

EVALUACIÓN DE LA BIOESTIMULACIÓN (NUTRIENTES) EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS UTILIZANDO RESPIROMETRÍA

Evaluation of Biostimulation (Nutrients) in Hydrocarbons Contaminated Soils by Respirometry

ERIKA GARCÍA¹, Microbióloga; FABIO ROLDÁN^{1,*}, Ph. D.;
LAURA GARZÓN¹, Microbióloga.

¹Unidad de Saneamiento y Biotecnología Ambiental - USBA,
Departamento de Biología, Pontificia Universidad Javeriana,
Carrera 7 # 43-82, Ed. 54. Laboratorio 314B. Bogotá, D.C., Colombia.

* Profesor Asociado, fabio.roldan@javeriana.edu.co,
Teléfono: (57 1) 320 83 20, ext. 4169.

Presentado 28 de noviembre de 2009, aceptado 23 de abril de 2010, correcciones 15 de marzo de 2011.

RESUMEN

Se evaluó el proceso de bioestimulación por nutrientes utilizando fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC) N:P:K 28:12:7 y sales inorgánicas simples (SIS) NH_4NO_3 y K_2HPO_4 en suelos contaminados con hidrocarburos utilizando respirometría. El suelo fue contaminado con lodos aceitosos a una concentración 40.000 mgTPH/kg_{ps}. Para cuantificar el consumo de oxígeno se utilizaron dos respirómetros de medición manométrica HACH® 2173b y OXITOP® PF600 durante ensayos de 13 días (n=3). Se evaluaron dos tratamientos (FIC y SIS) y tres controles (abiótico, sustrato de referencia y sin nutrientes). Se analizaron parámetros físico-químicos (pH, nutrientes y TPH) y microbiológicos (heterótrofos y degradadores) al inicio y al final de cada ensayo. SIS y el control sin nutrientes presentaron las mayores tasas de respiración, en el equipo HACH se obtuvieron valores de 802,28 y 850,72 mgO₂kg_{ps}⁻¹d⁻¹ respectivamente, y en OXITOP fueron de 936,65 y 502,05 mgO₂kg_{ps}⁻¹d⁻¹, respectivamente, indicando que los nutrientes de SIS estimularon el metabolismo microbiano. Por otro lado, FIC presentó los recuentos y tasas de respiración más bajas (188,18 y 139,87 mgO₂kg_{ps}⁻¹d⁻¹ en HACH y OXITOP, respectivamente), esto pudo estar relacionado a un efecto inhibitorio generado por la acumulación de amoníaco, limitando el crecimiento de la población degradadora.

Palabras clave: bioestimulación, hidrocarburos, bacterias degradadoras de hidrocarburos, respirometría, tasas de respiración.

ABSTRACT

The biostimulation process was evaluated in a hydrocarbon contaminated soil by respirometry after amendment with inorganic compound fertilizer (ICF) (N:P:K 28:12:7) and simple inorganic salts (SIS) (NH_4NO_3 and K_2HPO_4). The soil was contaminated with oily sludge (40,000 mgTPH/kg_{dw}). The oxygen uptake was measured using two

respirometers (HACH® 2173b and OXITOP® PF600) during thirteen days (n=3). Two treatments (ICF and SIS) and three controls (abiotic, reference substance and without nutrients) were evaluated during the study. Physicochemical (pH, nutrients, and TPH) and microbiological analysis (heterotrophic and hydrocarbon-utilizing microorganisms) were obtained at the beginning and at the end of each assay. Higher respiration rates were recorded in SIS and without nutrient control. Results were 802.28 and 850.72 mgO₂kg_{ps}⁻¹d⁻¹ in HACH, while in OXITOP were 936.65 and 502.05 mgO₂kg_{ps}⁻¹d⁻¹, respectively. These data indicate that amendment of nutrients stimulated microbial metabolism. ICF had lower respiration rates (188.18 and 139.87 mgO₂kg_{ps}⁻¹d⁻¹ in HACH and OXITOP, respectively) as well as counts, this could be attributed to ammonia toxicity.

Key words: biostimulation, hydrocarbons, hydrocarbon-utilizing microorganisms, respirometry, respiration rates.

INTRODUCCIÓN

La industria del petróleo no sólo representa una fuente de ingresos importante para la economía del país sino también un área en desarrollo. Sin embargo, es considerada como una de los principales contaminantes del ambiente debido a los residuos generados durante procesos de extracción, almacenamiento, transporte y refinamiento del crudo; residuos que según la agencia ambiental de Estados Unidos (EPA, del inglés, *Environmental Protection Agency*) se clasifican como peligrosos debido a que algunos compuestos tienen propiedades carcinogénicas y mutagénicas, que pueden afectar la vida de plantas, animales y humanos. Consientes de esta problemática, surge la necesidad de implementar soluciones como la biorremediación, una alternativa económica, sencilla y ambientalmente amigable que permite la mineralización completa del contaminante (Cunningham y Philp, 2000; Bento *et al.*, 2005).

