

VARIACIÓN DE LAS POBLACIONES MICROBIANAS DEL SUELO POR LA ADICIÓN DE HIDROCARBUROS

Variation of Soil Microbial Populations Affected by the Addition of Hydrocarbons

Yudith Viridiana Castro-Mancilla¹, Blanca I. Castro-Meza^{1*}, Francisco R. de la Garza-Requena¹,
Patricio Rivera-Ortiz¹, Lorenzo Heyer-Rodríguez¹ y Yessica P. Ortiz-Carrizales¹

RESUMEN

Las poblaciones microbianas son alteradas por la presencia de hidrocarburos, particularmente las que tienen la capacidad de utilizarlos como fuente de carbono. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de los hidrocarburos sobre las poblaciones microbianas del suelo. Se realizó el experimento en condiciones de invernadero con cinco tratamientos: T1 = testigo; T2 = suelo + aceite; T3 = suelo + aceite + nitrógeno y fósforo (NP); T4 = suelo + diesel y T5 = suelo + diesel + nitrógeno y fósforo (NP). Se utilizó suelo agrícola contaminado *ex profeso*, con 10% en peso con aceite de lubricación automotriz en el tratamiento T2 y T3 y diesel en el tratamiento T4 y T5. La variación en las poblaciones microbianas del suelo fue determinada mediante la técnica del número más probable (NMP). Se midió la respiración edáfica del suelo en estudio y el contenido de hidrocarburos totales de petróleo. Los resultados indicaron que los microorganismos del suelo y degradadores de hidrocarburos fueron estimulados por la presencia de aceite y diesel. La población fluctuó de 1×10^5 UFC g^{-1} del suelo testigo hasta 1×10^8 UFC g^{-1} en el suelo con diesel más nitrógeno y fósforo, que fue el valor más alto. La adición de ambos hidrocarburos aumentó la actividad biológica del suelo evaluada como el índice de respiración edáfica y medida como producción de CO_2 , la cual osciló de 1% del suelo testigo hasta 9% en el tratamiento con diesel y nutrientes. Se concluye que el diesel y aceite de lubricación automotriz influyeron en la dinámica de las poblaciones microbianas del suelo, ya que la comunidad microbiana los utiliza como fuente de carbono, indicado por la producción de CO_2 , subproducto de la degradación de los hidrocarburos.

El balance del contenido de carbono, nitrógeno y fósforo (C:N:P), en los suelos, favorece el aprovechamiento de los hidrocarburos por las poblaciones microbianas del suelo; las poblaciones microbianas están limitadas al sustrato, es decir, a la cantidad disponible de hidrocarburos en el suelo.

Palabras clave: biorremediación, microbiota.

SUMMARY

Microbial populations are altered by the presence of hydrocarbons, particularly those who are capable of using as a carbon source. This work aimed to evaluate the effect of hydrocarbons on soil microbial populations. The experiment was conducted under greenhouse conditions with five treatments: T1 = control; T2 = soil + oil; T3 = soil + oil + nitrogen and phosphorus (NP); T4 = soil + diesel and T5 = soil + diesel + nitrogen and phosphorus (NP). Agricultural soil was used expressly contaminated with 10% by weight in automotive lubricating oil for T2 and T3 or with diesel for T4 and T5. The variation in soil microbial populations was determined by the technique of most probable number (MPN). We measured soil respiration and the total content of petroleum hydrocarbons. The results indicated that soil microorganisms and hydrocarbon degraders were stimulated by the presence of oil and diesel. The population ranged from 1×10^5 CFU g^{-1} control soil to 1×10^8 CFU g^{-1} in the soil with diesel + nitrogen and phosphorus, the latter was the highest value. The addition of both hydrocarbons increased soil biological activity evaluated as the index and soil respiration measured as CO_2 production, which ranged from 1% in the control soil to 9% in the soil + diesel and nutrients (NP). It is concluded that diesel and automotive lubrication oil influenced the dynamics of soil microbial populations and microbial community that uses them as a carbon source, as indicated by CO_2 production, by product of hydrocarbon degradation. The balance of carbon, nitrogen and phosphorus (C:N:P) in soils, favors the use

¹ División de Estudios de Postgrado e Investigación. Facultad de Ingeniería y Ciencias. Universidad Autónoma de Tamaulipas, Centro Universitario Victoria. 87149 Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

* Autor responsable (bcastro@uat.edu.mx)

of hydrocarbons by soil microbial populations; microbial populations are limited to the substrate, that is to say, the amount of available hydrocarbons in the soil.

Index words: *bioremediation, microorganisms.*

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas ambientales existentes es la contaminación del suelo, la cual afecta el pH, la conductividad eléctrica, la concentración de metales pesados y el contenido de carbono orgánico entre otros parámetros (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2002; De la Garza *et al.*, 2008).

Las actividades industriales como la petroquímica, conjuntamente con la disposición clandestina y derrames accidentales de combustible han ocasionado que existan en México sitios contaminados por hidrocarburos cuyo saneamiento es complejo (Ortíz *et al.*, 2003). Los compuestos derivados del petróleo son mezclas de hidrocarburos (Maier *et al.*, 2009), que de acuerdo al número de carbonos que conforman su cadena se hacen más complejos y difíciles de tratar, como los aceites de lubricación automotriz en general (salvo sintéticos), son mezclas de aceites básicos parafínicos y aditivos, los cuales tienen como base una cadena formada por más de 18 carbonos, y se clasifican como hidrocarburos de fracción pesada, no volátil y de difícil solubilización y el diesel, caracterizado de fracción media, se conforma por cadenas de entre 13 y 18 carbonos, es volátil y tiene cierto grado de solubilidad, cuya composición aproximada es de 75% de hidrocarburos saturados (principalmente parafinas incluyendo isoparafinas y cicloparafinas) y un 25% de hidrocarburos aromáticos (incluyendo naftalenos y alcalobencenos) (Hernández-Acosta *et al.*, 2006). Ambas sustancias tienen diferentes grados de toxicidad para el suelo (Paumier *et al.*, 2007).

