

# DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE AGENTES BIOLÓGICOS RESISTENTES Y DEGRADADORES DE HIDROCARBUROS EN EL SUELO MEDIANTE TÉCNICAS FÍSICOQUÍMICAS

---

Francisco E. Fontúrbel Rada<sup>1</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos son sustancias químicas de elevado peso molecular, insolubles en agua y de consistencia viscosa, formadas por largas cadenas de carbono e hidrógeno. Estas sustancias son de gran importancia económica en el mundo actual, puesto que son los combustibles por excelencia que mueven a industrias, maquinarias y medios de transporte.

La necesidad de hidrocarburos para todas las actividades del hombre moderno hace sea necesario transportarlos de un lugar a otro, y si bien en este proceso se toman medidas especiales de seguridad, ocasionalmente ocurren derrames de hidrocarburos, los cuales contaminan los ecosistemas y tienen un efecto funesto sobre las formas de vida que ahí habitan.

Los hidrocarburos son tóxicos para la mayoría de los seres vivos, y en muchos casos llegan incluso a producir la muerte de éstos, además los hidrocarburos aromáticos con agentes cancerígenos en su mayoría (Ray's Environmental Science Web Site 2000). Sin embargo, se ha visto que en prácticamente todos los ambientes naturales existen bacterias capaces de resistir e incluso biodegradar los hidrocarburos a formas menos tóxicas o atóxicas, como ser agua, CO<sub>2</sub> y biomasa (Madigan et al. 1998, Parrish et al. 1999).

En experiencias anteriores y en base a una revisión bibliográfica extensa, se ha visto que existe microorganismos capaces de degradar hidrocarburos en la mayoría de los ambientes naturales, y se trabajó previamente con muestras del altiplano boliviano, de un punto cercano a las orillas del lago Titikaka, donde existen vertientes naturales con hidrocarburos.

La mayoría de las referencias acerca de experiencias realizadas en este campo se desarrollaron sobre aguas, pero son pocos los experimentos realizados sobre suelos. Por ello esta investigación pretende dar parámetros sobre la biodegradación de hidrocarburos en suelos del altiplano, tanto para poseer información base de la zona, como para ayudar a plantear estrategias de mitigación y bioremediación de eventuales derrames de petróleo.

Para ello, se realizó esta investigación, sobre la influencia de los hidrocarburos en la biomasa microbiana en muestras de suelo, expuestas a diferentes concentraciones de petróleo y en diferentes tiempo. Además el estudio se complementa con un estudio de degradación en un medio líquido y un seguimiento por espectrofotometría.

---

<sup>1</sup> P.O. Box # 180, Correo Central, La Paz (Bolivia)

Correo electrónico: biopetrol@unete.com

Teléfono: 015-27586, (02) 353788

Trabajo realizado en la Unidad de Suelos, del Instituto de Ecología –UMSA

En este estudio se pretende determinar la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos en muestras de suelo del altiplano boliviano, por medio de técnicas físico-químicas y analizar los resultados obtenidos relacionando parámetros. Los objetivos específicos planteados son:

- Determinar los parámetros físico-químicos más relevantes de la muestra de suelo (pH, conductividad, humedad, textura).
- Determinar la variación de la biomasa microbiana en muestras de suelo expuestas a hidrocarburos, en diferentes tiempos.
- Determinar si existe variación de pH en diferentes muestras de suelo sometidas a diferentes concentraciones de hidrocarburos, a diferentes tiempos.
- Hacer un seguimiento visual y espectrofotométrico de la degradación de hidrocarburos en un medio deficiente en carbono, inoculado con una solución de suelo.
- Realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sitio y protocolo de muestreo

Las muestras de suelo fueron tomadas en la localidad del altiplano boliviano, cerca de la localidad de Chúa, a orillas del lago Titikaka (Figura 1), cuyas coordenadas son 0525972 / 8210582, a 3845 msnm. Se escogió este sitio para el muestreo, puesto que en época húmeda existen pequeñas vertientes naturales en la que se encuentran restos de hidrocarburos (Figura 2), y por ello se presumen que en este sitio existe una mayor cantidad de microorganismos resistentes y/o degradadores de hidrocarburos. El muestreo fue realizado el día 20 de octubre de 2000.

En el punto de muestreo el suelo era muy fértil, con presencia de numerosas lombrices y estaba cerca de sembradíos. La vegetación más abundante del lugar eran la gramíneas, en especial los géneros *Pennisetum* y *Stipa*. También se presentaban unas pocas compuestas y leguminosas, en las cercanías habían árboles altos de *Eucalyptus*. El suelo era más o menos rocoso, húmedo (se encontraba a unos 200 metros de la orilla del lago y a unos 100m de la carretera).

La muestra se la tomó de manera aleatoria en las proximidades de dos vertientes muy próximas en el sitio de muestreo. Para ello se recolectaron aproximadamente dos kilogramos de suelo, correspondiente a la capa arable (30 cm de profundidad). Con toda la muestra recolectada, se hizo una muestra mixta, que fue guardada a 4°C en bolsa negra hasta el día de los análisis.

**Figura 1.** Sitio de muestreo.



**Figura 2.** Agua con residuos de petróleo superficial, a orillas del sitio de muestreo.



### **Determinación de parámetros físico-químicos**

La determinación de los parámetros físico-químicos iniciales comprenderá la determinación de pH (según Morales et al. 1997), textura y humedad relativa (según Chilón 1996).

Estos datos se utilizaron únicamente para referencia, con excepción del pH, para el cual se realizó un seguimiento, descrito a continuación.

## **Análisis del cambio de biomasa microbiana en el tiempo por influencia de hidrocarburos**

Para la determinación de la biomasa microbiana se empleó el método de Fumigación–Extracción, descrito por Tate et al. (1988) y Jenkinson & Powlson (1976). Se tomaron registros de la biomasa inicial de la muestra sin alterar, y de ésta se separaron 500g de suelo para dos tratamientos: un testigo incubado a temperatura ambiente y exposición solar (para recrear lo más posible las condiciones naturales), y una muestra con hidrocarburos, a razón de 25ml de aceite crudo de motor por cada 100g de muestra.