Para llevar a cabo un proceso de biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos (HCs), se deben tener en cuenta factores como la presencia de microorganismos degradadores capaces de metabolizar HCs como fuente de carbono y energía para su crecimiento (Eweis *et al.*, 1999; Margesin y Schinner, 2001), condiciones ambientales óptimas (nutrientes, pH, humedad, etc.) y las características físico-químicas de los HCs y su disponibilidad para los microorganismos degradadores (Cunningham y Philp, 2000). Sin embargo, diversos estudios han reportado que suelos contaminados con HCs presentan exceso de carbono, mientras que elementos como nitrógeno y fósforo se encuentran en bajas concentraciones para mantener un balance de nutrientes (C:N:P) limitando el proceso de biodegradación (Graham *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2000a). Por tal razón, la bioestimulación con adición de nutrientes, es una de las estrategias más empleadas para remediar áreas contaminadas con este tipo de contaminantes (Graham *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2000a; Brook *et al.*, 2001; Rittman y McCarty, 2001; Ruberto *et al.*, 2003; Venosa y Zhu, 2003). Durante la bioestimulación, se pueden utilizar sales inorgánicas simples (SIS) o fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC); numerosos estudios han demostrado la efectividad de los dos tratamientos; sin embargo, investigaciones realizadas por Wrenn *et al.*, 1994, Graham *et al.*, 1999 y Vallejo *et al.*, 2005, afirman que el uso de SIS, aunque es costoso, tiene ventajas como su fácil

manipulación y ha mostrado efectividad en diferentes procesos de biorremediación. De igual forma, FIC (productos comerciales), al tener mezclas definidas de elementos como N y P, incrementa la biodegradación; sin embargo, su presentación en forma de pellets o fertilizantes encapsulados, aunque garantiza un aporte de nutrientes constante a los microorganismos, tiene en algunos casos problemas de solubilización, limitando su homogenización y biodisponibilidad (Bitton, 2002; Margesin y Schinner, 2001). Un proceso de biorremediación se puede monitorear a través de medidas directas e indirectas. Las primeras, determinan la concentración de HCs (p.e., mgTPH/kg_{ps}) y su disminución a través del tiempo, mientras que las segundas (indirectas) determinan bioconversión de HCs e incluyen: consumo de aceptores de electrones (AE), producción de CO₂, aumento de biomasa (p.e., recuento de degradadores) y cambio de pH, entre otros (Hickey, 1995; Govind *et al.*, 1997; Korda *et al.*, 1997; Goudar y Strevelt, 1998; Gernaey *et al.*, 2001). La respirometría es una técnica que cuantifica el consumo de oxígeno y la producción de CO₂, por lo tanto permite evaluar el crecimiento y metabolismo activo de microorganismos durante la degradación del contaminante (Tzoris *et al.*, 2002). Así mismo, permite evaluar el impacto de un compuesto sobre comunidades microbianas y determinar la factibilidad de un tratamiento de biorremediación, ya que permite en cortos periodos de tiempo, evaluar tratamientos diferentes en microcosmos antes de su aplicación en campo. Estas ventajas, se deben a que la respirometría permite calcular tasas de respiración y realizar cinéticas de degradación, parámetros importantes para determinar la efectividad de la biorremediación (Reid *et al.*, 2001). En el presente estudio, se utilizó respirometría (consumo de O₂) para evaluar el efecto de la adición de nutrientes (bioestimulación) en forma de sales inorgánicas simples (SIS) y fertilizantes inorgánicos compuestos (FIC) en suelos contaminados con HCs. Adicionalmente, se comparó el consumo de O₂ en dos respirómetros: HACH® y OXITOP®, el primero utiliza columnas de mercurio para detectar cambios en la presión, mientras que el segundo, utiliza sensores de presión. Esta comparación se realizó con el fin de calcular las tasas de respiración mediante dos aproximaciones diferentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio se realizó por medio de ensayos respirométricos en microcosmos (botellas ámbar de 500 mL) cuantificando el consumo de oxígeno (O₂) durante 13 días (n=3). Se utilizaron y compararon dos respirómetros manométricos: HACH® (HACH; 2173b) y OXITOP® (WTW; PF600) bajo condiciones de laboratorio en la unidad de saneamiento y biotecnología ambiental (USBA), Pontificia Universidad Javeriana (PUJ). Se analizaron parámetros fisicoquímicos como pH, humedad, hidrocarburos totales de petróleo (TPH del inglés, *total petroleum hydrocarbons*), nutrientes (nitratos, amonio y fósforo) y microbiológicos: recuento de heterótrofos totales y degradadores de HCs. Los análisis se realizaron al inicio (t= 0 d) y final (t= 13 d) de cada ensayo por duplicado.

MICROCOSMOS

Para la realización del estudio se utilizó suelo proveniente de carreteras sin pavimentar a las cuales se les adicionan lodos aceitosos para su acondicionamiento y manteni-

miento. Las características del suelo son descritas en mayor detalle en Roldán *et al.*, 2010. El suelo tenía la siguiente composición química: nitrato (no detectable); amonio (0,6-2,2 mg/kg_{ps}); fósforo (0,05-7,6 mg/kg_{ps}); carbono orgánico (0,6-2,4%). Tiene textura arenosa (87,0%), arcilla (4,0%) y limo (9,1%).

El suelo fue contaminado con lodos aceitosos a una concentración de 40,000 mg TPH/kg_{ps}. Esta mezcla se homogenizó dos veces (30 min/microcosmos) al día durante tres días con ayuda de una espátula cubierta con teflón. Adicionalmente, este esfuerzo es necesario para tratar de garantizar la mayor homogenización de los hidrocarburos en la matriz del suelo. Con este procedimiento se buscó distribuir el suelo contaminado bajo condiciones iguales en cada microcosmos. Los microcosmos se mantuvieron a 21 ± 2 °C, y con un porcentaje de humedad del 12%, de acuerdo a las condiciones *in situ* (Roldán *et al.*, 2010). Se evaluaron dos tratamientos con adición de nutrientes (bioestimulación): FIC (producto comercial) con una relación 28:12:7 (N:P:K) y SIS (NH₄NO₃ y K₂HPO₄), ajustando la relación final a 100:10:1 (C:N:P; Avelizapa *et al.*, 2000; Miles y Doucette, 2001; Sabate *et al.*, 2004) Para realizar los cálculos, se asumió que la concentración de carbono en los lodos aceitosos fue de 100% (Margesin *et al.*, 2000b).