Las poblaciones microbianas son alteradas por la contaminación con hidrocarburos, dentro de ellas, están las que tienen la capacidad de utilizarlos como fuente de carbono (Nilsson *et al.*, 2005; Abaye y Brookes, 2006). La microbiota edáfica da soporte a la biorremediación de suelos contaminados con derivados del petróleo, lo que ayuda a disminuir la concentración del contaminante en el suelo, transformándolo a CO₂, agua y biomasa microbiana (Marín *et al.*, 2005). La actividad de los microorganismos presentes en un suelo contaminado con hidrocarburos se puede favorecer al mejorar las condiciones edáficas, con adición de

nutrimentos, agua y aplicando aireación (Ercoli *et al.*, 2001), lo cual facilita la mineralización de los hidrocarburos (Bento *et al.*, 2005). Los microorganismos hidrocarbonoclastas crecen a expensas de los hidrocarburos, si se dispone de las proporciones adecuadas de carbono, hidrógeno, nitrógeno y fósforo (C, H, N y P) entre otros elementos. La deficiencia de algún nutriente se puede suplementar con la adición de fertilizantes químicos (Prince, 2005). Es importante conocer las características del lugar contaminado como: la concentración del contaminante, la densidad de población de los microorganismos que degradan el petróleo y su potencial de biodegradación, los cuales son factores que intervienen en el proceso de biorremediación de sitios contaminados con petróleo (Bento *et al.*, 2005).

La biodegradación del contaminante es selectiva, ya que los microorganismos no degradan por igual las distintas familias de hidrocarburos (Alexander, 1995). Cada especie de microorganismo puede metabolizar sólo un número limitado de sustratos de hidrocarburos, de modo que se requiere de comunidades microbianas con actividades enzimáticas que degraden mezclas complejas de dichos compuestos (Top y Springael, 2003; Nilsson *et al.*, 2005), por lo que conocer la dinámica de las poblaciones microbianas y su participación en la degradación de los hidrocarburos es necesario.

La influencia que tienen los hidrocarburos sobre las poblaciones microbianas del suelo, se puede conocer mediante el uso de técnicas como la evaluación de la población por la técnica del número más probable (NMP) de microorganismos por gramo de suelo; la respiración edáfica (producción de CO₂) y la concentración del contaminante en el suelo, entre otras (Marín *et al.*, 2005).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de dos hidrocarburos, diesel y aceite de lubricación automotriz, sobre el crecimiento de las poblaciones microbianas en un suelo agrícola.

MATERIALES Y MÉTODOS

El suelo fue colectado en una parcela agrícola de la Posta Zootécnica de la Facultad de Ingeniería y Ciencias de la Universidad Autónoma de Tamaulipas, ubicada en el km 23 de la carretera Cd. Victoria - Monterrey, en la zona centro de Tamaulipas, en el Municipio de Güémez, a 23° 56' 26" N y 99° 05' 59" O, a una altitud de 193 m; que de acuerdo con Köppen tiene un clima semicálido con lluvias en verano (García, 1981).

Los tratamientos aplicados al suelo fueron: T1 = testigo; T2 = suelo + aceite; T3 = suelo + aceite + nitrógeno y fósforo (NP); T4 = suelo + diesel y T5 = suelo + diesel + nitrógeno y fósforo (NP), cada tratamiento contó con cinco repeticiones. Las unidades experimentales consistieron en 3 kg de suelo colocados en charolas de plástico de 5 kg de capacidad, donde se agregaron cada uno de los tratamientos. Las concentraciones de hidrocarburos fueron de 3000 ppm para obtener una proporción al 10% referente al suelo. En los tratamientos fertilizados se usó urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$) grado reactivo como fuente de nitrógeno y fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) como fuente de fósforo, en proporciones de 100:10:1 de C:N:P, según correspondiera al tratamiento. Con base al contenido de carbono orgánico en los tratamientos contaminados con diesel y aceite, se determinó las cantidades necesarias de nutrimentos (N y P) en proporciones de 100:10:1 de C:N:P, necesarias para el balance de estos nutrimentos y favorecer la descomposición de los hidrocarburos por los microorganismos del suelo (Ercoli *et al.*, 2001).

El ensayo se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero y se mantuvo la humedad del suelo al 50% de la capacidad de retención de campo. Se aplicó aireación removiendo el suelo con una espátula cada 15 días, en estos periodos se tomaron muestras de suelo.

Se determinó el número más probable (NMP) de microorganismos heterótrofos totales del suelo en agar nutritivo, también se cuantificó el NMP de microorganismos degradadores de los hidrocarburos usados en este ensayo, utilizando el medio de cultivo cuya composición fue la siguiente: $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$ (7 g), KH_2PO_4 (5.7 g), K_2HPO_4 (2.3 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2.2 g), agar bacteriológico BioCen (15 g), hidrocarburo (1 mL), agua destilada (1 L) propuesto por Félix *et al.* (1996), incluyendo como única fuente de carbono el aceite de lubricación automotriz para el tratamiento 2 y 3, y diesel para el tratamiento 4 y 5.