Ambas muestras fueron incubadas por dos semanas a temperatura ambiente y exposición a la luz (a fin de propiciar fotosíntesis), y posteriormente se realizaron mediciones de biomasa por duplicado durante tres semanas.

## **Análisis del cambio de pH a diferentes concentraciones de hidrocarburos en el tiempo**

El pH de los suelos se midió empleado la metodología descrita en Morales et al. (1997). Para ello se realizaron 4 muestras diferentes, con duplicados. La primera muestra fue un testigo sin hidrocarburos, a la segunda se agregaron 5ml de aceite crudo de motor por cada 100g de suelo, a la tercera 15ml de aceite por 100g de suelo y a la cuarta 25ml de aceite por 100g de suelo. De cada muestra se prepararon 500g.

Se tomó el pH de la muestra original, se dejó incubar dos semanas y se tomaron datos durante tres semanas.

- Un testigo, al cual no se añadirá petróleo.
- Una muestra a la que se agregarán 5ml de petróleo por cada 100g de suelo
- Una muestra a la que se agregarán 15ml de petróleo por cada 100g de suelo
- Una muestra a la que se agregarán 25ml de petróleo por cada 100g de suelo

Se harán 4 a 5 fumigaciones semanales, para determinar la biomasa microbiana en cada una de las muestras. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente y exposición a la luz.

## **Seguimiento del crecimiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos en medio líquido**

Para el seguimiento de la degradación se empleó una variación de la técnica espectrofotométrica de medición de turbidez descrita por Miranda et al. (2000). Para ello se sembró 1ml de una solución saturada de suelo (20g en 50ml de agua destilada) por cada 100ml de un medio deficiente en carbono, descrito por Brown (1994). Se prepara un frasco inoculado y un control, a ambos se añaden 0.6ml de petróleo por cada 30ml de medio a emplear.

La muestra se incuba por espacio de 2 semanas y se realizaron lecturas a 622nm de longitud de onda durante una semana el primer día, a los 3, 4, 5, 6 y 7 días. Las observaciones visuales del cambio de los medios también fue registrado.

## **Análisis estadístico de datos**

Los datos de los parámetros físico-químicos del suelo son únicamente para referencia del estudio. Con los datos de biomasa se trazaron curvas y se hicieron regresiones para ver que tipo de comportamiento presentan los resultados.

Para los datos de biomasa microbiana obtenidos por fumigación-extracción se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) que permita ver si existe una diferencia significativa entre los tratamientos. Con los análisis de pH, se realizaron pruebas de ANOVA para ver si existe diferencia significativa entre los tratamientos y en el tiempo. Se graficaron curvas de los resultados para describir el comportamiento del cambio. También se hizo un análisis de correlación con los resultados de biomasa microbiana.

Con las lecturas obtenidas al espectrofotómetro se vio la forma de crecimiento que presentaron los organismos que se alimentaron de los hidrocarburos en el medio deficiente en carbono.

## **RESULTADOS**

Los resultados obtenidos se detallan siguiendo el orden y la división de la metodología.

### **Determinación de parámetros físico-químicos**

Se determinó el pH de la muestra inicial de suelo, mediante la técnica descrita en Morales et al. (1997), trabajándose por duplicado. Los valores obtenidos fueron de **4.84** y **4.73**, lo cual indica claramente que el suelo era bastante ácido.

La humedad relativa fue determinada por el método de 24 horas en estufa, descrito por Chilón (1996), los valores obtenidos para los duplicados fueron de **15.28%** y **15.04%**.

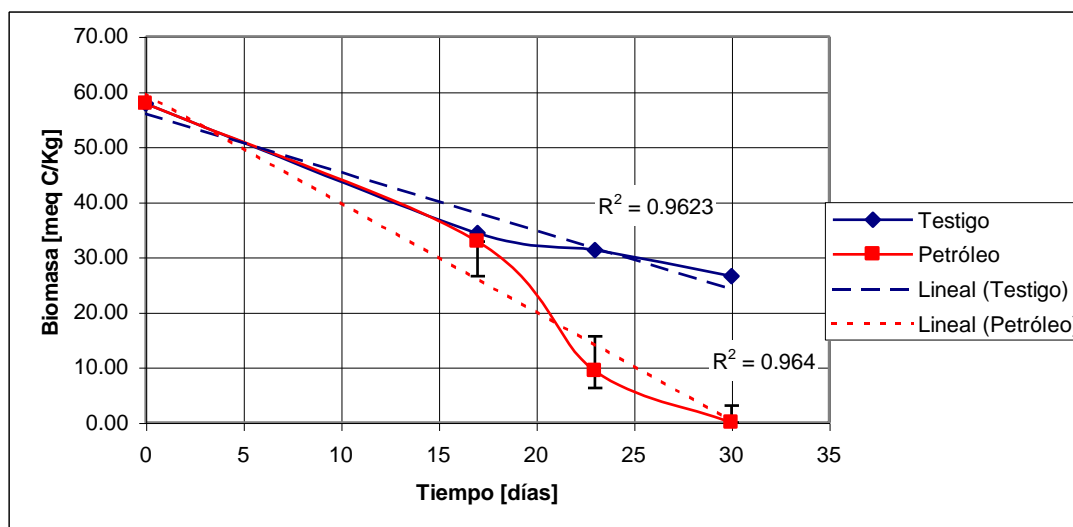
La textura fue determinada por medio del método de tamices descrito por Chilón (1996), la textura determinada fue **suelo arcilloso**.

### **Cambio de biomasa**

El cambio de biomasa en el tiempo se analizó con dos muestras, una testigo sin petróleo, y otra con una elevada concentración de petróleo (25ml de petróleo por 100g de suelo). Los valores obtenidos para biomasa se detallan en la tabla 1 y la interpretación gráfica de los mismos en la Figura 3.

**Tabla 1.** Valores de biomasa obtenidos para las muestras testigo y con petróleo, en cuatro diferentes tiempos de observación. Los valores presentados en esta tabla son promedios de las repeticiones. En algunos casos se descartaron algunos valores dispares atribuibles a errores de procedimiento. Biomasa 0 se refiere a la muestra testigo y biomasa 25 a la muestra con petróleo.