Se utilizaron los siguientes controles: a) abiótico (CA) para determinar la degradación TPH y consumo de O₂ por procesos abióticos (p.e., volatilización y absorción), para ello, el suelo fue esterilizado con azida de sodio al 1% (p/p; Margesin *et al.*, 2000b; Margesin, 2005b) control de referencia, se utilizó ACPM (diesel) a una concentración 20.000 mg/kg_{ps}, este sustrato fue seleccionado por su biodegradabilidad y por ser utilizado en USBA para evaluar la capacidad degradadora de microorganismos en la técnica de número más probable (NMP; Margesin *et al.*, 2000a; Brook *et al.*, 2001; Roldan, 2010); y c) control sin nutrientes (CSN) con suelo y HCs, permitió determinar la biodegradación intrínseca en el suelo.

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

El pH del suelo fue determinado por el método 9045C (EPA, 1995). Para determinar TPH se utilizó el método estándar para la evaluación de combustible en suelos D 5831-96 (ASTM, 1995). Este método se emplea para la determinación de compuestos aromáticos de combustibles presentes en el suelo y se basa en la extracción de HCs en isopropanol y su cuantificación por espectrofotometría a una longitud de onda de 254 nm. TPH son definidos por el método de análisis empleado más que por la sumatoria de todos los compuestos presentes (Weisman, 1998). Adicionalmente, el método fue seleccionado considerando que los lodos utilizados para el suelo provenían de los fondos de tanques y lagunas de oxidación, por esta razón, su composición es principalmente compuestos aromáticos. Para la cuantificación de nutrientes, se emplearon los métodos HACH 366, 391 y 531, para determinar nitrato, amonio y fósforo total, respectivamente (HACH®, 1994) y se utilizó espectrofotómetro HACH® (DRL-2000) para la lectura de cada análisis. Para determinar el porcentaje de humedad, se pesaron 5,0 g de la muestra de suelo y se secaron durante 12 h a 105 °C. La diferencia del peso antes y después del secado, permitió obtener la fracción de peso seco (ps) y el porcentaje de humedad (IGAC, 1979).

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Recuento de heterótrofos y degradadores de HCs. Para la cuantificación de heteró-

trofos y degradadores se realizaron diluciones seriadas de las muestras de suelo en buffer fosfato. Para determinar los heterótrofos se utilizó la técnica de recuento en placa empleando agar infusión suelo (AIS) (ASM, 1986). Por otro lado, para el recuento de microorganismos degradadores de HCs se empleó la técnica de número más probable (NMP) en placas de 96 pozos, utilizando medio mínimo de sales Bushnell-Haas (BH) suplementado con ACPM (diesel) como fuente de carbono y energía (Wrein y Venosa, 1996; Eriksson *et al.*, 2000; Brook *et al.*, 2001). Para evidenciar el metabolismo activo de los microorganismos se utilizó el indicador de oxidoreducción cloruro de yodotrazolium (INT; 0,3% p/v) (Haines, 1996; Wrein y Venosa, 1996; Roldan, 2010). Las cajas y placas fueron incubadas durante siete días a 22 ± 2 °C.

ANÁLISIS RESPIROMÉTRICO

En cada microcosmos se colocaron 85 g de suelo contaminado y se colocó LiOH en las trampas para remover el CO₂ producido durante el proceso de biodegradación (Platen y Wirtz, 1999). Los equipos HACH® y OXITOP® son respirómetros cerrados que miden consumo de O₂ por cambio en presión. El equipo HACH realiza esta medición a través de columnas de mercurio conectadas a cada botella, mientras que el equipo OXITOP utiliza sensores electrónicos de presión que están incorporados en la cabeza de cada botella (Platen y Wirtz, 1999). Se realizaron tres ensayos respirométricos, para cada tratamiento y control en cada equipo, y se determinó el consumo de O₂ durante 13 días realizando las lecturas diarias por microcosmos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se evaluó la distribución normal de los datos y en caso de no presentarla fueron transformados con logaritmo base 10. Se utilizó la prueba *t-student* para determinar diferencias significativas de los parámetros evaluados en el tiempo. Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar el efecto de los tratamientos. Se consideró una diferencia significativa cuando $p \leq 0,05$. Para comparar los equipos (HACH vs. OXITOP) se evaluaron las pendientes de las curvas de respirometría utilizando análisis de covarianza. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando JMP-IN® versión 4.04.

RESULTADOS

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICO

pH. El pH en los tratamientos y controles durante el estudio se mantuvo en un rango ligeramente ácido a alcalino (Tabla 1). El CA y FIC presentaron diferencias significativas en tiempo y en los dos equipos. Así mismo, SIS y CSN mostraron un incremento aunque solo en el equipo HACH® (*t-student*, $p \leq 0,05$).

TPH's. A pesar del esfuerzo realizado durante la mezcla de los lodos aceitosos con el suelo, se presentó alta variabilidad en algunas de las concentraciones observadas. Se observó reducción aunque no fue significativa en los controles y tratamientos evaluados en los dos equipos (Tabla 2; *t-student*, $p \leq 0,05$).

