiología general.,Ed. Ramírez Gama., 2000, pp. 92-95

Gandoy, W., Manual de laboratorio para el manejo físico de suelos. Universidad Autónoma Chapingo, México. 1991.,pp.10-27.

Head, K.M.; Clark, T.G, manual of soil laboratory testing, vol.1, Engineering Laboratory Equipment, 1980, E.U.A.

Huerta, S. Efecto de la transferencia de masa y la acumulación de calor metabólico en la fermentación de cultivos sólidos, Tesis de Maestría , UAM-I., México, D.F. 1984.,pp. 15,24-26, 94-112.

Hupe, K., Heerenklage,J., Stegmann, R. Influence of oxygen on the degradation of TPH- Contaminated Soils., Bioreactor and Ex situ Biological Treatment Technologies. 1993. pp. 8-14.

Jeris, J.S. and Regan, R.W., Controlling Environmental Parameters for optimum Composting. Part1: Experimental procedures and Temperature compost. Sci. (Enero/febrero). 1973.,

Jorgensen, K., Pustinen,J., Minna Laine, M., Bioremediation by composting in mediation by composting in biopiles., Hakuninmaantie 4-6, Finnish Environment Institute, Research Laboratory, Helsinki, Finland. 2000.,

Juana, B. E., Principios de biorrecuperación., (1999) , Ed. Mc Graw Hill Interamericana., México.

Kastner,M., Mahro, B., Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost., Appl. Microbiology & Biotechnology., 1996., 44(5):668-675

Katherine, H.B., Diane, S.H. , Bioremediation., Ed. Mc Graw-Hill,1994., U.S.A., 9-51.

Kirchmann, H. y Ewnetu, W. Biodegradation of petroleum-based oil wastes through composting., Biodegradation.1998., 9:151-156.

Korda, A., Santas, P., Tenente, A., Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and comercial microorganisms currently used., ., Appl. Microbiology & Biotechnology., 1997., 48:677-686.

Lotfabad, S.K. y Gray, M.R., Kinetics of biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2002, 60:361-365

Lucke, B.R, Douglas, W.L. Cherylyn, W.W. Edward, K.C y Walter, C.W. Integrated, Multiple-Stage Chromatographic Method for the Separation and Identification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Complex Coal Liquids., Analytical Chemistry, 1985, 57(3):633-639

Madigan, M., Martinko, J.,Parker,J.,Brock, (1998). Biología de los Microorganismos. Prentice Hall, España.

Margesin, R. y Schinner, F. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures.Appl. Microbiol. Biotechnol., 1997, 47:462-468.

Martinez, M.E., Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados; U.N.A.M. 1988, Méx. D.F.

Medha, M.J y Sunggyu,L. Effect of Oxigen Amendments and Soil Ph on Bioremediation of Industrially Contaminated Soils., Energy Source, 1996,18:233-242.

Mendoza, C. A., Albores A., Fernandez L.L., Vázquez R.R. Pentachlorophenol biodegradation and detoxification by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* . Environmental Toxicology, Vol 15:2, 107-113. 2000.

Methods of soil Analysis. Part.2.,Chemical and Microbiological propierties C.A. Black Editor in the series Agronomy Inc., 1965., American Society of Agronomy Inc. Publisher, Madison, Wisconsin, U.S.A., 1995,213-365.

Moore, J.B., Armstrong, E.J. y Barker,J. Effects of Flow rate and Temperature During Bioventing in Cold Climates. In situ Aeration: Air

Sparging, Bioventing, and Related Remediation Processes. Battelle Press, U.S.A. 1995, pp. 307-333.

Morgan, P., Watkinson, R., Hydrocarbon Degradation in soils and Methods for soil Biotreatment., Critical Reviews in Biotechnology., 1989., 8(4):305-333.

Morrison, M.J. Evaluation of Aerated Biopile Treatment Options., In situ and On-site Bioremediation, Vol.1, Battelle Press., U.S.A. 1997, pp. 455-498.

Murray, B. McB. Environmental Chemistry of Soils., Oxford University Press. USA., 1994, 15-32

Padilla, R. M. Y. 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. 1989.

Ramirez, R., Millán, B., Velásquez, O., L., Mejía, A., Reyes, G., Hernández, L., Muggenburg, I. (2001). Manual de Prácticas de Microbiología General. Laboratorio de Microbiología Experimental. Fac. de Química, UNAM, México, D.F.

Raymond, R.L, Hudson, J.O. y Jamison, V.W. Oil Degradation in Soil., Applied and Environmental Microbiology., 1976, 31(4):522-535.

Rhykerd, R.L., Crews, B. , McInnes, K.J. y Weaver, W. R. Impact of Bulking Agents, Forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil., Bioresource Technology. 1999. 67:279-285.

Rivera-Cruz, M. C., Ferrera -Cerrato R., Volke-Haller V., Fernández-Linares L., Rodríguez-Vázquez R., Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México., Agrociencia, 2002. 36: 149-160.

Rivero, G.M, Castañeda, S. G., De Hoyos, F. S. y Rojas, G. M., Mass Transfer and Hydrocarbon Biodegradation of Aged Soil in Slurry Phase., Biotechnology Progress., 2002, 18:728-733.

Ronald, M.A. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective., Microbiological Reviews., 1981, 45:180-209.

Ronald, M.A. Simulated Petroleum Biodegradation., Critical Reviews in Microbiology., 1977, 5:371-386.

Saval, B. S. Acciones para la Remediación de Suelos en México. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM. 1995., 15-21

Simm, G.,(1990)Biological Degradation of Soil.,Adv. Soil Scie., 11:289-330.

Schwab, A. P., Su, J. Wetzel, S. Pekarek, S. y Banks, M. K. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking., Environ. Sci. Technol., 1999, 33:1940-1945

Singer, M.E., Finnerty, W.R. (1984). Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In Petroleum Microbiology. Atlas, R.M. Ed. Macmillan, N.Y. pp. 1-59.

Stapleton, R., Savage, D., Saylor, G., Stacey, G., Biodegradation of Aromatic Hydrocarbons in an Extremely acid Environment., Applied and Environmental microbiology., 1998., 64(11):4180-4184.

Steven, H.A. y Clark, J.B. Variability of Temperature, pH, and Moisture in a Aerobic Composting Process, Applied and Environmental Microbiology. 1979,38(6):1040-1044

Strom, P., Effect of temperature on Bacterial Species Diversity in Thermophilic solid-Waste Composting., Applied an Environmental Microbiology., 1985., 50(4):899-905.

Sudarat, B., Margaret, L. B., Grant A. S., Degradation and mineralization of High- Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Defined Fungal-Bacterial Cocultures., Applied and Environmental Microbiology.,2000, 66(3): 1007-1019.

Teofilo, H. Miguel U., El reino de los hongos, micología básica y aplicada. U.N.A.M. y Fondo de cultura Económica, 1990, Méx. D.F.

Wang,Z., Fingas, M., y Li Ken. Fractionation of a Light Crude Oil and Identification and Quantitation of Aliphatic, Aromatic, and Biomarker Compounds by GC-FID and GC-MS. Journal of Chromatographic Science, 1994, 32:367-382.

Wilson,S.C., Jones , K.C., Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH's) a review . Environ. Pollut., 1993., 81:229-249

¹http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES/ipn/avanpers/sept98/biorre/ft_1.html

APÉNDICE

MÉTODOS DE ANÁLISIS EMPLEADOS EN LA DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS DEL SUELO

A-1 Metodología de extracción de hidrocarburos.

Es mediante la extracción sólido –líquido. U.S.,E.P.A.,(3540C), 1983, (modificado por el laboratorio). La extracción se realiza con muestras de suelo seco y molido, empacado en un cartucho de papel filtro, para la extracción de hidrocarburos se utiliza cloruro de metileno, dejando a reflujo por 5 horas aproximadamente.