Tiempo [días]	Biomasa 0 [meq C/Kg]	Biomasa 25 [meq C/Kg]
0	57.81	57.81
17	34.38	32.81
23	31.25	9.38
30	26.56	0.00



**Figura 3.** Interpretación gráfica de los resultados obtenidos para variación de biomasa en el tiempo. Se muestran las curvas experimentales (con barras de error) y el ajuste lineal, con el valor de  $R^2$  para cada caso.

En la Figura 3 se pueden observar análisis de regresión lineal para las curvas. Un análisis de regresión más profundo se realizó empleando el software estadístico **Regression Analyzer 3.2**. Dicho software arrojó consideraciones acerca de el grado de ajuste (correlación) al modelo lineal y al modelo exponencial. Los resultados obtenidos se detallan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Coeficientes de correlación calculados con el software Regression Analyzer para las curvas de variación de biomasa para la muestra testigo y para la muestra con petróleo (ver Tabla 1 y Figura 3).

Modelo de regresión	Coefficiente de correlación para la muestra testigo (biomasa 0)	Coefficiente de correlación para la muestra con petróleo (biomasa 25)
Exponencial	0.993799239523295	No se puede aplicar porque existen valores de cero
Lineal	0.980953116049848	0.981809637568253

Ahora bien, también se realizaron análisis estadísticos de ANOVA (análisis de varianza) mediante el software estadístico ESBStats Estándar. E este análisis se comprobó estadísticamente si existe diferencia significativa entre los tratamientos –testigo y petróleo– en los diferentes tiempos de observación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.

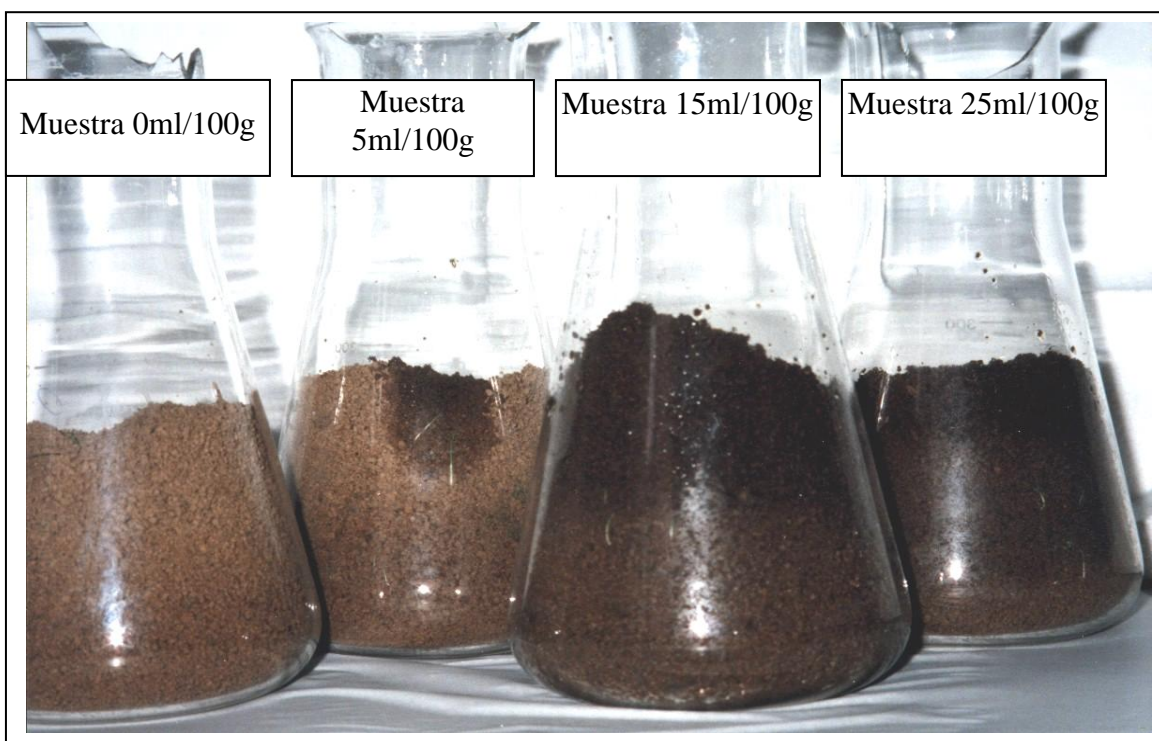


**Tabla 3.** Resultados obtenidos mediante el software ESStats estándar para cálculo de ANOVA para los dos tratamientos (testigo y petróleo) en los diferentes tiempos de observación. El cálculo para el día 0 se omitió al no haber diferencia por ser el día en el que se comenzó el tratamiento.

Tiempo [días]	F calculado	F <sub>1,2;0.95</sub> tabulado	Conclusión
17	0.0623	18.5100	No existe diferencia significativa
23	60.1673	18.5100	Existe una diferencia significativa
30	8809.1630	18.5100	Existe una diferencia significativa

### Cambio de pH

Para la determinación de cambio de pH en el tiempo se trabajó con cuatro muestras: 0, 5, 15 y 25 ml de petróleo por cada 100g de suelo, respectivamente. Estas muestras se ven en la Figura 4.



**Figura 4.** Fotografía de las cuatro muestras de suelo con petróleo usadas para medir la variación de pH en el tiempo. De izquierda a derecha: 0ml/100g, 5ml/100g, 15ml/100g y 25ml/100g.