Nutrientes. Las concentraciones iniciales de nutrientes (N-NH₄⁺, N-NO₃⁻ y P) fueron bajas en todos los controles (CA, ACPM, CSN) con relación a la concentración de carbono (alta concentración de TPH's). Al final del estudio, se determinó un aumento

Tratamiento	HACH		OXITOP	
	t=0 d	t=13 d	t=0 d	t=13 d
CA	7,5 ± 0,3	8,7 ± 1,0	7,4 ± 0,1	7,7 ± 0,1
ACPM	5,9 ± 0,6	7,1 ± 1,5	5,6 ± 0,6	6,0 ± 0,5
CSN	6,2 ± 0,5	7,4 ± 1,2	5,9 ± 0,3	6,0 ± 0,4
FIC	7,4 ± 0,1	8,7 ± 0,4	7,4 ± 0,1	8,7 ± 0,4
SIS	6,9 ± 0,1	7,3 ± 0,3	6,9 ± 0,0	7,1 ± 0,7

Tabla 1. Valores de pH para tratamientos y controles al inicio y final del estudio. CA: Control abiótico; ACPM: control de referencia; CSN: Control sin nutrientes; FIC: Fertilizante inorgánico compuesto; SIS: sales inorgánicas simples (n=6).

Tratamiento	HACH		OXITOP	
	t=0 d	t=13 d	t=0 d	t=13 d
CA	33.500±5.100	29.200±3.200	30.100±1.400	30.300±1.500
ACPM	37.300±18.500	27.600±4.600	30.000±5.500	27.300±2.300
CSN	28.700±600	25.100±2.600	26.800±800	27.600±3.600
FIC	27.700±5.100	25.900±3.200	39.600±14.500	27.800±4.900
SIS	26.075±4.946	30.857±6.800	27.521±5.200	29.155±2.800

Tabla 2. Valores de TPH obtenidos durante el estudio. CA: Control abiótico; ACPM: control de referencia; CSN: Control sin nutrientes; FIC: Fertilizante inorgánico compuesto; SIS: sales inorgánicas simples (n=6).

significativo de N-NH₄⁺ en ACPM en los dos equipos, mientras que para CSN se observó en OXITOP (Tabla 3; Tabla 4; Tabla 5; *t-student*, $p \leq 0,05$). Por otro lado, SIS mostró disminución significativa de nutrientes al final del estudio.

Tratamiento	HACH		OXITOP	
	t=0 d	t=13 d	t=0 d	t=13 d
CA	5,2±1,5	6,5±1,0	5,3±2,6	6,0±1,4
ACPM	4,5±1,0	5,5±0,8	4,5±1,7	5,3±0,5
CSN	5,5±2,8	6,8±3,5	4,5±1,0	5,0±0,0
FIC	5,8±1,5	5,0±0,8	5,3±1,0	5,5±1,3
SIS	3.750±395,3	1.025±198,7*	3.281±312,5	1.068±136,0*

Tabla 3. Valores de nitrato obtenidos durante el estudio. CA: Control abiótico; ACPM: control de referencia; CSN: Control sin nutrientes; FIC: Fertilizante inorgánico compuesto; SIS: sales inorgánicas simples (n=6). *Valores que presentaron diferencias significativas.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Los recuentos de degradadores en CA durante el estudio fueron < 1 NMP/g, indicando que azida de sodio tuvo el efecto deseado sobre esta población (Graham *et al.*, 1999; Margesin *et al.*, 2000b). En los recuentos de heterótrofos, se observó aumento significativo en CSN y ACPM en OXITOP, mientras que este incremento fue constante para SIS en los dos equipos. En cuanto a los recuentos de degradadores, se observó disminución significativa para CSN en OXITOP y para FIC en los dos equipos (Fig. 1).

Tratamiento	Amonio (mg/kg _{ps})			
	HACH		OXITOP	
	t=0 d	t=13 d	t=0 d	t=13 d
CA	8,7±5,4	12,8±7,4	8,8±2,6	10,3±3,5
ACPM	9,5±7,1	21,8±9,1*	7,5±8,1	23,0±7,5*
CSN	6,7±6,5	18,7±15,9	1,5±0,6	15,3±4,3*
FIC	341,5±30,4	316,3±134,5	346,3±26,3	277,3±117,1
SIS	645,8±221,6	102,2±27,8*	756,3±51,5	147,0±60,5*

Tabla 4. Valores de amonio obtenidos durante el estudio. CA: Control abiótico; ACPM: control de referencia; CSN: Control sin nutrientes; FIC: Fertilizante inorgánico compuesto; SIS: sales inorgánicas simples (n=6). *Valores que presentaron diferencias significativas.

Tratamiento	Fósforo (mg/kg _{ps})			
	HACH		OXITOP	
	t=0 d	t=13 d	t=0 d	t=13 d
CA	6,4±1,7	8,2±1,9	6,5±3,2	4,4±2,5
ACPM	4,2±0,4	7,8±1,0	4,3±0,4	9,2±1,9*
CSN	5,4±0,5	6,0±3,3	6,1±1,2	4,1±1,1
FIC	107,5±10,6	112,9±21,6	93,8±5,2	110,6±25,9
SIS	102,1±23,3	77,6±13,2*	97,5±33,2	64,3±7,4*

Tabla 5. Valores de fósforo obtenidos durante el estudio. CA: Control abiótico; ACPM: control de referencia; CSN: Control sin nutrientes; FIC: Fertilizante inorgánico compuesto; SIS: sales inorgánicas simples (n=6). *Valores que presentaron diferencias significativas.