La respuesta de crecimiento de los microorganismos se determinó mediante la fórmula Tasa de Crecimiento Relativo (TCR) de acuerdo con Beadle (1993) modificada por Olguín *et al.* (2007):

$$TCR(\text{día}^{-1}) = \frac{\ln w_2 - \ln w_1}{t_2 - t_1}$$

donde:

w = unidades formadoras de colonias de microorganismos
 t = tiempo (días)

La respiración edáfica fue evaluada como producción de CO_2 y medida con un analizador de gas PBI Dansensor Check Mate II. Después de incubar el suelo a 28 °C durante 24 horas (García *et al.*, 2003); la determinación se consideró como indicador de actividad de los microorganismos del suelo. Los hidrocarburos totales en el suelo se cuantificaron mediante el método de cromatografía de gases con detector de ionización de flama según la NMX AA 145 SCFI 2008 para hidrocarburos de fracción media y con base en la NMX AA 134 SCFI 2006, para la fracción pesada por extracción y gravimetría.

Se hicieron seis muestreos a lo largo de los tres meses que duró el experimento, el cual se realizó con un diseño experimental completamente al azar de cinco tratamientos y cinco repeticiones, con un arreglo factorial 5*6, donde los factores fueron tratamientos y días de incubación. Se hizo un análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey. Además, se realizó un análisis de coeficiente de correlación r entre las variables microorganismos degradadores de hidrocarburos e hidrocarburos totales de petróleo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Físico-Químico del Suelo

Los resultados del análisis físico-químico del suelo indican, de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAP-2000, que se trata de un suelo calcáreo, de textura arcillosa, con pH ligeramente alcalino, sin problemas de salinidad. Tiene un contenido medio de materia orgánica y nitrógeno total, pobre en fósforo, hierro y zinc, pero con un nivel adecuado de potasio (Cuadro 1) (Fernández *et al.*, 2006).

Microorganismos del Suelo

Los resultados obtenidos indicaron que había en el suelo 12×10^3 unidades formadoras de colonia (UFC) por gramo de suelo, es decir, microorganismos que crecieron en el medio que contenía aceite de lubricación; 45×10^3 UFC g^{-1} de suelo de microorganismos que crecieron en el medio con diesel y el número de heterótrofos totales fue de 45×10^5 UFC g^{-1} de suelo,

Cuadro 1. Resultados de los análisis fisicoquímicos del suelo del ensayo.

Parámetro	Resultado
Textura	Arcillosa
Arcilla (%)	59.50
Limo (%)	20.00
Arena (%)	20.50
pH	7.6
Conductividad eléctrica (mS cm ⁻¹)	0.42
Materia orgánica (%)	3.90
Carbono (%)	2.30
Nitrógeno total (%)	0.22
Fósforo extractable (mg kg ⁻¹)	1.91
Potasio intercambiable (meq 100 g ⁻¹)	1.19
Hierro extractable (mg kg ⁻¹)	1.03

lo cual indica que éste suelo posee microorganismos capaces de utilizar a estos hidrocarburos como fuente de carbono. Se sabe que se necesita un mínimo de 10×10^6 UFC g⁻¹ de heterótrofos totales y de 10×10^3 a 10×10^4 UFC g⁻¹ de suelo de microorganismos degradadores de petróleo (Knaebel *et al.*, 1994) para poder llevar a cabo la biorremediación.

Dinámica de las Poblaciones de Microorganismos Heterótrofos Totales

Los microorganismos heterótrofos totales del suelo fueron sensibles a la contaminación por aceite de lubricación automotriz y diesel, ya que generaron cambios en el suelo que indujeron el crecimiento de las poblaciones microbianas, siendo más evidente y acelerado en el tratamiento con diesel más nutrientes (NP), con una tasa de crecimiento relativo (TCR) de 0.207 día⁻¹, lo cual indica que fue el tratamiento con una estimulación más rápida en el crecimiento poblacional microbiano (Cuadro 2). El tratamiento con aceite de lubricación automotriz más nutrientes tuvo una TCR de 0.147 día⁻¹, y el resto de los tratamientos no mostró una diferencia significativa (Cuadro 3) en el crecimiento poblacional durante los primeros 20 días, pero, a partir de entonces, los valores de la población microbiana empiezan a diferenciarse. En el caso de los tratamientos sin nutrientes, el suelo con aceite de lubricación automotriz generó una cantidad mayor de microorganismos alrededor del día 35, sin embargo, hacia el día 50, prácticamente se igualó en cantidad al suelo

Cuadro 2. Tasa de Crecimiento relativo de los heterótrofos totales de los cinco tratamientos aplicados al suelo.

Tratamiento	Tasa de crecimiento relativo de heterótrofos totales
Testigo	0.07963151 a
S + A	0.10056054 b
S + D	0.10540293 b
S + A + NP	0.14677076 c
S + D + NP	0.20759613 c

Resultados con distinta letra son estadísticamente diferentes con una $P < 0.0001$. S+A = suelo+aceite; S+A+NP = suelo+aceite+nitrógeno y fósforo; S+D = suelo+diesel; S+D+NP = suelo+diesel+nitrógeno y fósforo.

con diesel, y es en esta fecha, cuando la fase de muerte celular se hizo notar en los dos tratamientos (Figura 1).