De estas muestras es necesario resaltar la siguiente observación (observar cuidadosamente la Figura 4) por su importancia y relación con la contaminación y destrucción de suelos por hidrocarburos: las

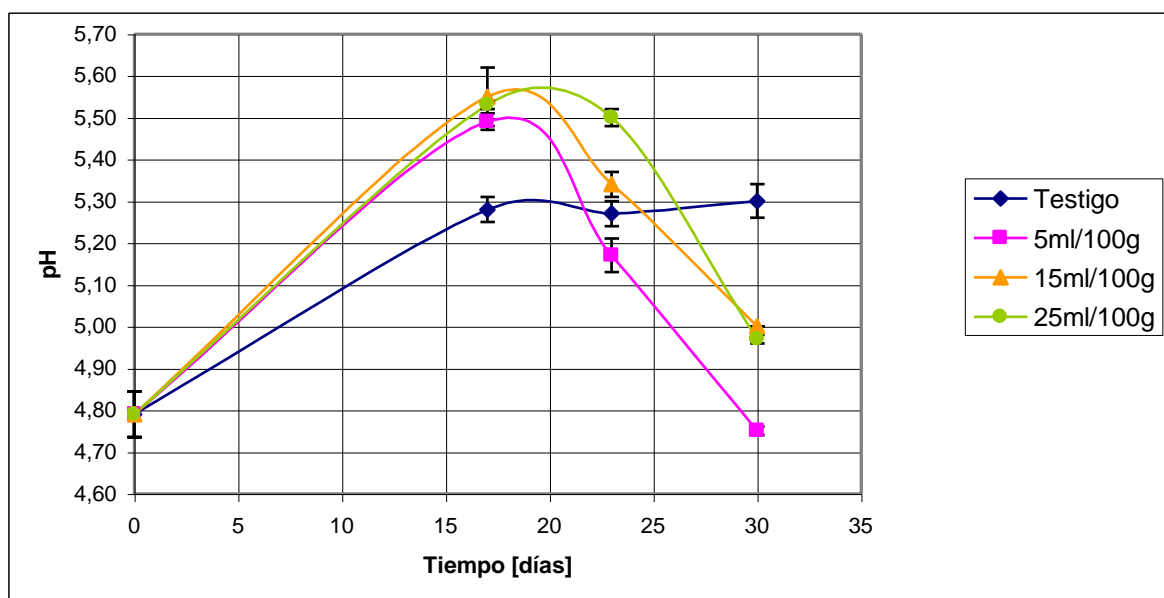
muestras con 0 y 5ml/100g de petróleo tenían la textura y la consistencia de un suelo normal, la muestra de 15ml/100g estaba un poco pegajosa, mientras que la muestra de 25ml/100g estaba sumamente pegajosa, como una masa espesa en la que era difícil separar pedazos para pesarlos e incluso algunos residuos se quedaban adheridos al material en el que se almacenaba, por varios días.

Como se puede ver en la fotografía, el petróleo se escurrió hasta la parte más baja de todos los matraces. Otra observación de importancia es que en los primeros días crecieron plántulas en los frascos (incluso en el de 25ml/100g), las cuales murieron aproximadamente a las dos semanas de incubación.

Volviendo al tema del pH, en la tabla 4 se pueden observar los resultados obtenidos para esta parte del estudio, y en la Figura 5 la interpretación gráfica consiguiente.

**Tabla 4.** Valores de pH obtenidos para los diferentes tiempos y los diferentes tratamientos. Los valores que encabezan las columnas se refieren a la cantidad de petróleo por cada 100g que se administró a cada muestra.

Tiempo [días]	pH testigo	pH 5ml	pH 15ml	pH 25ml
0	4.79	4.79	4.79	4.79
17	5.28	5.49	5.55	5.53
23	5.27	5.17	5.34	5.50
30	5.30	4.75	5.00	4.97



**Figura 5.** Variación del pH en el tiempo para las diferentes muestras. Sobre las curvas se muestran las barras de error para los valores promedio.



De igual manera que para el cambio de biomasa, las diferentes curvas obtenidas (Figura 5) fueron analizadas a profundidad mediante el software estadístico Regression Analyzer 3.2, el cual arrojó los datos que se detallan en la tabla 5.

**Tabla 5.** Coeficientes de correlación calculados con el software Regression Analyzer para las curvas de variación de pH para los diferentes tratamientos (ver Tabla 4 y Figura 5).

Tratamiento	Coefficiente de correlación para el modelo lineal	Coefficiente de correlación para el modelo exponencial
Testigo	0.9233164834865860	0.9227277339793210
5ml/100g	0.0923623835461129	0.0937552403499229
15ml/100g	0.4031557667929120	0.4187159309822970
25ml/100g	0.4020868733493550	0.4131755908550680

Siguiendo el diseño experimental, se realizaron pruebas de ANOVA mediante el software **ESBStats** estándar para determinar si existe una diferencia significativa en el tratamiento por días (Tabla 6) y por tratamiento (Tabla 7).

**Tabla 6.** Resultados obtenidos mediante el software ESBStats estándar para cálculo de ANOVA para los todos los tratamientos (0, 5, 15 y 25ml/100g) en los diferentes tiempos de observación. El cálculo para el día 0 se omitió al no haber diferencia por ser el día en el que se comenzó el tratamiento.

Tiempo de observación [días]	F calculado	F <sub>3,4;0.95</sub> tabulado	Conclusión
17	12.1014	6.5900	Existe diferencia significativa
23	23.0925	6.5900	Existe diferencia significativa
30	140.6959	6.5900	Existe diferencia significativa

**Tabla 7:** Resultados obtenidos mediante el software ESBStats estándar para cálculo de ANOVA para los todos los tiempos (17, 23 y 30 días) en función a los diferentes tratamientos. El cálculo para el día 0 se omitió al no haber diferencia por ser el día en el que se comenzó el tratamiento.

Tratamiento [ml petróleo/100g]	F calculado	F <sub>2,3;0.95</sub> tabulado	Conclusión
0	0.1909	9.5500	No existe diferencia significativa
5	262.8548	9.5500	Existe diferencia significativa
15	44.3561	9.5500	Existe diferencia significativa
25	496.1667	9.5500	Existe diferencia significativa

\* Los valores de F tabulado fueron tomados de Daniel (1996).

Para completar el análisis estadístico de esta parte, se hizo un estudio de correlación entre biomasa y pH (tratamientos 0 y 25ml/100g únicamente) para ver el grado de asociación de estas dos variables. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Resultados obtenidos mediante el software ESStats estándar para cálculo de correlación entre pH y biomasa para los tratamientos 0 y 25ml/100g.