El modo de preparar el cartucho es mediante el uso de papel filtro de porosidad media, y realizando los siguientes dobleces.

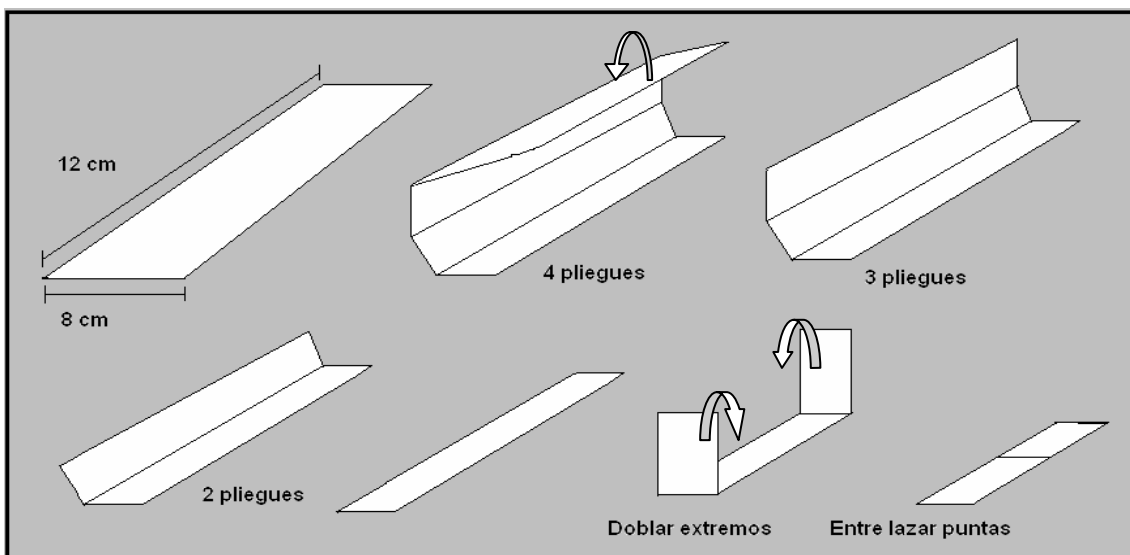


Figura A.1 Preparación del cartucho de extracción.

▪ Material

matraz balón de 125ml

extractor soxhlet

soporte universal

pinzas de tres dedos con nuez

campana de extracción

▪ Reactivo

Cloruro de metileno grado RA

Metodología de extracción

La extracción se realiza con un sistema de extracción soxhlet, empleando 1g de suelo seco y molido, es empacado en un cartucho de papel filtro (ver figura 5.1) , el cartucho es depositado en la camisa del soxhlet, se emplea como solvente de extracción cloruro de metileno. La extracción se realiza en 5 reflujos de aproximadamente una hora cada uno, es decir cuando el solvente condensado en la camisa del soxhlet es completamente incolora.

El extracto obtenido, se concentra en el matraz y el hidrocarburo se recolecta mediante el uso de una pipeta pasteur y CH_2CL_2 , haciendo el trasvase a un frasco ámbar limpio y seco.

A-2 Metodología del Fraccionamiento de hidrocarburos.

Del método descrito por, Wan, et al, 1994. Y modificado en el laboratorio. Para lograr el fraccionamiento del hidrocarburo en grupos funcionales, es mediante la cromatografía en columna. Este estudio se realizó con la finalidad de:

- ✓ Separar al hidrocarburo en sus fracciones alifática, aromática y policíclica aromática.
- ✓ Identificar mediante cromatografía de gases cada una de estas fracciones.

Para lograr lo anterior es necesario determinar con que tipo de solventes trabajar y en que relación. La elección de emplear Hexano en la primera elusión es conforme a su polaridad para eluir solo las parafinas o compuestos lineales , para el benceno lograremos extraer la fracción de elementos que presentan un anillo aromático. Para aquellos que presentan dos o más anillos aromáticos empleamos compuestos polares Acetona y metanol.

Las proporciones se establecieron con la elusión del hidrocarburo a las relaciones de Hexano 100 %, Hexano-benceno 75:25, hexano- benceno 50:50, hexano-benceno 25:75 , benceno 100% , metanol-acetona 50:50. Durante el fraccionamiento se colectaron muestras de 20ml, donde cada una fue analizada para observar en que momento del fraccionamiento y con que relación se encuentra a su mayor concentración para los alifáticos, aromáticos y los compuestos polares al mismo tiempo de averiguar a que volumen de elusión estas fracciones ya no se presentan a determinada fracción.

Material y Equipo

Columna de vidrio de 10 cm de D. Interno x 25cm de Longitud

matraz balón de 250ml

soporte universal

pinzas para bureta

vaso de precipitados de 250 ml

campana de extracción

balanza granataría

mascarilla

guantes

Reactivos

Silica gel

sulfato de sodio anhidro

hexano

Benceno

metanol

acetona

n-pentano

- los reactivos empleados son grado RA

A-3 Metodología del fraccionamiento por columna empacada.

Primero se aislarán los compuestos de mayor peso molecular, que son los asfáltenos.

Se pesa 1 g de hidrocarburo en un vaso de precipitados de 50 ml, después se agregan 20 ml de n-pentano manteniéndolo en baño de hielo. Enseguida se observará el precipitar de los asfáltenos (ver figura 5.2). El contenido del vaso se agregará a un embudo buchner, teniendo cuidado que el precipitado quede en la parte central del embudo para evitar pérdidas en las paredes del mismo. A lo restante en el vaso, se le agregarán cantidades de 10 ml de n-pentano, con el fin de lavar el vaso.

El precipitado con todo y papel se coloca en una estufa a 30° C durante 24 h, con el fin de eliminar humedad, terminado este periodo se colocará en un desecador para su posterior pesada.

Con lo que respecta al filtrado, este se concentrará, evaporando el solvente a temperatura ambiente en la campana de extracción.

Para la separación de las siguientes fracciones se emplea la columna de vidrio, empacada con silica gel malla 60-200, previamente activada a 105 ° C durante 24 h. Tanto en la parte superior como en la inferior de la columna se colocará algodón y solo en la parte de arriba se colocará sulfato de sodio anhidro para eliminar el exceso de humedad.

Empacado de la columna.

- ❖ se coloca una cama de fibra de vidrio en la parte inferior de la columna
- ❖ inmediatamente después se agregan 10ml de hexano.
- ❖ enseguida se agrega poco a poco 7 g de la silica a la columna.
- ❖ finalmente se coloca otra capa de fibra de vidrio, además de 1g de Na_2SO_4 .

Fraccionamiento de hidrocarburos.

Adicionar 0.1g de hidrocarburo libre de asfáltenos a la columna, posteriormente adicionar volúmenes de 20 ml de hexano sin dejar secar la columna, hasta observar el corrimiento de sólo una mancha amarilla en el empacado (ver figura 5.3), entonces la separación de alifáticos de la muestra se habrá realizado. Los aromáticos se eluyen con benceno-hexano a una relación de 75:25 , en la misma columna en este caso el criterio para dar por terminada la separación será que el solvente recolectado fuese casi incoloro y finalmente los compuestos polares se extraen en la misma columna con una mezcla de disolventes acetona-metanol a una relación de 1:1 v/v.