Como se puede apreciar en la Figura 1, hubo respuesta a la fertilización nitrogenada y fosforada, ya que las poblaciones microbianas heterótrofas del suelo alcanzaron valores más altos en los tratamientos con nitrógeno y fósforo, comparados con los tratamientos que contenían sólo aceite o diesel, esto es debido a que se balancean los contenidos de Carbono-Nitrógeno-Fósforo alterados por la presencia del hidrocarburo. Además, se observa que las poblaciones microbianas tienen un desarrollo temprano en el tratamiento con diesel más fertilización, alcanzando su punto más alto a los 50 días, mientras que en el suelo con aceite más fertilización, se observó un crecimiento más lento de las poblaciones alcanzado su punto máximo a los 65 días. Las diferencias entre los tratamientos se atribuyen a la estructura química de los hidrocarburos usados en el ensayo, la composición del aceite es más compleja

Cuadro 3. Unidades formadoras de colonias (UFC) de los heterótrofos totales de los cinco tratamientos aplicados al suelo en los cinco diferentes tiempos de incubación.

Tratamiento	Grupo				
	20	35	50	65	80
	----- Días -----				
Testigo	a	a	a	a	a
S + A	b	b	b	b	b
S + A + NP	b	c	c	c	b
S + D	b	b	b	b	a
S + D + NP	c	c	c	d	b

Grupos con distinta letra son estadísticamente diferentes con una $P < 0.0001$. S+A = suelo+aceite; S+A+NP = suelo+aceite+nitrógeno y fósforo; S+D = suelo+diesel; S+D+NP = suelo+diesel+nitrógeno y fósforo.

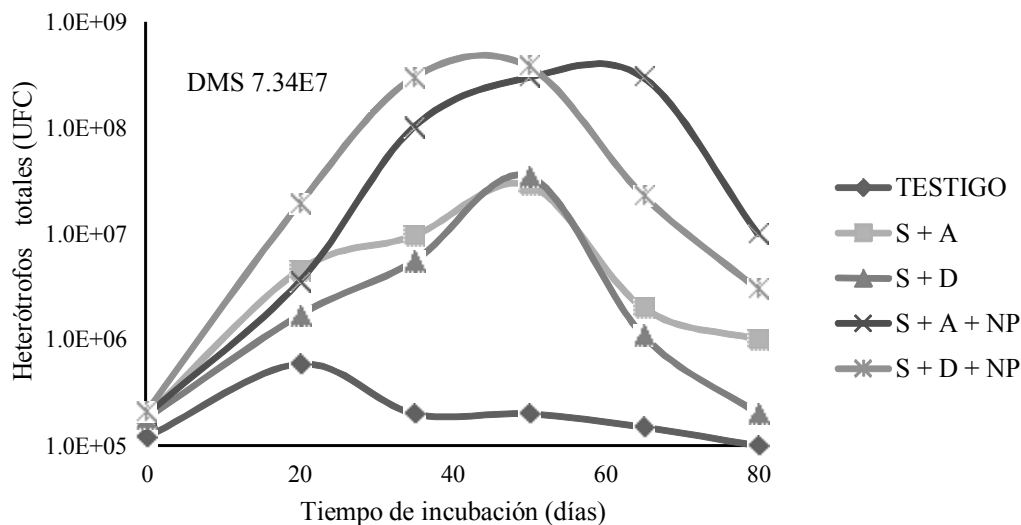


Figura 1. Curvas de crecimiento de los microorganismos heterótrofos totales expresadas en unidades formadoras de colonia (UFC). S+A = suelo+aceite; S+A+NP = suelo+aceite+nitrógeno y fósforo; S+D = suelo+diesel; S+D+NP = suelo+diesel+nitrógeno y fósforo; DMS = diferencia mínima significativa.

que la del diesel por lo que requiere mayor tiempo para degradarse biológicamente (Leahy y Colwell, 1990; Romaniuk *et al.*, 2007).

El aumento de microorganismos heterótrofos en suelo adicionado con hidrocarburos, es consecuencia de procesos co-metabólicos. Es difícil que una sola cepa bacteriana pueda degradar el hidrocarburo, debido a que en el proceso de degradación se producen productos intermedios (Serrano *et al.*, 2006), los cuales son metabolizados por diferentes tipos de microorganismos, lo que ayuda a las actividades bioquímicas sinérgicas y en consorcios microbianos puedan conducir al reciclaje total de compuestos relativamente recalcitrantes (Leahy y Colwell, 1990). Se requiere de poblaciones mixtas con amplias capacidades enzimáticas para la degradación de hidrocarburos en suelo, pues microorganismos de un sólo género pueden mineralizar exclusivamente un limitado rango de sustratos de hidrocarburo (Fontúrbel, 2004).

Dinámica de las Poblaciones de Microorganismos Degradadores de Hidrocarburos

Se demostró que en el suelo de estudio existían microorganismos capaces de utilizar los hidrocarburos como fuentes de carbono, ya que éstos fueron estimulados cuando el suelo se adicionó con los hidrocarburos, provocando una multiplicación

exponencial de las poblaciones microbianas, como se puede observar en la Figura 2.

Sin embargo, los microorganismos del suelo reaccionaron de acuerdo al tipo de hidrocarburo agregado y a la presencia de nitrógeno y fósforo (Figura 2). La actividad de la biomasa microbiana podría estar asociada con las estructuras químicas del diesel y del aceite, y en consecuencia en su uso como fuente de energía por los microorganismos del suelo (Fontúrbel, 2004), además de que los niveles de C:N:P se ajustaron a las cantidades del suelo estudiado, los cuales fueron mencionados en el análisis fisicoquímico (Cuadro 1). Normalmente depende del uso de suelo (Ercoli *et al.*, 2001).