Tratamiento (pH y biomasa)	Correlación
0ml/100g	0.9653
25ml/100g	0.3365

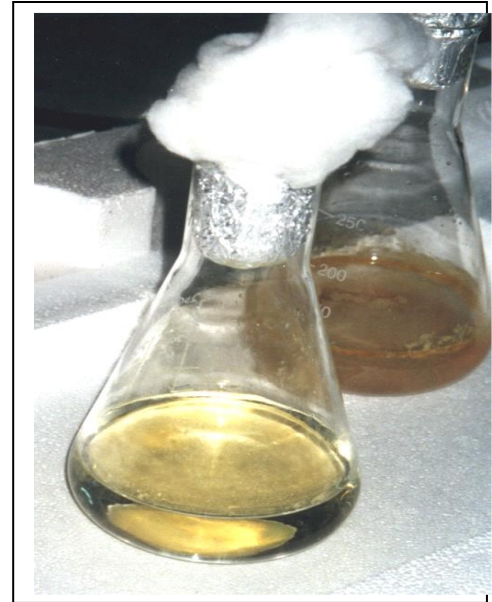
### Seguimiento del crecimiento y la degradación de hidrocarburos en medio líquido

El seguimiento de la degradación de hidrocarburos se lo realizó visualmente. Se prepararon dos matraces con medio de cultivo líquido sin carbono (según Brown 1994) y se puso a cada uno una película de aceite de motor (2 ml). En uno de los matraces se inoculó 1 ml de solución de suelo (20g en 50ml de agua destilada). Se incubaron ambos matraces en la oscuridad y se registraron las observaciones semanalmente, un resumen del diario de registros se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9.** Resumen del diario de registros de las observaciones visuales de la degradación de hidrocarburos en medio líquido deficiente en carbono.

Semana	Observaciones
1 (23 X–30 X)	No se observó gran cambio en la turbidez de los medios. El aceite del matraz inoculado presentó un aspecto ligeramente más opaco.
2 (30 X–6 XI)	El aceite del matraz inoculado se volvió mucho más opaco y se fragmentó en placas. El control mantuvo una película transparente (ver Figura 6).
3 (6 XI–13 XI)	Los fragmentos del matraz inoculado se hicieron más pequeños y presentaban tendencia a adherirse a las paredes del matraz. El control empezó a enturbiarse con una lama blanca, posiblemente un hongo.
4 (13 XI–20 XI)	Los fragmentos del matraz inoculado continuaron reduciéndose. El control se enturbió un poco más y el aceite de éste se tornó ligeramente opaco.
5 (20 XI–27 XI)	El matraz inoculado prácticamente no presenta aceite. El control se mantuvo poco turbio, el aceite opaco comenzó a dar signos de fragmentación.

**Figura 6.** Fotografía de los matraces en los que se observó degradación de hidrocarburos, en la segunda semana de incubación. Nótese que el matraz inoculado (derecha) está considerablemente más turbio que el control (izquierda) y que el aceite de la superficie está fragmentado y opaco, en contraste con el control donde sigue como una capa semi transparente en la superficie del líquido.



Con estas observaciones, se puede estimar a grosso modo una tasa de degradación de hidrocarburos, teniendo en cuenta que el resultado de la prueba de MPN para medios deficientes en carbono con petróleo es de 6.4 millones de microorganismos por gramo (según Achá, comunicación personal). Entonces, la tasa de degradación estimada es:

$$TD = \frac{2ml \text{ aceite}}{34 \text{ días} * 2.56 * 10^6 \text{ microorg}} = 2.298 * 10^{-8} \frac{ml \text{ aceite}}{día * microorg}$$

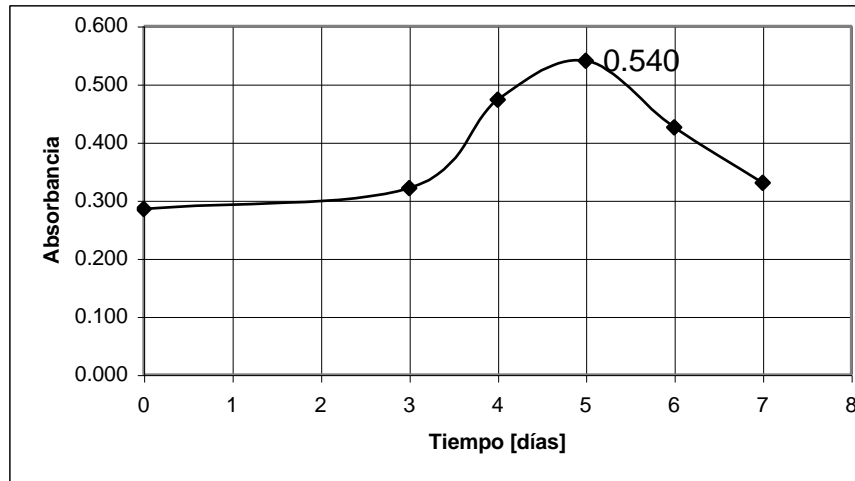
El seguimiento del crecimiento por técnica espectrofotométrica se lo realizó de la segunda a la tercera semana de incubación. Los resultados de absorbancia encontrados se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Valores de absorbancia registrados para la medición de crecimiento de microorganismos por turbidimetría ( a 622nm de  $\lambda$ ) durante 7 días de lectura. El inoculado se tomó como muestra y el control como blanco.