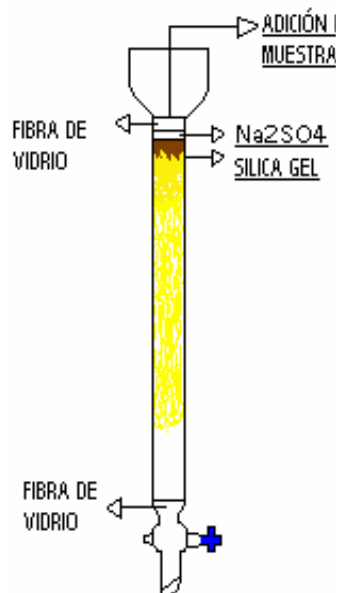
Las fracciones eluidas con los diferentes solventes se coleccionarán si es posible en un solo recipiente para cada fracción. Las fracciones se concentrarán a temperatura ambiente en la campana de extracción, finalmente la fracción de hidrocarburos separados se cuantifica por gravimetría . El contenido de cada fracción se referirá al total del extracto contenido en 0.1g de hidrocarburo inicial.

Notas:

1. El papel filtro tendrá que estar a peso constante.
2. Los recipientes para la recolección de cada fracción deberán estar a peso constante.
3. No dejar que la columna de fraccionamiento se seque.
4. Utilizar baño de enfriamiento en la filtración.
5. Manipular siempre todo el equipo de peso constante con guantes.



Figura A.2 Precipitación de asfáltenos



7

Figura A.3 Fraccionamiento de hidrocarburos

La correspondiente identificación de cada una de las fracciones obtenidas, se realizó en cromatografía de gases en un equipo Perkin-Elmer bajo las condiciones de operación mostradas en la tabla A.1.

Tabla A.1 Condiciones de operación para el cromatógrafo de gases

Parámetros	
Gas acarreador	Nitrógeno
Flujo	9 ml/min
Detector FID	270 °C
Temperatura del inyector	240 °C
Temperatura de la columna	150 °C 2-10 0/ min, 210°-0.3°/min, 250° - 14/min ; 15°/min, 280 ° C
Presión	3.44 bar
Volumen de inyección	1 µl

A-4 Aislamiento de la flora microbiana nativa, (Lagunes, E.S y Espinosa, E.I., 2004)

A-4.1 Bacterias

El aislamiento de bacterias se realizó con 5 muestras provenientes de la biopila, correspondientes a los días 15, 21, 30, 45 y 54.

A-4.1.1 Cuenta de bacterias.

Para aislar bacterias se utilizó agar nutritivo (Mikrobiologie) MERCK.

La cuenta de bacterias se hizo con el método de dilución y cuenta en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC), se pesó 1 g. del suelo, se diluyó en 9 ml de agua destilada estéril y se agitó con la ayuda de un vortex y se dejó reposar por un tiempo de dos horas.

De la suspensión obtenida, se realizaron una serie de diluciones sucesivas de 1ml de la muestra original en 9 ml de agua destilada estéril, cada dilución se agitó antes de realizar la siguiente.

Una vez que se obtuvieron las diluciones (10^{-1} - 10^{-6}), se tomaron 100ul (0.1 ml) de las soluciones 10^{-2} - 10^{-6} , los cuales se adicionaron a cajas Petri previamente

preparadas con el medio (agar nutritivo); de cada dilución se inocularon por triplicado. Los 100 ul son repartidos homogéneamente en la superficie del medio con una varilla de vidrio en forma de “L”, la cual se flamea y se deja enfriar entre cada placa. Este método se llama Plaqueo.

A-4.1.1.2 Medios de Cultivo

Medio de Rennie (Rennie 1987).

Para el medio de cultivo de Rennie completo, se preparan por separado dos soluciones (A y B), debido a que mezcladas se precipitan al esterilizarse. El tiempo de esterilización fue por 15 minutos por calor húmedo. Después de esterilizar se adiciona al medio de cultivo las vitaminas, estas se preparan y se esterilizan por filtración (0.2 u). Cuando se prepara medio líquido se elimina el agar de la preparación.

Tabla A.2 Solución A del medio de Rennie.

Reactivo	Concentración por litro
K_2HPO_4 Fosfato de potasio dibásico anhidro	0.80 g
KH_2PO_4 Fosfato de potasio monobásico	0.20 g
NaCl Cloruro de sodio	0.10 g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ Molibdato de sódio	0.025 g
$C_{10}H_{12}N_2O_8FeNa$ EDTA Acido tera acetico etinlendiamina	0.028 g
Extracto de Levadura	0.025 g
$HOCH_2(CHOH)_4CH_2OH$ Manitol	5.0 g
$C_{12}H_{22}O_{11}$ Sacarosa cristal	5.0 g
Lactato de sodio	0.5 ml
$(NH_4)_2SO_4$ Sulfato de amônio	.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	900 ml
Ph	7.0

Tabla A.3 Solución B del medio de Rennie

Reactivo	Concentración por litro
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ Sulfato de magnesio	0.2 g
$CaCl_2$ Cloruro de calcio dihidratado	0.06 g
Agua destilada	100 ml
Ph	7.0

Tabla A.4 Solución de Vitaminas para el medio de Rennie.

Reactivo	Concentración por litro
Biotina	5 µg
Ac. p-Aminobenzoico (PABA)	10 µg

Preparación del inóculo en medio líquido para las determinaciones posteriores

Activación de cepa

Cada una de las cepas se sembraron en placa con Agar nutritivo, se incubaron a 30 °C ± 1 °C por 72 horas.

Cultivo en medio mineral.

Se toma una asada de crecimiento de la placa y se siembra en 25 ml de medio de Rennie Completo líquido. Los matraces inoculados se incubaran a ± 30 °C, 150 rpm por 72 horas.

Determinación de hidrocarbonoclastas.

Para la prueba de hidrocarbonoclastas se toman 25 ml del medio de Rennie Modificado y se inoculan los matraces con 0.1 ml del medio de crecimiento previo de bacterias con Rennie Completo y se encuban a 30°C, 150 rpm y durante 72 horas.

Medio de Rennie Modificado.

El medio de cultivo de Rennie Modificado (RM), se preparó de la misma manera que el Rennie completo, pero las fuentes de carbono, manitol y sacarosa fueron sustituidas por la cantidad de 600 ppm de hidrocarburo.

La fuente de carbono para el Rennie modificado:

Reactivo	Concentración
Petróleo crudo	5000 ppm

La identificación morfológica de las bacterias degradadoras se desarrolla con las técnicas de fijación y tinción descritas por Ramírez, G, Mejía, C. 2000.

A.4.1.1.3 Determinación de biomasa por peso seco.

La determinación de biomasa por este método se realizó filtrando una muestra de cultivo en medio líquido por una membrana Millipore con una apertura de poro de 0.45µm en un equipo Millipore. Antes de emplear las membranas, estas se secaron en el horno a 50°C, y se mantuvieron en el desecador, para obtener el peso constante de ellas (peso inicial). Una vez pesadas se utilizaron para filtrar un volumen conocido de la muestra. Se deja secar la membrana a temperatura ambiente, y enseguida se secaba a 50°C y finalmente se mantuvieron en el desecador, para obtener a peso constante. De igual forma se realizó la metodología para ponerlos a peso constante.

$$\text{Biomasa (mg/L)} = \frac{\text{Peso final de la membrana} - \text{peso inicial de la membrana}}{\text{Volumen del filtrado}}$$

A.4.1.1.4 Extracción líquido-líquido para determinar el porcentaje de remoción de hidrocarburos.

Método Infrarrojo.

- 1) Se medirá el volumen total de la muestra. Si la muestra no fue acidificada en el momento del muestreo, se adicionará 0.5 ml de HCl (Acido Clorhídrico) (1:1). Se mezclará la muestra, y se deberá asegurar que al pH ≤ 2 , se adicionará más ácido si es necesario.
- 2) Se transferirá la muestra a un embudo de separación de 100 ml.
- 3) Se adicionará 3 ml de tetracloruro de carbono al frasco que contiene la muestra y se girará para enjuagar los lados del mismo. Se deberá transferir el disolvente al embudo de separación.
- 4) Se extraerá por agitación vigorosa durante 5 minutos. Se dejará en reposo para permitir la separación de las fases.
- 5) Se deberá filtrar la fase orgánica a través de un embudo de filtración que contenga papel filtro de poro medio previamente humedecido en tetracloruro de carbono a un matraz volumétrico de 10 ml.