El tratamiento que presentó mayor estimulación para las poblaciones bacterianas fue el suelo con diesel más NP (S+D+NP), con un TCR de 0.122 día^{-1} , en los primeros 20 días, posteriormente presentó un TCR de 0.013 día^{-1} , presentando dos etapas de crecimiento exponencial; junto con el S+A+NP, con un TCR de 0.058 día^{-1} (Cuadro 4). Al respecto, estudios hechos por Margesin y Schinner (2001); Mishra *et al.* (2001) demostraron la existencia de un potencial de biodegradación en los suelos, que puede ser incrementado por medio de bioestimulación, al agregar nutrimentos en forma de fertilizantes, ya que naturalmente, los microorganismos del suelo tardan más en realizar el proceso de biorremediación. Además de lo anterior,

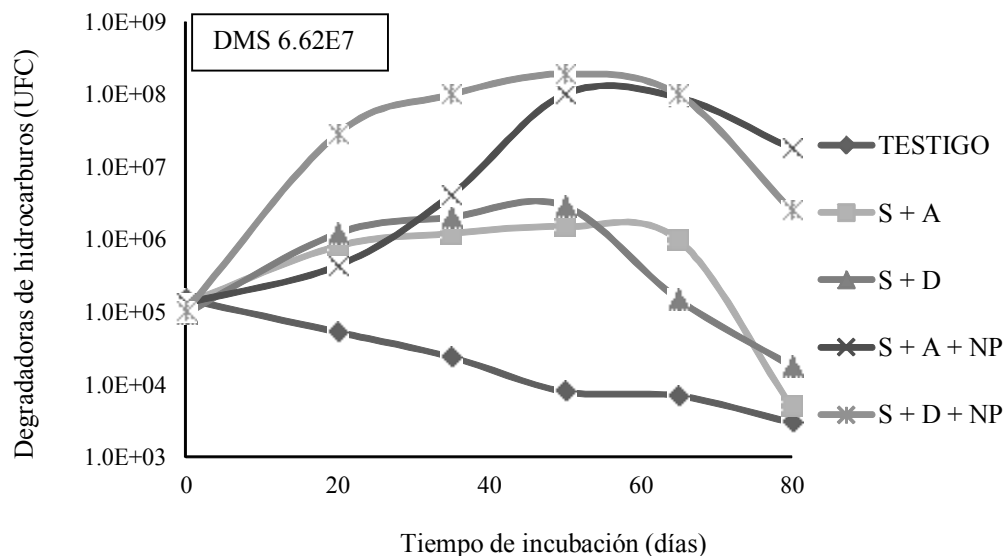


Figura 2. Curvas de crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos expresadas en unidades formadoras de colonia (UFC). S+A = suelo+aceite; S+A+NP = suelo+aceite+nitrógeno y fósforo; S+D = suelo+diesel; S+D+NP = suelo+diesel+nitrógeno y fósforo; DMS = diferencia mínima significativa.

la fuente de nitrógeno es uno de los principales factores limitantes del proceso de biodegradación en sistemas abiertos, ya que se necesita de éste elemento en el proceso enzimático de las bacterias, de igual manera el fósforo, el cual es necesario en la producción de ATP (Koren *et al.*, 2003).

En el caso de los tratamientos que no poseen nutrimentos, la contaminación del suelo con hidrocarburos, generó un cambio en el ambiente del suelo, lo que provocó un TCR más lento en las poblaciones microbianas (con un TCR de 0.0296 día⁻¹ para suelo más diesel y 0.0214 día⁻¹ para suelo más aceite, datos en Cuadro 4). Además, los tratamientos con aceite presentaron un crecimiento más lento que los de diesel. Sin embargo, el testigo al no tener aumento de población microbiana generó una TCR negativa (-0.0256).

Alrededor del día 60 y hasta finalizar el experimento se presentó una disminución en la cantidad de microorganismos para la mayoría de los tratamientos, lo que podría explicarse por la cantidad inicial de los hidrocarburos, los cuales al ser biodegradados y su posterior adsorción en la fase estable sólida del suelo (Mendoza, 1998), limita su acceso para los microorganismos, y disminuye en consecuencia su tasa de biodegradación (Ehlers y Luthy, 2003). Otra explicación podría ser el hecho de que se termina

el balance de macronutrientes, aunado con la producción de sustancias tóxicas por los mismos microorganismos, lo que disminuye la actividad microbiana y empieza la fase de muerte celular (Sutherland, 1992; Maier *et al.*, 2009).

Los resultados de los microorganismos degradadores de hidrocarburos en el suelo de estudio, permitieron evidenciar, a lo largo del tiempo de incubación, los diferentes comportamientos a las nuevas condiciones del medio, fases de estabilidad de biodegradación, así como la fase en que el equilibrio se pierde y empieza la fase de muerte celular.

Cuadro 4. Tasa de crecimiento relativo de los microorganismos degradadores de hidrocarburos de los cinco tratamientos aplicados al suelo.

Tratamiento	Tasa de crecimiento relativo de microorganismos degradadores de hidrocarburos
Testigo	-0.0256 a
S + A	0.0214 b
S + D	0.0296 b
S + A + NP	0.0576 c
S + D + NP	0.0993 d

Resultados con distinta letra son estadísticamente diferentes con una $P < 0.0001$. S+A = suelo+aceite; S+A+NP = suelo+aceite+nitrógeno y fósforo; S+D = suelo+diesel; S+D+NP = suelo+diesel+nitrógeno y fósforo.