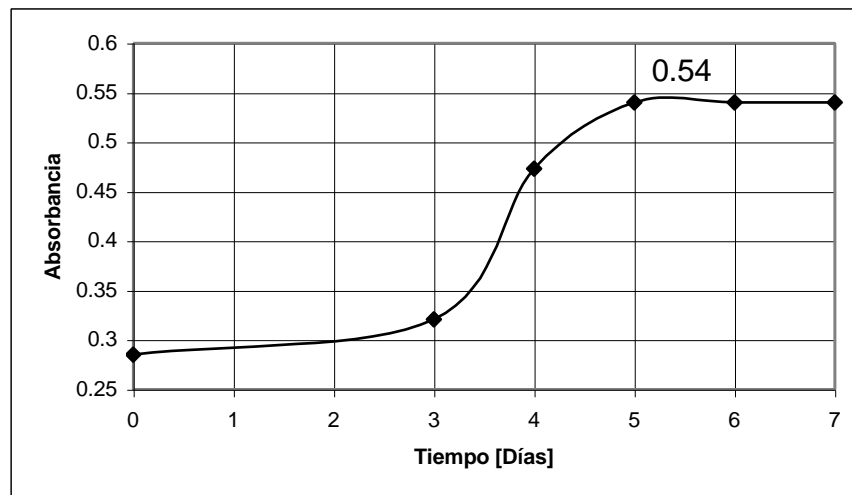
Día	Absorbancia
0	0.285
3	0.321
4	0.473
5	0.540
6	0.426
7	0.330

La gráfica que se obtiene de estos resultados (Figura 7) muestra un rápido crecimiento y un decrecimiento al final. Si se asumen que la absorbancia máxima (0.540) es la capacidad de carga del medio y se desprecian los valores de decrecimiento, entonces se puede ver (Figura 8) que la curva obtenida responde muy bien a la del modelo logístico de crecimiento. Las razones de el decremento final en la absorbancia de debaten más adelante en *Discusiones*.

**Figura 7.** Curva de absorbancia en función al tiempo, de los datos consignados en la tabla 10.



Obsérvese que inicialmente hay un crecimiento, y que los últimos días la absorbancia disminuye.



**Figura 8.** Curva de crecimiento que responde al modelo logístico, asumiendo que la capacidad de carga (K) de la población de microorganismos degradadores de petróleo es 0.540 en Y. En esta curva se asumen los valores decrecientes como si estuviesen en K.

## DISCUSIONES

De manera global, los resultados obtenidos muestra evidencia de dos situaciones: la toxicidad de los hidrocarburos a elevadas concentraciones sobre los microorganismos del suelo, y segundo, la evidencia de una degradación de concentraciones intermedias por parte de algunos de éstos microorganismos.

Los parámetros físico-químicos determinados en la muestra inicial muestran que el suelo con el que se trabajó en el estudio es bastante húmedo y muy ácido. El valor del pH inicial (4.8) es un valor inusual para el Altiplano, puesto que los suelos de esta región son característicamente salinos, o por lo menos cercanamente neutros. Este suelo, sin embargo, es considerablemente ácido porque se encuentra en una serie de condiciones especiales, que no se dan en la mayoría de las regiones del altiplano.

El primero hecho que se debe considerar para explicar la acidez del suelo, es la proximidad del sitio de muestreo al lago Titikaka (el punto de muestreo estaba a unos 200 metros de la orilla del lago) – lo cual también explica la humedad relativamente alta–, y por otro lado debe considerarse que en ese sitio la materia orgánica era abundante, por un lado gracias a la importante contribución que realizan los grandes árboles cercanos a la hojarasca, y por otro lado también es posible que la presencia de hidrocarburos en las vertientes de agua haya condicionado a que éstos suelos sean significativamente ácidos.

Otra posible explicación del pH encontrado en este suelo, que está estrechamente relacionada con los criterios anteriores, es que al ser un suelo arcilloso, la capacidad de intercambio catiónico es mucho más alta que en suelos arenosos y pedregosos, como son la mayoría de los del altiplano.

De todas maneras, el que el suelo sea ácido, por un lado contribuye a pensar que el ambiente es favorable para las bacterias degradadoras del petróleo, puesto que éstas se desarrollan óptimamente en condiciones ácidas (Madigan et al. 1998), y por otro lado el pH inicial del suelo no afecta significativamente el desarrollo del estudio ni los resultados obtenidos.

Ahora bien, con respecto a los análisis de biomasa realizados, hay que considerar varios aspectos:

En este estudio se restringió el análisis de cambio de biomasa en el tiempo a una muestra testigo (sin hidrocarburos) y una muestra con una elevada concentración de hidrocarburos (25ml/100g), los valores intermedios de concentración de hidrocarburos fueron empleados únicamente para estudios de cambio de pH. No se tomaron en cuenta las muestras de concentraciones intermedias por dos razones, la primera, porque ya se cuenta con resultados de un estudio anterior (Achá & Fontúrbel 2000) con información valiosa al respecto (puesto que además que este estudio trabajó con suelo del mismo lugar), y segundo, por razones de limitación de tiempo y material, puesto que trabajar con réplicas de dos muestras más hubiese representado el doble de trabajo, excediendo la capacidad y el tiempo asignado a la presente investigación.

Los resultados mostrados por Achá & Fontúrbel (2000) muestran que luego de tres semanas de incubación, las muestras con concentraciones bajas de hidrocarburos (10 y 15ml/100g) presentan un aumento relativo en la biomasa, luego de la reducción inicial causada por la toxicidad del aceite de motor inoculado a las muestras, en cambio la muestra a la que se agregaron 25ml/100g de aceite de motor no presentó ningún incremento. Este estudio previo, indica que en la primera semana la biomasa desciende proporcionalmente a la concentración de hidrocarburo administrado, pero este descenso se hace menor a la segunda semana y a la tercera semana inclusive se observan incrementos en algunas de las muestras de menor concentración. Esto sugiere un primer indicio de biodegradación.

Ahora bien, los resultados que este estudio arroja sobre la variación de la biomasa en el tiempo, lleva a pensar que 25ml/100g es una concentración demasiado elevada, que resulta tóxica inclusive para los microorganismos resistentes y degradadores de hidrocarburos. Las gráficas de la Figura 3 muestra claramente este descenso, que si bien se comporta de manera lineal para ambos tratamientos (ver Tabla 2), la pendiente de la curva para la biomasa en suelo con hidrocarburos es significativamente mayor a la del testigo, evidenciando un efecto nocivo sobre los microorganismos. La lectura de biomasa para a última semana de observación, muestra que la biomasa en la muestra con hidrocarburos es de cero, y a los 17 días se observa una brusca caída de los valores de biomasa, que coinciden con un fuerte cambio del pH en este mismo tiempo.