- 6) El equilibrio en una emulsión que tarda en separarse, se podrá romper agregando alrededor de 1gr de sulfato de sodio anhidro en el cono del papel filtro y se deberá drenar lentamente la emulsión a través de la sal de sulfato de sodio. Si se requiere, se podrá agregar una porción adicional de 1gr del sulfato de sodio anhidro al cono.
- 7) Se deberá repetir dos veces más con porciones de 3 ml de disolvente nuevo, combinando los tres extractos orgánicos dentro del mismo matraz volumétrico.
- 8) Se enjuagará el papel filtro, el embudo y el extremo del embudo de separación con un total de 1 ml de tetracloruro de carbono, se colectará el disolvente de lavado en el matraz volumétrico del inciso anterior. Se aforará a 100 ml con tetracloruro de carbono.
- 9) Se deberá desechar alrededor de 0.5 ml a 1.0 ml de disolución de matraz volumétrico. Adicionar 0.3 g de sílica gel y una barra de agitación, tapar el matraz volumétrico y agitar la disolución por un mínimo de 5 minutos con ayuda de un agitador magnético.
- 10) Se seleccionarán los estándares de trabajo y las celdas apropiadas de acuerdo con los intervalos de concentración que se espera en las muestras. No será necesaria la adición de sílica gel a los estándares. Se debe leer la absorbancia directamente de cada disolución estándar en 2930 cm^{-1} . Se realizará una curva de calibración de absorbancia contra concentración en mg/l de hidrocarburos totales del petróleo, usando tetracloruro de carbono como referencia.
- 11) Aproximación de intervalos de concentración mg/l de los estándares de trabajo con respecto a la celda óptica utilizada.

Tabla A.5 Parámetros de trabajo concentración vs paso óptico de luz

Paso óptico de luz	Intervalo de concentración
10 mm	60-500 mg/l
50 mm	10-90 mg/l
100 mm	5-40 mg/l

- 12) Después de que la sílica gel se ha asentado en la muestra extraída, se filtrará el extracto y llenar una celda con el extracto y se deberá leer la absorbancia de la extracción. Si la absorbancia excede los límites máximos de la curva, se preparará una dilución apropiada.

- 13) Si la capacidad adsorbente de la silica gel se hubiera excedido, se podrá probar en este punto por medio de la adición de otros 0.3 gr de sílica al extracto y la repetición del tratamiento y determinación.

5.2.3.2 Hongos.

La toma de muestra para hongos es única en el día 51, que fue en el momento en que se presentaron; a estos microorganismos se determinarán cuales son hidrocarbonoclastas es decir; aquellos que tienen la capacidad de degradar hidrocarburos.

A.2. Aislamiento de hongos.

Una forma de conocer la microflora presente en el suelo degradado, es tomar una porción de los hongos presentes al final de la remoción de hidrocarburos y sembrarla en un medio del cultivo para hongos y levaduras (Agar maltosa Sabouraud.).

Se suspenden 65 g del polvo en 1 l de agua purificada, se mezcla y calienta gradualmente sin hervir, hasta alcanzar una apariencia traslucida del medio. Enseguida se esteriliza el medio en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Evitar calentar demasiado ya que podría resultar en un medio más blando.

Se deja enfriar hasta donde sea manipulable el medio, destape la botella de agar, flaméele la boca con un mechero bunsen, empleando una campana de flujo laminar vierta en cajas petri de 15 a 20 ml por caja, cubra la caja y deje enfriar durante 15 ó 20 minutos para que el agar solidifique adecuadamente.

Para la inoculación en cajas petri se toma la muestra de hongos resultantes de la remoción de hidrocarburos se introduce el asa estéril en la muestra para la toma de una pequeña cantidad de microorganismos, la caja se mantiene entreabierta con la tapa inclinada con la finalidad de proteger la superficie de la contaminación durante cada paso de la operación de sembrado.

Para inocular se dibuja con el asa estéril una serie de líneas estriadas sobre la superficie del agar. En general, se trata de que la mayoría de los microorganismos que están adheridos al asa se depositen en el agar durante el trazado de las primeras líneas y luego seguir estriando sin que se crucen las líneas. Al término del trazado se etiquetan las cajas con su nombre y número de experimento, Después se incuban a una temperatura de 30°C en posición invertida¹ durante un período de 24 a 48 horas.

Al término de las 48 horas de incubación se identifican las diferentes colonias para su separación e inoculación en el medio Sabouraud y Czapek. Empleando la misma metodología de siembra anteriormente descrita.

A.2.1 Medio de cultivo

Medio mineral CP-HDH

(Celulosa Agar modificado)

Hongos degradadores de hidrocarburos

(Eggins y Pugh 1962 cit. Jonson y Curl, 1972 modificado por Ferrera-Cerrato, 1998)

(Rennie, 1981; Garcia-Gallegos, 1999; Hernández et al. 2002; Rivera Cruz., et al. 2002)

Tabla A.6. Reactivos para la preparación del medio mineral.

Reactivo	Cantidad
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.5 g
KCL	0.2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.2 g
CaCL ₂ .2H ₂ O	0.1 g
Colorante rosa de bengala	0.035 g
Estreptomina*	40 mg
Agua destilada	1000 ml

¹ Se acostumbra incubar siempre las cajas petri en posición invertida para evitar que el agua que se condensa en el interior de la cubierta gotee sobre la superficie de crecimiento, donde la condensación puede dispersar y mezclar los organismos haciendo imposible el aislamiento de colonias puras.

- Se agrega después de haber esterilizado el medio de cultivo (se prepara una solución stock y se esteriliza por filtración) se ajusta el pH del medio a 6.
- Para realizar la prueba en medio sólido se agrega 20 g de Agar como parte de la lista de reactivos. La cantidad de hidrocarburo como fuente de carbono (petróleo crudo) es la que se absorba en un papel filtro #42 de 2 cm².

Tabla A.7 Reactivos para la preparación del rosa de bengala.

Reactivo	Cantidad
CaCL.H ₂ O	0.3 g
Solución acuosa de Fenol al 5%	100 ml
Eritrosina	1.0 g

A.2.2 Prueba para hidrocarbonoclastas

➤ MATERIAL

Puntas estériles de 1ml

Micropipeta de 1ml

Mechero Bunsent

Campana para siembra

Filtro para esterilizar con apertura de poro de 0.2μ y membrana de acetato de celulosa

Jeringa estéril de 10 ml

Frascos estériles de 10 ml

Matraz estéril Erlen Meyer de 125 ml

Probeta estéril de 10 ml.

Embase Schott de 1000 ml

Hexano

Benzal

Gasa con algodón

➤ **METODOLOGÍA.**

- ✚ Realizar previo aislamiento de los posibles degradadores (bacterias y hongos).
- ✚ Preparar una solución a concentración conocida de hidrocarburos empleando hexano como solvente.
- ✚ Esterilizar por filtración la solución de hidrocarburo y depositarlo en un frasco estéril.
- ✚ Diluir la estreptomicina, esterilizarla por filtración y depositarlo en un frasco estéril.
- ✚ Reunir la solución A y B del medio mineral para bacterias y depositarlo en el embase Schott.
- ✚ Agregar la estreptomicina estéril al medio mineral para hongos.
- ✚ Medir y añadir 0.25ml de la solución de hidrocarburo al matraz Erlen Meyer y dejar que se volatilice el solvente dentro de la campana.
- ✚ Agregar un volumen de 10 ml de cada medio mineral en el matraz Erlen meyer de 125 ml.
- ✚ Tomar de cada frasco de bacterias aisladas un volumen de 1 ml y agregarlos directamente al matraz Erlen Meyer (hacer uso del mechero).
- ✚ Para hongos se toma con su respectiva asa la mayor cantidad de miselio posible para asegurar la transición de un medio a otro, quemar muy bien el asa cada vez que se haga cambio de sepa, agregar directamente, y no flamear el matraz.
- ✚ Ambos matraces se dejan a incubación durante 10 días a 30°C y 135 rpm.