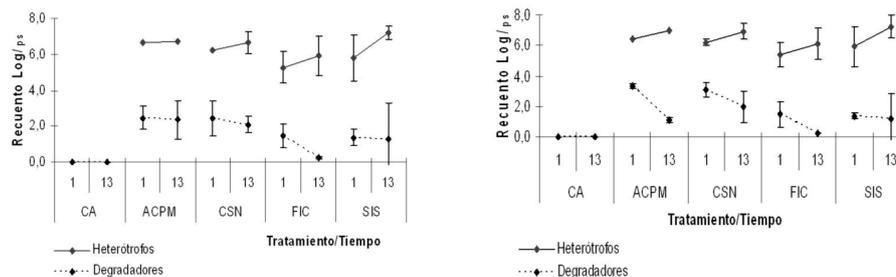


Figura 1. Recuento de microorganismos heterótrofos y degradadores de HCs al inicio y final del estudio. A) Equipo HACH y B) Equipo OXITOP. Se presenta el promedio ± 1ds. CA: Control abiótico; ACPM: control de referencia; CSN: Control sin nutrientes; FIC: Fertilizante inorgánico compuesto; SIS: sales inorgánicas simples (n=6).

ANÁLISIS RESPIROMÉTRICO

Las curvas de consumo O_2 obtenidas durante los ensayos respirométricos para controles y tratamientos fueron similares a las reportadas en la literatura (Uraizee *et al.*, 1998; Reid *et al.*, 2001). Para evaluar el consumo de O_2 generado durante la biodegradación, todas las lecturas fueron corregidas con el control abiótico (Miles y Doucette, 2001). Se observó un consumo mínimo al inicio (1-2 d) que corresponde a la fase de

adaptación, seguido por un consumo exponencial (2-10 d), y finalmente reducción en el consumo de oxígeno (10-13 d; Fig. 2).

Por otro lado, las tasas de respiración se calcularon durante los primeros diez días cuando la mayoría de las curvas se encontraban en fase exponencial (Tabla 6).

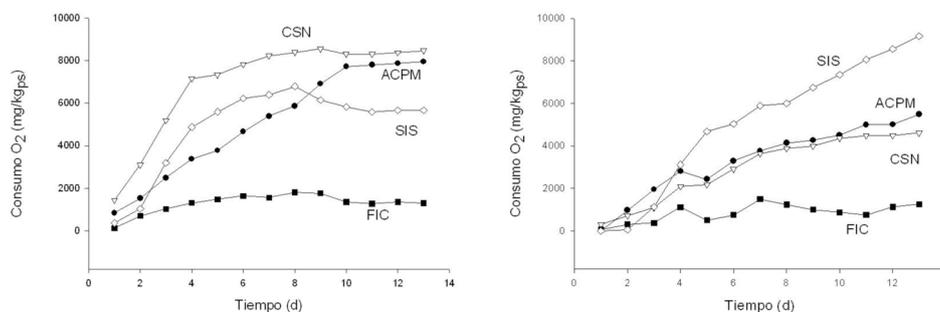


Figura 2. Consumo de O₂ en controles y tratamientos evaluados A) Equipo HACH (n=3) B) Equipo OXITOP. CA: Control abiótico; ACPM: control de referencia; CSN: Control sin nutrientes; FIC: Fertilizante inorgánico compuesto; SIS: sales inorgánicas simples (n=3).

	HACH	OXITOP
Tratamiento	Pendiente mg O ₂ kgps ⁻¹ d ⁻¹	Pendiente mg O ₂ kgps ⁻¹ d ⁻¹
ACPM	739,77	511,59
CSN	850,72*	502,05
FIC	188,18*	139,87*
SIS	802,28	936,65*

Tabla 6. Tasas de respiración del suelo durante los ensayos respirométricos. CA: Control abiótico; ACPM: control de referencia; CSN: Control sin nutrientes; FIC: Fertilizante inorgánico compuesto; SIS: sales inorgánicas simples (n=3). * Valores que presentaron diferencias significativas en cada equipo.

DISCUSIÓN

ANÁLISIS FÍSICO-QUÍMICOS

pH. Los valores de pH obtenidos en los tratamientos y controles, se encontraron en un rango ligeramente ácido a alcalino (Tabla 1), posiblemente por la composición química y capacidad buffer del suelo, ya que suelos minerales se caracterizan por presentar pH neutros-alcalinos en comparación a suelos orgánicos (Venosa y Zhu, 2003). En términos generales no se observaron valores de pH extremos que inhibieran total o parcialmente el metabolismo de los microorganismos (Cunnigham y Philp, 2000). Estudios realizados por Dibble y Bartha, 1979, establecieron un rango de pH entre 5,0-7,8 para la mineralización de lodos aceitosos en suelos y Ritter y Scarborough, 1995, determinaron que pHs entre 6,5-8,5 como óptimos para realizar procesod de biorremediación *in situ* en suelos contaminados con HCs.

TPH's. Los valores de TPH observados presentaron una alta variabilidad (Tabla 2), a pesar del tiempo (3 días) y esfuerzo empleado para la homogenización de la muestra. Este

comportamiento se debe a que los TPH son compuestos líquidos de la fase no acuosa que se caracterizan por ser hidrófobos y formar agregados en el suelo (bolsillos de contaminación), lo cual dificulta su homogenización completa (Eweis *et al.*, 1999; Roldan, 2002). Resultados similares fueron obtenidos por Deni y Penninckx, 1999, en suelos contaminados con TPH donde las concentraciones iniciales variaron en un rango de 2,500 a 4,000 mgTPH/kg debido a la distribución heterogénea de petróleo y a la naturaleza del suelo. Por otro lado, el tiempo del estudio y el origen de los lodos aceitosos no permitieron evidenciar cambios significativos en la degradación de TPH durante los ensayos. Adicionalmente, el método empleado para la cuantificación de TPH determina compuestos aromáticos, por tal razón, no se cuantificaron hidrocarburos alifáticos que probablemente proporcionaron una fuente de carbono fácilmente asimilable para los microorganismos. Así lo demuestra un estudio realizado por Coulon *et al.*, 2005, quienes afirman que fracciones de HCs de cadena corta son las que se degradan inicialmente y más rápido, en comparación con fracciones de HCs de cadena larga o compuestos aromáticos, independientemente del grado de contaminación.