Respiración Edáfica

Los resultados indican que la respiración edáfica presentó variabilidad entre tratamientos durante el tiempo que duró el ensayo, mostrando una diferencia altamente significativa entre tratamientos ($P < 0.001$), mostrando una mayor producción de CO_2 en menor tiempo en el tratamiento que contenía diesel y nutrientes (Figura 3). Lo que indica la facilidad de los microorganismos del suelo para biodegradar el hidrocarburo, en comparación con el aceite de lubricación automotriz, esto debido a la estructura del diesel, ya que posee una estructura molecular menos compleja que la del aceite. En los tratamientos de suelo más aceite, suelo más aceite y nutrientes, y suelo más diesel, durante los primeros 20 días hubo una producción de CO_2 más lenta, lo cual puede ser consecuencia de una adaptación microbiana inicial, donde la comunidad de microbios degradadores de hidrocarburos existentes, se adaptan a las condiciones del ensayo, modificando las poblaciones microbianas que lo conforman, sin llegar a una actividad degradativa intensa, como en el caso del tratamiento de suelo más diesel y nutrientes, ya que es evidente, que en este caso, se llevó a cabo una adaptación más rápida, es decir, para los microorganismos resultó más accesible el diesel en presencia de nutrientes, esto debido a la estructura química de los hidrocarburos en cuestión. Con respecto

a lo anterior, Walecka-Hutchison y Walworth (2006) sugieren que a elevados niveles de contaminación puede ocurrir una moderada inhibición inicial de la actividad microbiana y dependerá del tipo de hidrocarburo.

La respiración edáfica en los tratamientos de suelo contaminado con aceite y diesel sin nutrientes, es una manifestación de que los microorganismos no degradan al hidrocarburo debido a que el balance entre el carbono, nitrógeno y fósforo (100:10:1) está alterado y las condiciones de ese ambiente no es el más adecuado para el desarrollo de estas poblaciones microbianas y por lo tanto, de la manifestación de su actividad.

Alrededor del día 75 se presentó una disminución en la producción de CO_2 , debido a que la mayor parte de los hidrocarburos habían sido descompuestos, lo cual coincide con los datos de la concentración de hidrocarburos totales que en ese momento habían bajado de 100 000 a 15 000 mg kg^{-1} . Además, de que en esta fase se acumulan las sustancias de desecho, incluso el pH del medio puede hacerse inadecuado para el crecimiento celular, lo que puede reducir la población de microorganismos degradadores de hidrocarburos (Sutherland, 1992). La respiración edáfica fue afectada por el tipo de hidrocarburo, el diesel es de fracción ligera y el aceite de fracción pesada (SEMARNAT, 2003) similar a lo encontrado por De la Garza *et al.* (2008), y fue incrementada por la adición de nitrógeno y fósforo.

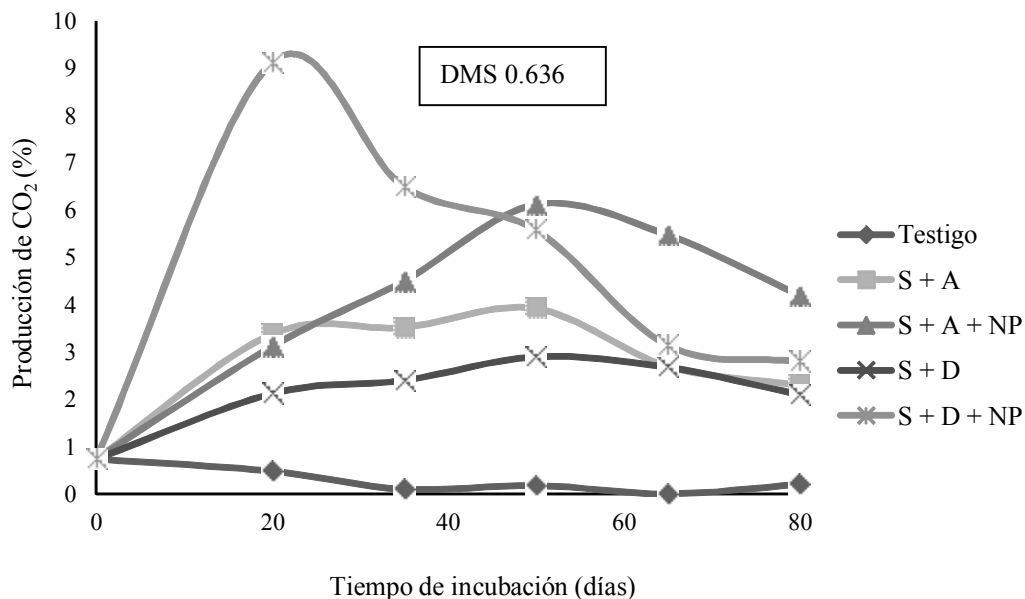


Figura 3. Respiración edáfica medida como producción de CO_2 . S+A = suelo+aceite; S+A+NP = suelo+aceite+nitrógeno y fósforo; S+D = suelo+diesel; S+D+NP = suelo+diesel+nitrógeno y fósforo; DMS = diferencia mínima significativa.

Concentración de Hidrocarburos en el Suelo

Se observó como disminuyó la concentración de los hidrocarburos en el tiempo que permaneció el ensayo en todos los tratamientos en que fueron agregados al suelo (Figura 4), lo que representa la degradación de estos compuestos, notándose el efecto positivo de la adición de nitrógeno y fósforo, en la velocidad de degradación.

Los suelos contaminados con diesel reflejaron una disminución más rápida en el contenido del hidrocarburo, con un comportamiento estable decreciente, sin embargo, el hecho de que no se observó una diferencia significativa entre la presencia o no de nutrientes, puede ser una evidencia de que la aireación favorece la degradación de este producto.