A.2.2.1 Identificación morfológica.

Microcultivo:

Materiales

- Sepas aisladas puras
- Portaobjetos
- Cubre objetos

- Cajas Petri
- Bisturí estéril
- Papel filtro
- Triángulo de vidrio
- Puntas para micropipeta (10 ml) estériles
- Asa para siembra de hongos
- Agar Saboreaud
- Solución estéril de glicerina al 40%

MÉTODO

- 1.- En zona aséptica, con el bisturí estéril, cortar el agar-Sabouraud en cuadros de aproximadamente 1.5 cm².
- 2.- Colocar en el centro de los portaobjetos contenidos en la caja de petri, un cuadrado de agar-sabouraud .
- 3.- Con el asa micológica (o con el asa bacteriológica recta, inocular cada uno de los lados del cuadrado.
- 4.- Con ayuda de unas pinzas flameadas, colocar sobre esta preparación el segundo portaobjetos estéril.
- 5.- Para mantener la humedad, agregar 10 ml de la solución estéril de glicerina al 40% teniendo cuidado de saturar el papel filtro, evitando que se inunde para que el líquido no toque el cultivo.
- 6.- Incubar durante 7 días a 30 °C
- 7.- En condiciones de asepsia, sacar los portaobjetos de la caja.
- 8.-Observar el desarrollo del hongo que se presenta alrededor de los cuadros de agar.
- 9.-Separar cuidadosamente los cubre objetos tratando de no dañar el desarrollo del hongo el que debe quedar adherido a este.
- 10.-Retirar el agar, y colocar los cuadros de agar sobre un papel, envolverlos y llevarlos a esterilizar.
- 11.-Fijar las preparaciones, agregando de 2 a 3 gotas de azul- algodón entre el cubre objetos que lleva impregnado el hongo y un nuevo porta objetos.
- 13.-Observar bajo microscopio usando los objetivos de 10X, 40X y hacer la descripción correspondiente.

A-3 Determinación de pH

El pH se determinó en una suspensión de Suelo:Agua destilada 1:2 w/w

Reactivos

- Agua destilada

Equipos

- Potenciómetro
- Vasos de precipitado de 100 ml
- Varillas de vidrio o plástico

Procedimiento:

El valor de pH se mide con un potenciómetro previamente calibrado.

Se toman 30 g de suelo, se le agregan 60g (60ml) de agua destilada, se agita y se deja reposar durante 30 minutos y se hace la lectura, directamente sobre la suspensión.

A-4 Determinación del contenido de humedad (Chapman, H.D. 1979)

La humedad se determinó por triplicado usando el método gravimétrico.

Materiales y Equipos:

- Estufa
- Balanza analítica
- Cajas petri o papel aluminio puestos a peso constante.

Procedimiento:

1. Pesar 20 g de suelo muestra en la balanza analítica, en una caja petri o papel aluminio puestos previamente a peso constante.

2. Colocar el suelo en la estufa a una temperatura de 30-40° C durante 24 horas.
3. Sacar la muestra de la estufa, colocarla en el desecador y pesar, repetir el paso anterior, hasta que el peso sea constante.

Cálculos: la humedad se expresa en por ciento y se obtiene de restar al peso del suelo húmedo, el peso del suelo seco, dividir entre los gramos de muestra y multiplicar por 100, la expresión que se utiliza es la siguiente:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{\text{peso del suelo húmedo} - \text{peso del suelo seco}}{\text{g de muestra humeda}} \times 100$$

A-5 Densidad aparente.(Domínguez,S.F.,1996)

El suelo presenta huecos ocupados por aire y agua, los cuales equivalen del 30 al 60 % de su volumen total. Los suelos desecados y húmedos presentan densidades aparentes diferentes.

La densidad aparente se refiere a la cantidad de masa de sólidos que existe por unidad de volumen total de suelo; se determinó mediante el método de la probeta (Gandoy, 1991).

- Pesar 40 g de suelo secado a la estufa.
- Vaciar en una probeta de plástico de 50 ml y cerrarla con un tapón de hule.
- Golpear la probeta en trayectoria vertical sobre una franela, 30 veces aprox. Para permitir el asentamiento del suelo.
- Al concluir la serie de golpes, leer el volumen final que ocupa el suelo.
- La densidad aparente equivale al volumen ocupado por los 40 g de suelo con respecto a los 50 ml de la probeta.
- En técnicas que permitan la determinación del volumen ocupado por el agua y el aire, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\rho_b = (M_s/V_t) = M_s/(V_s+V_a+V_w)$$

ρ_b = Densidad aparente, g/cm³

M_s = Masa del suelo, g

V_t = Volumen total, cm³

V_s = Volumen del suelo, cm³

V_a = Volumen de aire, cm³

V_w = Volumen de agua, cm³

ρ_s = Densidad real g/ cm³

A-6 Porosidad.

La porosidad puede calcularse al conocer la densidad real y la densidad aparente del suelo mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porosidad (\%)} = [1 - (\rho_b / \rho_s)] \times 100$$

A-7 Determinación de la capacidad de retención de agua Nielsen, et al 1959.

Material y equipo

- Soporte universal
 - Anillo de fierro
 - Embudo de filtración
 - Bureta cap. 30ml
 - Pinzas para bureta
 - Vasos de precipitados
 - Fibra de vidrio
 - Balanza analítica
 - Espátula
 - Papel filtro

Reactivos.

- Solución de tergitol al 0.5%

Procedimiento.

- En un soporte universal, colocar un anillo de fierro y sobre éste el embudo de filtración. Colocar por debajo del filtro un vaso de precipitados.
- Dentro del embudo colocar un papel filtro y una cama de fibra de vidrio, agregar 10 g de suelo seco.
- Adicionar poco a poco la solución de tergitol al 0.5%, hasta observar la caída de la primera gota de solución por la parte inferior del embudo.
- Extraer el exceso de agua por filtración con vacío, o en su defecto, dejar reposar el embudo con suelo hasta que deje de escurrir la solución.
- Tomar el peso final del embudo con suelo y determinar mediante la diferencia de pesos la capacidad de retención de agua del suelo.

Cálculos

$$\% \text{ CRA} = \frac{(\text{peso final del embudo} + \text{suelo})\text{g} - (\text{peso inicial del embudo} + \text{suelo})\text{g} \times 100}{\text{g de muestra}}$$

A-8 Determinación del carbón orgánico total (Amato, M. 1983)

El contenido de carbono se determinó por triplicado en muestras de suelo de 1g. La concentración de carbono se determinó por el método de óxido-reducción con permanganato de potasio.

Materiales y equipo

- Autoclave
- Balanza analítica
- 2 matraces volumétricos de 1000ml
- 7 matraces erlenmeyer de 125ml
- 6 vasos de precipitados de 100ml
- Bureta de 30ml

- Soporte universal
- Pinzas para bureta

Reactivos

- Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)
- Sulfato ferroso amoniacal $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$
- Indicador ortofeneantrolina
- Ácido sulfúrico concentrado
- Ácido fosfórico concentrado
- Agua destilada

Preparación de soluciones:

1. Solución de dicromato de potasio 0.4 Normal: Pesar 30g de $K_2Cr_2O_7$ (previamente seco a 150 °C, durante 3 horas), disolver en agua destilada y aforar a 1 litro.
2. Solución de sulfato ferroso amoniacal 0.1 Normal. Pesar 78 g de $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$, disolver en agua destilada y aforar a un litro.
3. Mezcla de H_2SO_4 - H_3PO_4 - H_2O : se adicionan los reactivos en una relación de 2:1:2, agregando primero el agua y después los ácidos.