Nutrientes. En los controles ACPM y CSN se observó un ligero incremento en las concentraciones de amonio y fósforo; sin embargo, este incremento no fue significativo en comparación a la concentración observada en los tratamientos (Tabla 3; Tabla 4; Tabla 5). Este fenómeno no pudo ser atribuido a ninguna de las condiciones empleadas durante el estudio y no fue considerado relevante porque no proporcionaba la relación C:N:P necesaria para llevarse a cabo la degradación.

De los tratamientos evaluados la bioestimulación con FIC no mostró una reducción significativa en las concentraciones de nutrientes (nitrato, amonio y fósforo). Este consumo bajo de nutrientes estuvo correlacionado con recuentos bajos de degradadores y tasas bajas de respiración presentes en este tratamiento. Este comportamiento se debe a que las altas concentraciones de nitrógeno en forma de urea en el producto comercial, fueron hidrolizadas a amoníaco; esta conversión pudo establecerse por el incremento en los valores de pH ($7,4 \pm 0,1$ a $8,7 \pm 0,4$) que causaron una alcalinidad en los microcosmos. La presencia de concentraciones de amoníaco altas en asociación al pH observado, probablemente generaron efecto inhibitorio sobre la población microbiana (Havlin *et al.*, 1999). Esto pudo evidenciarse por tasas de respiración bajas, densidad microbiana y olor característico (amoníaco) al final de los ensayos.

Por el contrario, SIS mostró reducción significativa en la concentración de nutrientes en ambos equipos (Tabla 3; Tabla 4; Tabla 5), indicando que las sales adicionadas fueron utilizadas como fuentes de N y P durante la degradación por los microorganismos durante el metabolismo de fracciones de HCs menos complejas presentes en el suelo. Resultados similares han sido reportados por Sabate *et al.*, 2004, con el uso de SIS (NH_4NO_3 y K_2HPO_4) donde observaron porcentajes de degradación del 54% en suelos contaminados con aceite mineral durante 360d. Así mismo, Vallejo *et al.*, 2005, demostró que la adición de SIS (NH_4NO_3 y K_2HPO_4) y FIC (NPK 15:15:15) redujo significativamente la concentración de TPH; sin embargo, la adición de SIS presentó los mayores porcentajes de remoción.

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

CSN y ACPM presentaron aumento significativo en los recuentos de heterótrofos en OXITOP ($1,6 \pm 0,1 \times 10^6$ a $8,3 \pm 0,5 \times 10^6$ y $2,4 \pm 0,6 \times 10^6$ a $1,0 \pm 0,4 \times 10^7$, respectivamente),

indicando que la población microbiana se encontraba metabólicamente activa, y que ACPM (diesel), es un compuesto de fácil degradación (Margesin *et al.*, 2000a).

En FIC, el recuento de heterótrofos no presentó cambios significativos en HACH y OXITOP, mientras que la población degradadora mostró reducción significativa en el tiempo que posiblemente se presentó por el efecto inhibitorio generado por el amoníaco (Fig. 1). Es importante mencionar que no se han reportado estudios en donde la adición de nutrientes afecte negativamente la población degradadora, por el contrario puede aumentar su densidad o mantener el metabolismo basal de la población (Margesin *et al.*, 2000b; Nikolopoulou *et al.*, 2007).

Por otro lado, el tratamiento con SIS mostró incremento significativo en los recuentos de heterótrofos (Fig. 1; $6,4 \pm 1,2 \times 10^5$ a $1,6 \pm 0,3 \times 10^7$ y $8,3 \pm 1,3 \times 10^5$ a $1,7 \pm 0,7 \times 10^7$ en HACH y OXITOP, respectivamente) indicando que los nutrientes fueron utilizados por la población degradadora para metabolizar fracciones de HCs menos complejas, generando subproductos que posiblemente fueron empleados como fuente de carbono por los heterótrofos durante su crecimiento. Comportamientos similares han sido reportados por Venosa y Zhu, 2003, quienes determinaron que la degradación de HCs involucra una serie de reacciones secuenciales, en donde los microorganismos degradadores metabolizan HCs y generan compuestos intermediarios que son posteriormente utilizados por diferentes grupos de microorganismos (p.e., heterótrofos no degradadores). Los recuentos de degradadores no presentaron diferencias significativas durante el estudio (HACH y OXITOP) indicando que las sales adicionadas permitieron mantener el metabolismo basal de esta población, es decir, la presencia de nutrientes en forma de SIS estimuló el metabolismo de los degradadores, aunque no necesariamente aumentó los recuentos o biomasa (Alexander, 1999). De igual forma, en investigaciones desarrolladas por Margesin *et al.*, 2000b, para monitorear un proceso de biodegradación por actividad biológica, encontraron que la presencia o ausencia de nutrientes no tenía efecto significativo en el recuento de degradadores y que otros factores como tipo de contaminante y tiempo de exposición eran mucho más relevantes. Por esta razón, durante este estudio, la naturaleza del contaminante y el tiempo de los ensayos fueron los factores limitantes para el crecimiento de microorganismos degradadores. Este fenómeno ha sido descrito como "umbral" en el cual cantidades pequeñas de sustrato disponible y fácilmente asimilable son metabolizadas con el fin de mantener el metabolismo energético y no incrementar la biomasa (Alexander, 1999).