Los tratamientos con aceite, mostraron una disminución más lenta en su contenido en comparación con la del diesel, es decir, se produjo una disminución menor en los valores de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), este retardo en el comienzo de la biodegradación, podría ser consecuencia de la estructura del aceite, el cual posee presencia de metales (SEMARNAT, 2003) los cuales pueden inhibir el crecimiento microbiano (Trindade *et al.*, 2005).

La degradación de ambos tipos de hidrocarburos, es diferente a los 20 días de incubación, mostrando disminución de más del 60% en los tratamientos con diesel. La estructura del hidrocarburo es determinante, sin embargo, aunque el periodo de adaptación haya sido distinto en la mayoría de los tratamientos, una vez que las comunidades bacterianas encuentran un equilibrio, la degradación se da de manera efectiva.

Relación entre Hidrocarburos Totales de Petróleo y Microorganismos Degradadores de Hidrocarburos

Existió una correlación negativa entre los hidrocarburos totales y los microorganismos degradadores en todos los tratamientos a excepción del testigo. Los tratamientos con NP, presentaron una correlación negativa mayor (suelo más aceite más nutrientes -0.7166 y suelo más diesel más nutrientes -0.7402) que los tratamientos no fertilizados (suelo más aceite -0.1986 y suelo más diesel -0.1739), lo que indica que las poblaciones microbianas están limitadas al sustrato, es decir, a la cantidad disponible de hidrocarburos en el suelo, y el hecho de que contaran con nutrientes mejoró la disponibilidad del contaminante como sustrato para las colonias microbianas.

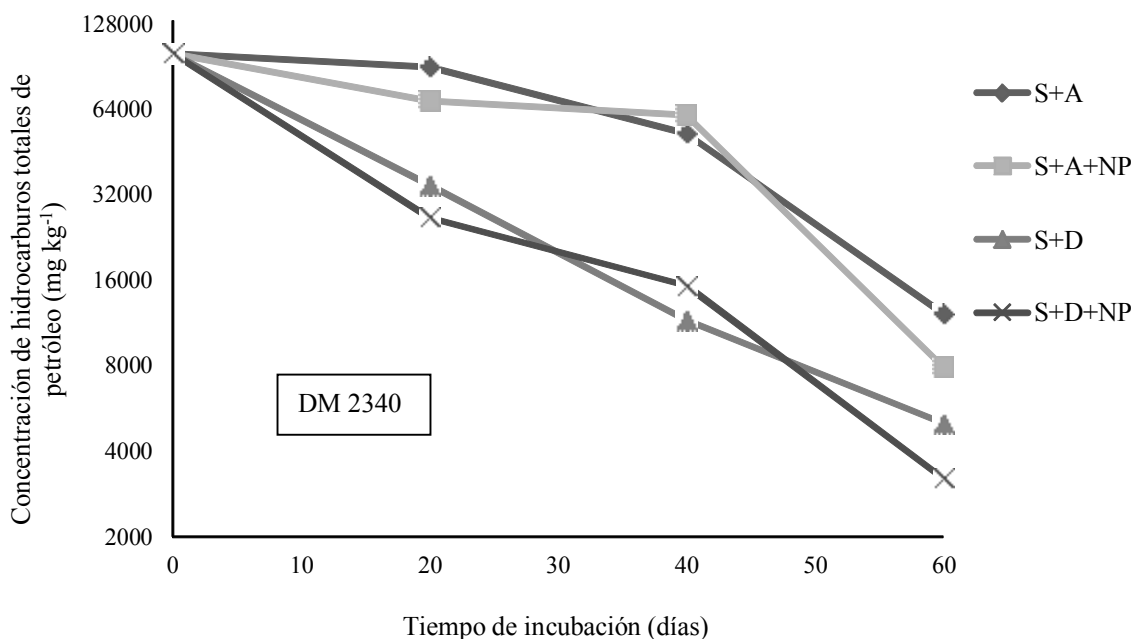


Figura 4. Variación temporal de la concentración de hidrocarburos en el suelo. S+A = suelo+aceite; S+A+NP = suelo+aceite+nitrógeno y fósforo; S+D = suelo+diesel; S+D+NP = suelo+diesel+nitrógeno y fósforo; DMS = diferencia mínima significativa.

CONCLUSIONES

- El diesel y aceite de lubricación automotriz afectaron positivamente a las poblaciones de microorganismos degradadores de hidrocarburos del suelo, estimulando su crecimiento y la actividad biológica, lo que indica que existen en los suelos usados en este ensayo, microorganismos capaces de degradar a estos compuestos y pueden ser usados en procesos de biorremediación.
- El diesel fue descompuesto con mayor facilidad por los microorganismos, debido a su estructura menos compleja que la del aceite y en presencia de nutrientes presentó una descomposición más rápida que sin estos, sin embargo, en ambos casos hubo una degradación eficiente.
- La adición de nutrientes, nitrógeno y fósforo, produjo un efecto positivo en las poblaciones microbianas, y por consecuencia, más actividad microbiana, lo que se refleja en una mayor degradación de los hidrocarburos.