Procedimiento:

1. Pesar por duplicado 30, 50 y 75mg de suelo muestra. Colocar las muestras en los matraces erlenmeyer.
2. Agregar 10ml de solución de dicromato de potasio 0.4 N y 20ml de la mezcla de H_2SO_4 - H_3PO_4 - H_2O . Colocar los vasos de precipitados a manera de tapón a los matraces y esterilizar a 120 °C durante 45 min.
3. Al terminar la esterilización, dejar enfriar y titular la solución obtenida con sulfato ferrosos amoniacal 0.1 N, usando 2 gotas de ortofenantrolina como indicador.

Nota: La solución de sulfato ferroso amoniacal se debe titular con dicromato de potasio, siempre que se haga un análisis ya que su normalidad varía con el tiempo. Los mililitros empleados en la titulación, se toman como referencia en los cálculos del carbono orgánico del suelo, ya que el método se basa en titular el

exceso de dicromato de potasio agregado para que se lleve a cabo la oxidación del carbono orgánico.

Cálculos

a) Determinación de la normalidad del sulfato ferroso amoniacal.

$$N_{sfa} = \frac{\text{ml K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times \text{Normalidad del K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7}{\text{ml de sfa gastados}}$$

Sfa = sulfato ferroso amoniacal

b) Determinación del Carbono Orgánico Total:

$$C_{org} = \frac{(\text{ml de sfa en la titulación} - \text{ml de sfa en la tit. de la muestra}) \times N_{sfa} \times 1.2}{N \text{ del dicromato de potasio} \times \text{mg de muestra}}$$

Corg [=] mg C/mg de suelo

A-9 Determinación de fósforo asimilable

Para extraer el fósforo asimilable se usó el método de Burriel y Hernando; para desarrollar el color en las muestras se utilizó el método del ácido ascórbico.

Materiales y equipo

- ◆ Espectrofotómetro
- ◆ Balanza
- ◆ Potenciómetro
- ◆ 4 embudos
- ◆ 4 matraces erlenmeyer
- ◆ Tapones de plástico
- ◆ 2 matraces volumétricos de 1000ml, 2 de 500ml y 2 de 250ml.
- ◆ 8 matraces volumétricos de 25ml
- ◆ Un matraz volumétrico de 100ml y uno de 50ml.
- ◆ Vasos de precipitados de 500 y 50ml.

- ◆ Pipetas de 1, 5 y 10ml.
- ◆ Tubos con rosca (29-30ml)

Reactivos

- ◆ Sulfito de sodio
- ◆ Ácido sulfúrico H_2SO_4
- ◆ Carbonato de calcio $CaCO_3$
- ◆ Carbonato de magnesio $MgCO_3$
- ◆ Ácido acético al 98% CH_3COOH
- ◆ Fosfato dibásico de potasio KH_2PO_4
- ◆ Tartrato de antimonio y potasio $(K(SbO)C_4H_4O_6 \cdot \frac{1}{2} H_2O)$
- ◆ Molibdato de amonio $((NH_4)_6MO_7O_{24} \cdot 4 H_2O)$
- ◆ Ácido ascórbico
- ◆ Indicador de fenolftaleína

Preparación de soluciones:

a) Solución extractora:

1. Pesar 1 g de carbonato de calcio y .88 g de carbonato de magnesio, se pasan aun vaso de 500ml.
2. Se añaden al vaso 400 ml de agua destilada, 1 ml de ácido sulfúrico y 24.5 ml de ácido acético al 98%.
3. Se pasa la solución a un recipiente de 1 litro y se afora a dicho volumen. Una vez agitada la solución debe tener un pH de 3.2-3.3.

b) Reactivo combinado para el desarrollo del color

El método del ácido ascórbico para el desarrollo del color, es útil para análisis del rango de 0.01 a 6ppm de fósforo.

- *Soluciones:*

- a) *Ácido sulfúrico 5 N.*- Diluir 70 ml de H₂SO₄ concentrado a 500 ml con agua destilada.
- b) *Solución de tartrato de antimonio y potasio.*- Disolver 1.3715 g de tartrato de antimonio y potasio en 400 ml de agua destilada, aforar a 500ml.
- c) *Solución de molibdato de amonio.*- Disolver 20 g de molibdato de amonio en 500 ml de agua destilada.
- d) *Solución de ácido ascórbico.*- Disolver 1.76g de ácido ascórbico en 100 ml de agua destilada. Nota: La solución es estable durante 1 semana, aproximadamente a 4 °C.

- *Preparación del reactivo combinado:*

- Para preparar 100 ml de reactivo, mezclar los reactivos anteriores en las proporciones siguientes:
 - ◆ 50 ml de ácido sulfúrico 5 N.
 - ◆ 5 ml de tartrato de antimonio y potasio
 - ◆ 15 ml de solución de molibdato de amonio
 - ◆ 30 ml de solución de ácido ascórbico.

Nota: Déjese que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente antes de mezclarlos y sígase el orden citado. Si apareciera turbidez en el reactivo combinado, agitar y dejar reposar hasta que desaparezca, antes de continuar. El reactivo es estable durante 4 horas.

Procedimiento

a) Extracción del fósforo asimilable:

1. Se pesa por triplicado 3 g de suelo y se coloca en un matraz erlenmeyer de 125 ml.
2. Se añaden 100 ml de solución extractora, se coloca a cada matraz un tapón de hule y se agita durante 5 minutos.

3. Se filtra con papel filtro watman 45, se toman 25 ml del filtrado y se colocan en un tubo con rosca.

b) Determinación del fósforo presente en el extracto:

- *Tratamiento de la muestra:* 25 ml de muestra se colocan en un erlenmeyer de 125 ml, agregar 0.05 ml de indicador fenolftaleína. Si aparece color rosa, acidificar con solución de ácido sulfúrico 5 N gota a gota, hasta que la coloración desaparezca.
- *Desarrollo del color:* Añadir 4 ml del reactivo combinado y mezclar bien. Leer la absorbancia a 880 nm, al cabo de 10 minutos, pero antes de 30 minutos. Preparar un blanco de reactivos como referencia (solución extractora más reactivo combinado). El blanco de reactivo sirve para ajustar a cero la absorbancia y evitar interferencias en las lecturas.

Preparación de la curva de calibración de fósforo.

- Disolver 0.2195 g de KH_2PO_4 en 500 ml de agua destilada y aforar a 1 litro. La solución resultante contiene 50ppm de fósforo.
- Se toman 7 matraces volumétricos de 25 ml y se añaden a cada uno de ellos 0, 0.05, 0.125, 0.2, 0.25, 0.375 y 0.5ml respectivamente de la solución patrón.
- Agregar a cada matraz 4 ml del reactivo combinado, agitar y leer la absorbancia a 880 nm después de 10 minutos pero antes de 30 minutos. El blanco de 0 ppm de fósforo sirve para ajustar la absorbancia a cero y evitar interferencias.
- Con los datos de absorbancia obtenidos trazar una gráfica que represente la absorbancia de las soluciones en el eje de las ordenadas y la concentración de cada una de ellas en el eje de las abscisas.

Cálculos:

$$\text{mg P/L} = \frac{\text{mg P(en vol final de 29 ml aprox.)}}{\text{ml de muestra}}$$

A-10 Determinación del nitrógeno total (A.O.A.C., 42.014.1970).