ANÁLISIS RESPIROMÉTRICO

En términos generales las curvas de consumo O_2 en el tiempo obtenidas para los controles y tratamientos presentaron fases similares a las reportadas en la literatura (Fig. 2). Muchos de estos estudios han reportado una fase inicial (adaptación) donde se observan consumos mínimos y constantes durante los primeros tres días en suelos contaminados con aceites minerales sin adición de nutrientes (Uraizee *et al.*, 1998) y suelos contaminados con HCs policíclicos aromáticos (Reid *et al.*, 2001).

Por otro lado, el compuesto utilizado como sustrato de referencia (ACPM) permitió determinar que las condiciones empleadas durante el estudio, así como, el montaje respirométrico fueron adecuados para evaluar el consumo de oxígeno de los tratamientos en el tiempo (Tabla 6). El consumo de O_2 de CSN mostró una tasa de respiración en

HACH y OXITOP (850,72 y 502,1 mgO₂kg_{ps}⁻¹d⁻¹, respectivamente), indicando la existencia de una población microbiana nativa degradadora. Este consumo puede deberse a un proceso de biodegradación intrínseca como parte de la atenuación natural (Roldan *et al.*, 2010) y que probablemente otros factores como humedad pueden llegar a ser limitantes durante el proceso de biorremediación.

El consumo de O₂ en FIC fue significativamente menor (188,18 y 139,87 mgO₂kg_{ps}⁻¹d⁻¹ para HACH y OXITOP, respectivamente) en comparación a los tratamientos, este comportamiento estuvo acompañado de recuentos bajos de microorganismos (degradadores y heterótrofos) y consumo de los nutrientes bajo. De otra manera, SIS presentó tasas de respiración significativamente mayores (802,28 y 936,65 mgO₂kg_{ps}⁻¹d⁻¹, para HACH y OXITOP, respectivamente) que FIC, indicando mayor biodisponibilidad de nutrientes para estimular la degradación de la población degradadora. Las tasas de respiración bajas observadas en FIC confirman el efecto inhibitorio del fertilizante utilizado en el estudio posiblemente causado por la presencia de amoníaco en los microcosmos cerrados.

Estudios realizados por Hollender *et al.*, 2003, en suelos contaminados con BTEX y PHA's en el que se evaluaba la adición de nutrientes en forma de SIS (NH₄Cl y K₂HPO₄) y glucosa como sustrato inductor para estimular el proceso de biodegradación durante 10 d, reportaron tasas de respiración (1,6 µmolO₂/g/h) similares a las tasas de consumo de O₂ obtenidas durante el presente estudio para SIS (1,04 µmolO₂g⁻¹h⁻¹ y 1,22 µmolO₂g⁻¹h⁻¹ para HACH y OXITOP, respectivamente), indicando que el uso de este tipo de compuestos puede estimular el metabolismo, ya que son sustratos fácilmente asimilables por la población degradadora.

CONCLUSIONES

La respirometría permitió evaluar la efectividad de un tratamiento de biorremediación, como la bioestimulación, en periodos de tiempo cortos. La adición de nutrientes en forma de sales (SIS) estimuló la población degradadora lo cual se reflejó en tasas de respiración altas obtenidas en OXITOP. Por otro lado, factores como tiempo y presencia de HCs de alto peso molecular fueron limitantes durante el estudio.

AGRADECIMIENTOS

A la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana por la financiación del proyecto (No. 000288).

BIBLIOGRAFÍA

ALEXANDER M. Biodegradation and Bioremediation. Second Edition. Academic Press; 1999.

ASM. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Department of Nutrition and Food Science. Massachusetts Institute of Technology; 1986.

ASTM D. 5831-96. Standard test method for screening fuels in soils. American Society for Testing Materials; 1995.

AVELIZAPA N, VAZQUEZ R, BOHÓRQUEZ S, ALVAREZ P. Effect of C/N/P ratio and nonionic surfactants on polychlorinated biphenyl biodegradation. *World J Microb Biot.* 2000;16:319-324.

BENTO M, CAMARGO F, OKEKE B, FRANKENBERGER W. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour Technol.* 2005;96:1049-1055.

BITTON G. *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. First Edition. United States of America: Wiley-Interscience Publication; 2002. p. 56-97.

BROOK T, WARREN S, ZYTNER R. Biodegradation of diesel fuel in soil under various nitrogen addition regimes. *J Soil Contam.* 2001;10(5):539-553.

COULON F, PELLETIER E, GOURHANT L, DELILLE D. Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere.* 2005;58:1439-1448.

CUNNINGHAM C, PHILIP J. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. *Land Contamination & Reclamation.* 2000;8(4):261-269.

DENI J, PENINCKX J. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon- polluted soil. *Appl Environ. Microbiol.* 1999;65(9):4088-4013.

DIBBLE J, BARTHA R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil Sludge. *Appl Environ Microbiol.* 1979;37(4):729-739.

EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Determination of pH (9045c) in soils; 1995(Revisión 4):1-8.

ERIKSSON M, DALHAMMAR G, BORG-KARLSON A. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000;53:619-626.

EWEIS J, ERGAS S, CHANG D, SCHROEDER E. *Principios de Biorrecuperación*. Primera Edición. Editorial Mc Graw Hill; 1999.

GERNAEY A, PETERSEN B, OTTOY J, VANROLLEGHEM P. Activated sludge monitoring with combined respirometric titrimetric measurements. *Water Res.* 2001;35(5):1280-1294.