LITERATURA CITADA

- Abaye, D. A. and P. C. Brookes. 2006. Relative importance of substrate type and previous soil management in synthesis of microbial biomass and substrate mineralization. *Eur. J. Soil Sci.* 57: 179-189.
- Alexander, M. 1995. How toxic are toxic chemicals in soil? *Environ. Sci. Technol.* 29: 2713-2717.
- Beadle, C. L. 1993. Growth analysis. pp. 36-46. *In*: D. O. Hall, J. M. O. Scurlock, H. R. Bolh ar-Nordenkampf, R. C. Leegood, and S. P. Long (eds.). *Photosynthesis and production in a changing environment. A field and laboratory manual.* England.
- Bento, F. M., F. A. O. Camargo, B. C. Okeke, and W. T. Frankenberger. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 96: 1049-1055.
- De la Garza, F. R., Y. P. Ortiz, B. A. Mac as, C. García y D. Coll. 2008. Actividad biótica del suelo y la contaminación por hidrocarburos. *Rev. Latinoam. Rec. Nat.* 4: 49-54.
- Ehlers, L. J. and R.G. Luthy. 2003. Contaminant bioavailability in soil and sediment: Improving risk assessment and remediation rests on better understanding bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 37: 295A-302A.
- Ercoli, E., J. Gálvez, M. Di Paola, J. Cantero, M. Medaura y J. Bauza. 2001. Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. Laboratorio de Bioprocesos, reporte especial. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina.
- Félix, J. N., T. C. Gutiérrez, A. P. Lemos, M. J. Ortiz, N. E. Pescador y L. F. Varela. 1996. Manual de laboratorio de ecología microbiana. Instituto Politécnico Nacional. México, D. F.
- Fernández Linares, L. C., N. G. Rojas A., T. G. Roldán C., M. E. Ramírez I., H. G. Zegarra M., R. Uribe H., R. J. Reyes A., D. Flores H. y J. M. Arce O. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos. Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. México, D. F.
- Fontúrbel R., F. 2004. Uso de algunos parámetros indicadores microbiológicos y bioquímicos para la evaluación de la contaminación por hidrocarburos y la biodegradación de los mismos, en la zona del Lago Titicaca. *Ecología Aplic.* 3: 172-179.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de K ppen. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- García, I. C., F. Gil, T. Hernández y M. Muñoz. 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Mundi-Prensa. España.
- Hernández-Acosta, E., M. C. Gutiérrez-Castorena, J. E. Rubi os-Panta y J. Alvarado-López. 2006. Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana* 24: 463-470.
- Knaebel, D. B., T. W. Federle, D. C. McAvoy, and J. R. Vestal. 1994. Effect of mineral and organic soil constituents on microbial mineralization of organic compounds in natural soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4500-4508.
- Koren, O., V. Knezevic, E. Z. Ron, and E. Rosenberg. 2003. Petroleum pollution bioremediation using water-insoluble uric acid as the nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6337-6339.
- Leahy, J. G. and R. R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305-315.
- Maier, R. M., I. L. Pepper, and C. P. Greba. 2009. *Environmental microbiology.* Academic Press. Toledo, OH, USA.
- Margesin, R. and F. Schinner. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3127-3133.
- Marín, J. A., T. Hernández, and C. García. 2005. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environ. Res.* 98: 185-195.
- Mendoza, R. E. 1998. Hydrocarbon leaching, microbial population and plant growth in soil amendment with petroleum. *Bioremediat. J.* 1: 223-231.
- Mishra, S., J. Jyot, R. C. Kuhad, and B. Lal. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate in situ bioremediation of oily-sludge-contaminated soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1675-1681.
- Nilsson, K. S., R. Hyv nen, and G. I. Agren. 2005. Using the continuous-quality theory to predict microbial biomass and soil organic carbon following organic amendments. *Eur. J. Soil Sci.* 56: 397-405.
- Olgu n, E., G. Sánchez-Galv n, and T. Pérez-Pérez. 2007. Assessment of the phytoremediation potential of *Salvinia minima* baker compared to *Spirodela polyrrhiza* in high-strength organic wastewater. *Water Air Soil Pollut.* 181: 135-147.
- Ort nez B., O., I. Ize y A. Gavil n. 2003. La restauraci n de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecol.* 69: 83-92.

- Paumier, V., M. Díaz y A. Núñez. 2007. Caracterización geoquímica del medio ambiente en un yacimiento petrolífero cubano. *Rev. Latinoam. Rec. Nat.* 3: 111-117.
- Prince, R. C., 2005. The microbiology of marine oil spill bioremediation. pp. 317-335. *In*: B. Ollivier and M. Magot (eds.). *Petroleum microbiology*. American Society for Microbiology. Washington, DC, USA.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. *Diario Oficial de la Federación*, 23/04/2003. México, D. F.
- Romaniuk, R., J. F. Brandt, P. R. Ríos y L. Giuffré, 2007. Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos CI. *Suelo* 25: 139-149.
- Serrano, A., M. Gallego, and J. L. González. 2006. Assessment of natural attenuation of volatile aromatic hydrocarbons in agricultural soil contaminated with diesel fuel. *Environ. Pollut.* 144: 203-209.
- Sutherland, J. B. 1992. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Microbiology* 9: 53-62.
- Top, E. M. and D. Springael. 2003. The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14: 262-269.
- Trindade, P., G. Sobral, A. Rizzo, S. Leite, and A. Soriano. 2005. Bioremediation of a weathered and recently oil contaminated soil from Brazil: A comparison study. *Chemosphere* 58: 515-522.
- Volke-Sepulveda, T. y J. A. Velasco-Trejo. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INE-SEMARNAT. México, D. F.
- Walecka-Hutchison, C. and J. Walworth, 2006. Assessment of C:N ratios and water potential for nitrogen optimization in diesel bioremediation. *Bioremediat. J.* 10: 25-35.