Material y equipo:

- ✓ Unidad de digestión microkjeldahl
- ✓ Unidad de destilación microkjeldahl
- ✓ Balanza
- ✓ 3 matraces volumétricos de 1000ml
- ✓ Bureta de 25 o 30 ml
- ✓ 2 matraces erlenmeyer de 125 ml
- ✓ Pipetas volumétricas
- ✓ Probeta de 500 ml

Reactivos:

- ✓ Ácido sulfúrico concentrado
- ✓ Ácido clorhídrico
- ✓ Sulfato de cobre (Cu_2SO_4)
- ✓ Sulfato de potasio (K_2SO_4)
- ✓ Hidróxido de sodio NaOH
- ✓ Tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)
- ✓ Agua destilada
- ✓ Borato de sodio (Na_2BO_3)
- ✓ Indicador rojo de metilo

Preparación de reactivos.

1. Catalizador ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 + \text{K}_2\text{SO}_4$).- Pesar 50 g de sulfato de potasio, adicionar 2 g de sulfato de cobre y mezclar en un molino de bolas hasta obtener un polvo completamente homogéneo.
2. Solución de NaOH al 60%. - $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 5%. - Disolver completamente 600g de NaOH en aproximadamente 600 ml de agua destilada, en seguida disolver 50 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ y aforar a 1000ml.

3. HCl 0.01 N.- tomar 1 ml de HCl de 37.0% de pureza y diluirlo en agua destilada, aforar a 1 litro. Normalizar con Na₂BO₃ utilizando rojo de metilo como indicador.
4. Solución indicadora de rojo de metilo: pesar 1 g de rojo de metilo,. se disuelve en 100ml de alcohol etílico y se lleva a un pH = 4.5.

Procedimiento

1. Pesar de 500 mg de muestra e un matraz microkjeldahl, adicionar 2 gr de mezcla catalizadora y 4-5 ml de H₂SO₄.
2. Digerir la muestra en el equipo de digestión con extractor de vapores, hasta que clarifique, o se torne de un color amarillo paja, manteniendo el calentamiento de 1.5-2 horas y dejar enfriar.
3. Lavar el residuo en poca cantidad de agua destilada y transferir al tubo del destilador lavando el matraz de 2-3 veces con agua destilada.
4. En un matraz erlenmeyer colocar 5 ml de la solución de H₃BO₃ al 5% con 2 gotas de indicador en la terminal del condensado, cuidando que ésta quede dentro de la solución.
5. El tubo con muestra se coloca en el destilador y se adicionan 10 ml de solución de NaOH-Na₂S₂O₃.
6. Se inicia la destilación por arrastre de vapor, colectando aproximadamente de 75-100ml de destilado.
7. El destilado se titula con HCl al 0.01 N hasta que vire el color del indicador de verde a violeta.

Nota: para cada determinación se utiliza un blanco de reactivo siguiendo el mismo procedimiento.

Cálculos:

El nitrógeno en por ciento se calcula con la siguiente fórmula:

$$N \text{ en } \% = \frac{(V2-V1) \times 14.004 \times N \times 100}{M}$$

Donde:

V2 = ml de HCl usados para titular la muestra.

V1 = ml de HCL usados para titular el blanco.

N = normalidad del HCl

M = masa de la muestra en mg

A-11 Fijación y tinción de la muestra técnica descrita por Ramirez, G, Mejía, C.2000.

Material

- Mechero
- Asa y porta asa
- Porta objetos
- Cultivos de microorganismos

Método

1. Colocar las gradillas, cajas, porta objetos y todo lo necesario, sin movimientos bruscos a fin de evitar accidentes o contaminación de los cultivos.
2. Lavar los porta objetos meticulosamente con agua y jabón, enjuagar varias veces con alcohol al 95%, ponerlos a secar y flamearlos 2 ó 3 veces.
3. En los porta objetos limpios y desengrasados colocar la muestra del microorganismo a estudiar.
4. Esterilizar el asa en la flama del mechero, colocándola ligeramente inclinada hasta que el extremo esté al rojo vivo y después de manera vertical, hasta lograr que todo el alambre se ponga al rojo vivo, posteriormente flamear el vástago.

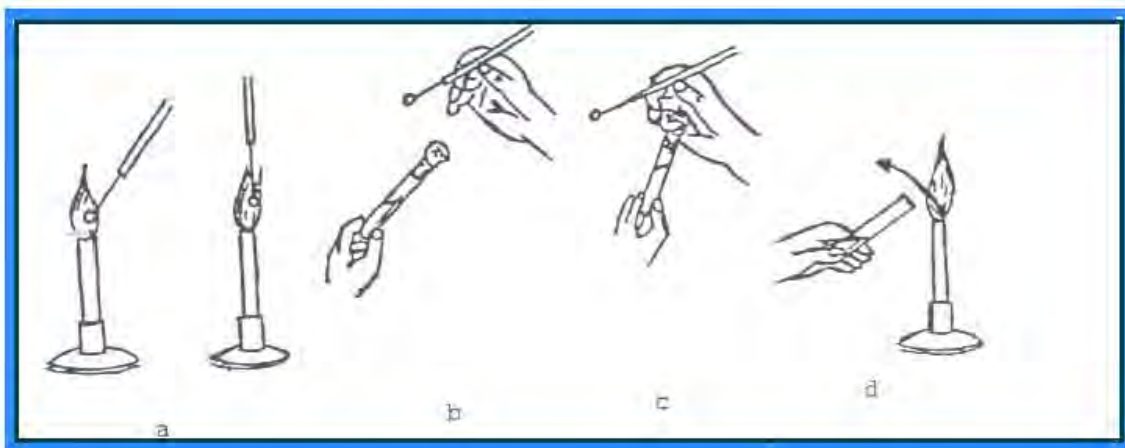


Figura A-4 Método de fijación y tinción paso del 1° al 5°

5. Tomar el tubo de la muestra por su extremo inferior con la mano izquierda. Para destaparlo, sujetar la torunda de algodón entre el meñique y la palma de la mano derecha, (que sostiene el asa o pipeta ya estéril) girar el tubo hasta que salga la torunda, flamear la boca del tubo manteniéndola cerca de la flama del mechero.

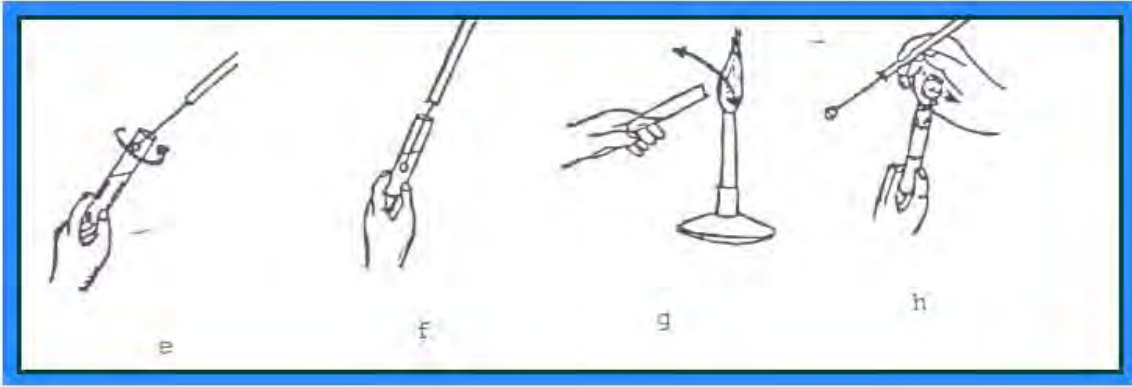


Figura A-5 Método de fijación y tinción paso del 6° al 9°

6. Introducir el asa en el tubo, apoyarla en la pared interna hasta que se enfríe, proceder a tomar una asada del cultivo y sacarla del tubo.
7. Flamear la boca del tubo, taparlo y colocarlo en la gradilla.