GOUDAR C, STREVELT K. Comparison of relative rates of BTEX biodegradation using respirometry. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 1998;21:11-18.

GOVIND R, GAO C, LAI L, TABAK H. Continuous, automated and simultaneous measurement of oxygen uptake and carbon dioxide evolution in biological systems. *Water Environ. Res.* 1997;69(1):73-80.

GRAHAM D, SMITH V, CLELAND D, LAW P. Effects of nitrogen and phosphorus supply on hexadecane biodegradation in soil systems. *Water Air Soil Pollut.* 1999;111:1-18.

HACH DRL/2000. *Spectrophotometer Handbook*. HACH, Company. Procedures Manual. USA; 1994.

HAINES J, WRENN B, HOLDER E, STROHMEIER K. Measurement of hydrocarbon degrading microbial population by 96-well plate most probable number procedure. *J Ind Microbiol.* 1996;16:36-41.

HAVLIN J, BEATON J, TISDALE S, NELSON W. *Soil Fertility and Fertilizers*. Sixth Edition. Ed. Prentice Hall; 1999.

HICKEY W. *In situ* respirometry: Field methods and implications for hydrocarbon biodegradation in subsurface soils. *J Environ Qual*. 1995;24:583-588.

HOLLENDER J, ALTHOFF K, MUNDT M, DOTT W. Assessing the microbial activity of soil samples, its nutrient limitation and toxic effects of contaminants using a simple respiration test. *Chemosphere*. 2003;53:269-275.

IGAC - INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTIN CODAZZI. Métodos analíticos de laboratorio de suelos, subdirección agrológica. Ministerio de Hacienda y Crédito Público. Cuarta edición. Bogotá: Instituto Geográfico Agustín Codazzi; 1979. p. 61-67.

KORDA A, SANTAS P, TENENTE A, SANTAS R. Petroleum hydrocarbon bioremediation: Sample and analytical techniques, *in situ* treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1997;48:677-686.

MARGESIN R, SCHINNER F. Bioremediation (Natural attenuation and biostimulation) of diesel oil contaminated soil in an Alpine Glacier glacier skiing area. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67(7):3127-3133.

MARGESIN R, WALDER G, SCHINNER F. The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbon) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnol*. 2000a;20(3-4):313-333.

MARGESIN R, ZIMMERBAUER A, SCHINNER F. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*. 2000b;40:339-346.

MARGESIN R. Comunicación Personal. Institut für Mikrobiologie. Leopold-Franzes-Universität. Innsbruck-Austria; 2005.

MILES R, DOUCETTE W. Assessing the aerobic biodegradability of 14 hydrocarbons in two soils using a simple microcosm/respiration method. *Chemosphere*. 2001;45:1085-1090.

NIKOLOPOULOU M, PASADAKIS N, KALOGERAKIS N. Enhanced bioremediation of crude oil utilizing lipophilic fertilizers. *Desalination*. 2007;211:286-295.

PLATEN H, WIRTZ A. Measurement of the respiration activity of soils using the OxiTop® Control measuring system. Manual WTW Fachhochschule Giessen Friedberg; 1999(1-3).

REID B, MAC LEOD C, LEE P, MORÍS A, STOKES J, SEMPLE K. A simple ¹⁴C-respirometric method for assessing microbial catabolic potential and contaminant bioavailability. *Microbial Letters*. 2001;196:141-146.

RITTER W, SCARBOROUGH J. A review of bioremediation of contaminated soil and groundwater. *J Environ Sci*. 1995;30(2):333-347.

RITTMAN B, MC CARTY C. *Biología del medio ambiente: Principios y Aplicaciones*. Sexta edición. Mc. Graw Gill; 2001.

ROLDAN F. Oxygen and Nitrate Enhanced *in situ* Bioremediation of an Oil Contaminated Salt marsh [Tesis Doctoral]. USA: Department of Civil Engineering, University Hampshire; 2002.

ROLDAN F, MALDONADO C, GUEVARA C, CUBILLOS A. Natural Attenuation of Oily Sludge Used the Maintenance of an Unpaved Road Arauca (Colombia). *Bioremediat J*. 2010;14(2):81-91.

RUBERTO L, VAZQUEZ S, MAC CORMARCK W. Effectiveness of the natural bacteria flora, biostimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 2003;52:115-125.

SABATE J, VIÑAS , SOLANAS A. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *Int. Biodeterior. Biodegradation*. 2004;54:19-25.

TZORIS A, CANE D, MAYNARD P, HALL E. Tuning the parameters for fast respirometry. *Anal Chim Acta*. 2002;460:257-270.

URAIZEE F, VENOSA A, SUIDAN M. A model for diffusion controlled bioavailability of crude oil components. *Biodegradation*. 1998;8:287-296.

VALLEJO V, SALGADO L, ROLDAN F. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. *Rev. Colomb. Biotecnol*. 2005;(2):67-78.

VENOSA A, ZHU X. Biodegradation of crude oil contaminating marine shorelines and freshwater wetlands. *Spill Science & Technology*. 2003;8(2):63-178.

WEISMAN W. Analysis of Petroleum Hydrocarbons in Environmental Media. Volumen 1. Total Petroleum Hydrocarbon Criteria Working Group Series. Amherst, Massachusetts: Amherst Scientific Publishers; 1998. p. 18-34.

WREN B, HAINES J, VENOSA A, KADKHODAYAN M, SUIDAN M. Effects of nitrogen source on crude oil biodegradation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 1994;3:79-283.

WREIN B, VENOSA A. Selective enumeration of aromatics and aliphatic hydrocarbons degrading bacteria by most probable number procedure. *Can. J. Microbiol*. 1996;42:252-258.