Estos resultados sugieren que luego de dos semanas de incubación, los efectos tóxicos de los hidrocarburos se acentúan sobre los microorganismos y producen una drástica reducción de la biomasa. Los análisis de varianza realizados (tabla 3) muestran que en las últimas dos semanas de observación (luego de pasar el día crítico 17) existe una diferencia significativa entre la muestra testigo y la con petróleo.

Además de los análisis estadísticos realizados con los datos de cambio de biomasa en el tiempo, hay que considerar otro factor, anotado en los resultados como observación. La muestra con 25ml/100g de hidrocarburos presentaba una consistencia pegajosa y compacta (ver Figura 4), lo cual también muy probablemente influyó sobre la biomasa microbiana, puesto que además de la toxicidad del aceite, el que se haya perdido la estructura del suelo y se haya transformado en una masa compacta y pegajosa, propicia que la oxigenación en la masa de suelo sea mínima o incluso nula, por lo cual ni siquiera microorganismos degradadores de hidrocarburos pueden crecer, dado que la gran mayoría de estos son aerobios estrictas, y los pocos que se conocen que pueden realizar una degradación anaeróbica tienen también ciertas necesidades de oxígeno (Madigan et al. 1998, Ray's Environmental Science Web Site 2000).

Los resultados y las observaciones realizadas, llevan a pensar lo que sucede a gran escala en un derrame de petróleo. Si la cantidad de hidrocarburos derramados sobre el suelo es poca, entonces el efecto es mucho menor y la biodegradación de los mismos es más factible y rápida. En cambio, el derrame es de cantidades considerables, los efectos tóxicos de los hidrocarburos son mucho más significativos, porque (1) cambian la estructura del suelo a una masa compacta, haciéndolo menos fértil o incluso infértil, puede que superficialmente no se observe el petróleo luego de un tiempo, pero éste es capaz de infiltrarse entre unos pocos centímetros hasta más de un metro bajo la superficie (Ray's Environmental Science Web Site 2000), y aunque no se lo observe, sus efectos nocivos perduran. (2) porque una concentración muy elevada de hidrocarburos resulta tóxica inclusive a las bacterias resistentes y/o degradadoras de hidrocarburos, por lo cual la biodegradación se ve notablemente reducida, o incluso, es posible que no se de, y en estas condiciones resulta mucho más difícil y costoso aplicar técnicas de bioremediación.

En el futuro, sería recomendable realizar también análisis de biomasa microbiana en función al nitrógeno, puesto que el conocimiento de este parámetro ayudaría a corroborar los resultados de biomasa en carbono, ya que existe la posibilidad que el carbono proveniente de los hidrocarburos pueda afectar la determinación por fumigación-extracción, y posiblemente daría sería nuevo parámetro que ayude a determinar el impacto de la contaminación por hidrocarburos sobre el suelo.



Para este estudio, sería recomendable usar una técnica similar a la que se describe en Amato & Ladd (1998).

Ahora bien, los datos de cambio de pH también sugieren varios aspectos. Como se puede ver en la Figura 5, inicialmente existe un incremento en el pH de todas las muestras, durante las dos primeras semanas de incubación, hasta llegar a un valor superior a 5. Este fenómeno puede deberse a una basificación del suelo debida al cambio de condiciones del campo al laboratorio, pues como ya se explicó anteriormente, el pH ácido de las muestras de suelo a un principio estaba determinado por una serie de condiciones ambientales, las cuales se cambiaron en el laboratorio.

Los datos de la Tabla 4 y la Figura 5 muestran, conjuntamente con el análisis estadístico (Tablas 5, 6 y 7) que la variación de pH en la muestra testigo es poco significativa en el tiempo de observación, esta variación incluso puede deberse al error mismo del equipo de medición de pH, esta curva además, es la única que presenta un comportamiento lineal. Las demás curvas (las correspondientes a los tratamientos con diferentes concentraciones de hidrocarburos) presentan un comportamiento peculiar. Las curvas obtenidas para los tratamientos 5, 15 y 25ml/100g muestran un comportamiento parabólico, pero los resultados más interesantes se encuentran después del ascenso de las dos semanas.

El ascenso de las dos semanas es un fenómeno bastante regular para todas las muestras, pero lo importante de esta medición es lo que pasa luego. Como puede observarse en la citada figura, existe luego un descenso del pH, que apoya la existencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos, los cuales están haciendo más ácido su medio como consecuencia de su actividad metabólica.

El comportamiento de descenso de pH para las muestras con hidrocarburos es aproximadamente lineal para todos los casos, pero con diferentes pendientes. Se observa que el pH para la muestra 5ml/100g es el que más desciende a los 30 días, esto podría deberse a que al ser el con menor concentración de hidrocarburos, es también el que soporta una menor presión de la toxicidad y la falta de oxigenación que propicia la presencia de aceite en el suelo, y por lo tanto en esta muestra puede darse una mayor actividad de los microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Para el caso de la muestra 15ml se observa un descenso de pH intermedio entre los tratamientos 5 y 25ml/100g, lo cual sugiere claramente que la actividad metabólica se ha reducido con respecto a 5ml/100g, pero que es mayor que en la muestra con concentración tóxica de aceite. Ahora bien, para el tratamiento 25ml/100g el descenso del pH es considerablemente menor que para los otros casos, incluso el comportamiento de esa parte de la curva (luego del ascenso hasta el final) se ajusta mejor al modelo exponencial que al lineal, aunque la diferencia entre los coeficientes de correlación para ambos casos es mínima. De todas maneras, esto una vez más sugiere que la actividad metabólica de los microorganismos degradadores de hidrocarburos disminuye conforme aumenta la concentración de hidrocarburos.

Por los datos arrojados por las pruebas de análisis de varianza, es posible que el pH sea un parámetro más sensible para medir impacto de la contaminación de suelos por hidrocarburos, que la determinación de biomasa, además de ser más sencillo, rápido y económico. Sin embargo es

necesario realizar todavía estudios más profundos sobre la relación del pH con la contaminación por hidrocarburos, antes de utilizar este parámetro como un indicador.