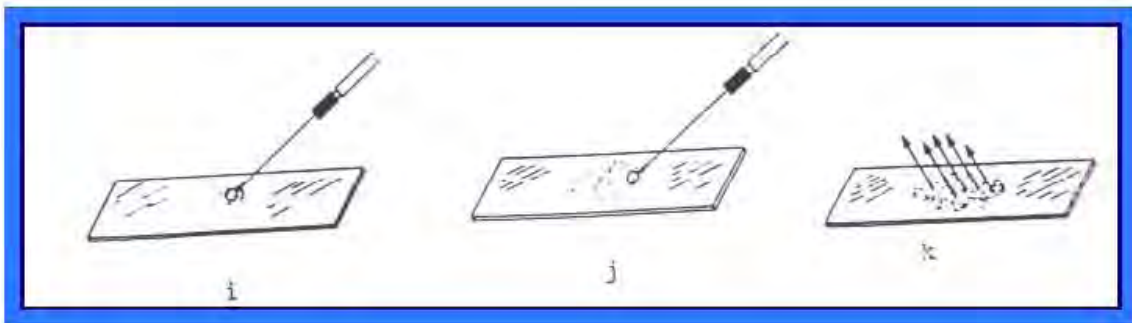


Figura A-6 Método de fijación y tinción paso del 10° al 12^{do}.

8. Aplicar el asa al portaobjetos marcado y extender la muestra en la zona central. Si el cultivo está en medio sólido, colocar antes una gota de agua destilada en el centro del porta objetos y suspender en ella la asada del cultivo.
9. Esterilizar el asa

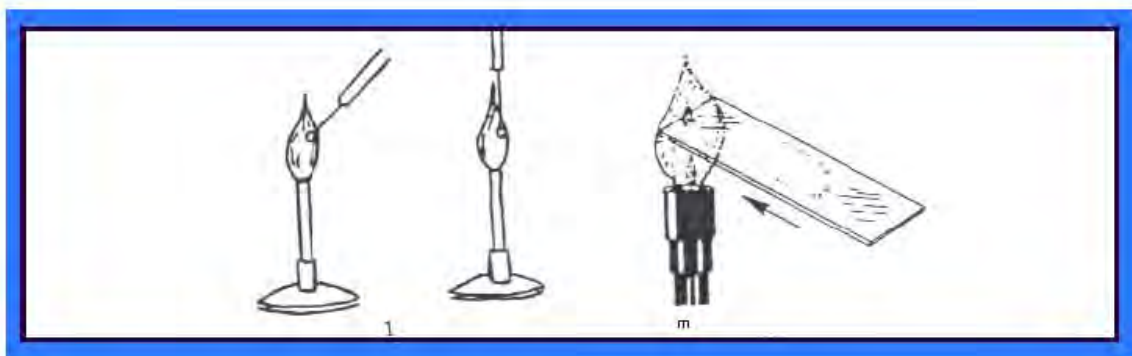


Figura A-7 Método de fijación y tinción paso del 13^{to} al 15^{qto}.

10. Dejar secar al aire el frote y fijarlo a la flama, pasándolo 4 ó 5 veces sobre ella.
11. El frote esta listo para teñir.

Tinción de Gram

La técnica consiste en aplicar cuatro reactivos:

- El cristal violeta, es el colorante primario y el primer reactivo de la serie e imparte su color a todos los microorganismos del frote.

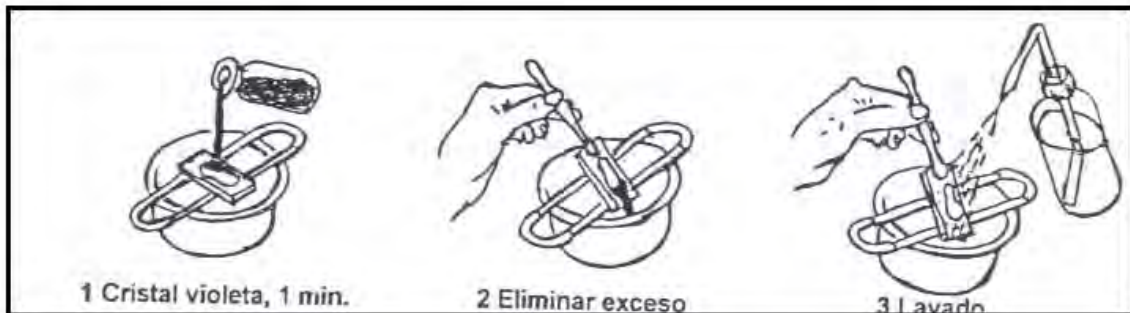


Figura A-8 Técnica de Tinción de Gram 1º al 3º paso

- El segundo reactivo es una solución de yodo, denominada yodo de Gram o Lugol, que actúa como mordente (aumenta o refuerza la unión entre el colorante y el sustrato, formando un complejo cristal violeta-yodo-ribonucleato de magnesio).



Figura A-9 Técnica de Tinción de Gram 4º al 6º paso.

- El tercer reactivo es una mezcla de alcohol-cetona, que actúa como decolorante, disolviendo y arrastrando fuera de las células al colorante primario.

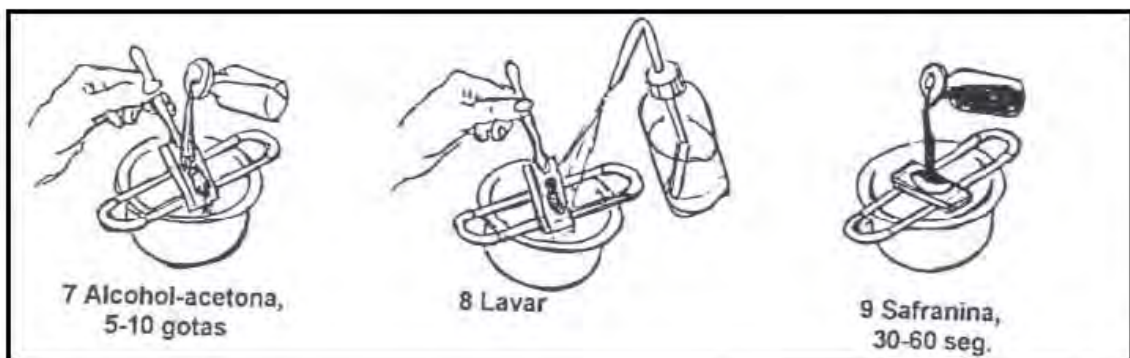


Figura A-10 Técnica de Tinción de Gram 7º al 9º paso.

- El cuarto reactivo, es la safranina o colorante de contraste e imparte el color sólo a las bacterias que durante la decoloración perdieron al colorante primario.

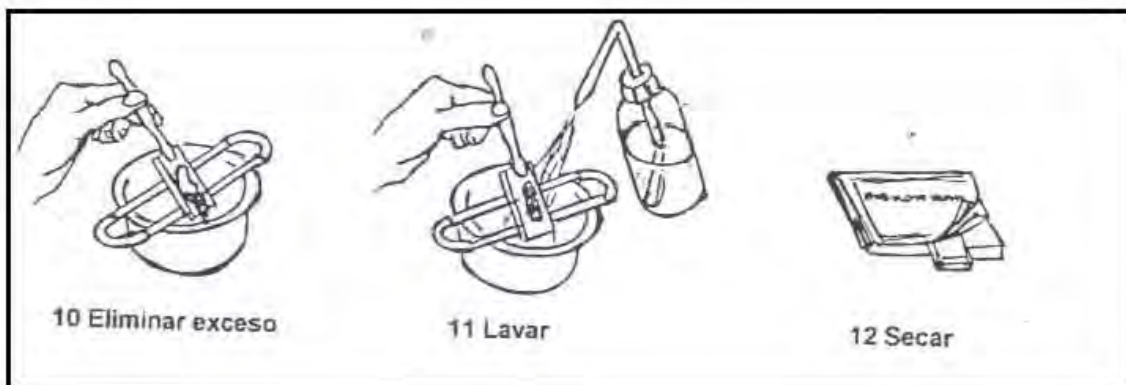


Figura A-11 Técnica de Tinción de Gram 10° al 12^{do} paso.