El análisis de correlación realizado entre los datos de biomasa y pH (Tabla 8), muestra que entre las muestras testigo (0ml/100g) existe una elevada correlación entre la variación de estos parámetros (que varían poco en comparación a las muestras con tratamiento). Las muestras inoculadas con 25ml de hidrocarburos/100g, sin embargo, mostraron una correlación muy baja, por lo cual se debe tener cuidado al momento de utilizar ambos parámetros como indicador de contaminación sin hacer estudios más profundos. Ahora bien, si se descarta el dato del pH inicial, la correlación entre biomasa y pH sube a 0.81, valor que ya se puede considerarse para afirmar que existe relación entre el pH y la biomasa.

La potencialidad de utilizar un índice mixto de biomasa-pH para medir el efecto de diferentes concentraciones de hidrocarburos en el suelo es grande, pero luego de realizar mayores investigaciones en este campo.

Siguiendo con la última parte del estudio, corresponde hablar acerca de la determinación visual de la degradación, y la determinación espectrofotométrica del crecimiento. El seguimiento visual realizado, conjuntamente con un estudio de diversidad y aislamiento de microorganismos degradadores realizado paralelamente al presente trabajo (Achá 2000), muestran claramente que en la muestras de suelo analizadas efectivamente existen microorganismos degradadores de hidrocarburos. Dicho estudio encontró hongos y bacterias con estas capacidades, los cuales fueron aislados y se repitió la prueba visual de degradación descrita en el presente documento, esta vez a pequeña escala, y se observaron fenómenos similares para cada una de las cepas.

Estudios posteriores que deriven de ambos proyectos de investigación podrían llevar a caracterizar estos microorganismos y su efecto sobre los hidrocarburos. En el presente documento, se hace una aproximación –un tanto arriesgada– de una tasa estimada de degradación por parte de estos microorganismos, expresada en ml de hidrocarburo por microorganismo-día. De llegar a obtener valores más exactos y confiables de esta tasa de degradación, para cada una de las cepas, se obtendría información sumamente valiosa para la aplicación de bioremediación en regiones altiplánicas cercanas al lago Titikaka, y el estudio podría extenderse a otras áreas de interés, adicionalmente.

El hallazgo de haber podido observar clara y evidentemente la degradación de hidrocarburos mediante la simple inoculación de solución de suelo respalda la base de supuestos tomados para comenzar este estudio.

La información obtenida acerca de la forma de crecimiento de los microorganismos degradadores de hidrocarburos estudiados es todavía pobre. Sin embargo, da pautas sumamente importantes acerca de la dinámica de estas poblaciones. Se observó un crecimiento típicamente logístico, que tiene un máximo de absorbancia de 0.540, el cual se asumió como la capacidad de carga de la solución deficiente el carbono, la cual –por supuesto– no es un medio ilimitado. La respuesta de crecimiento obtenida fue la esperada y la más lógica para este tipo de formas de vida. Al tener un ambiente con límite (el medio de cultivo) y un recurso alimenticio que no es infinito (el hidrocarburo), inicialmente se da un mayor crecimiento de estos organismos, pero conforme va aumentando la

población, se incrementa la competencia intra e interespecífica, ocasionando un freno en el crecimiento. El descenso de absorbancia observado en los últimos días está relacionado con este razonamiento, puesto que al irse acabando la fuente de energía (el hidrocarburo, que se fue degradando) y al ir reduciendo el volumen del medio de cultivo para ir tomando las lecturas al espectrofotómetro, se redujo la capacidad de crecer de estos microorganismos.

Esto muestra además, que el efecto nocivo de altas concentraciones de hidrocarburos es mayor en suelos que en medios líquidos, puesto que en suelos reduce la aireación e impide en gran medida la actividad metabólica de los microorganismos, los cuales tienen más probabilidades de sobrevivir y metabolizar en un medio líquido.

## CONCLUSIONES

Se evidenció la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos en muestras de suelo del Altiplano mediante el empleo de técnicas físico-químicas, que además mostraron que las concentraciones muy elevadas de hidrocarburos resultan tóxicas inclusive para estos microorganismos, siendo mayor el efecto en suelos que en un medio líquido.

En base a los resultados obtenidos para la variación de la biomasa microbiana y el pH, se vio que el metabolismo de los degradadores en suelos se reduce conforme aumenta la concentración de petróleo, porque éste ocasiona la pérdida de estructura y consiguientemente una falta de oxigenación adecuada. Esta idea lleva a pensar que la magnitud de los derrames condiciona la biodegradación y la bioremediación, puesto que si a cantidad de hidrocarburos que se vierte sobre el suelo sobrepasa los límites de tolerancia, los microorganismos degradadores son incapaces de actuar.

Con los resultados obtenidos y el análisis estadístico realizado, se ve que biomasa y pH son parámetros que pueden ser empleados para la cuantificación del efecto de los hidrocarburos sobre los microorganismos de suelo, inclusive se plantea la posibilidad de crear un índice mixto con estos dos parámetros –en base a estudios posteriores, más profundos– que pueda utilizarse como una medida estandarizada de impacto ambiental para este caso específico.

El seguimiento visual de la degradación de hidrocarburos en un medio líquido con un inóculo de suelo, conjuntamente con los resultados preliminares de un proyecto paralelo, mostraron que existen cepas de hongos y bacterias capaces de degradar hidrocarburos, en las muestras de suelo analizadas.

Este estudio podría derivar en una caracterización microbiológica y bioquímica de estas cepas, que permita contar con información de base para aplicar técnica de bioremediación en el área de estudio, ante un eventual derrame de petróleo. Se observó que las cepas degradadoras de hidrocarburos analizadas, describen un crecimiento de tipo logístico.

## REFERENCIAS

- ACHÁ, D. & F. FONTÚRBEL. 2000. Efectos del petróleo y sus derivados sobre los microorganismos del suelo. Inédito.
- ACHÁ, D. 2000. Determinación de la presencia y aislamiento de microorganismos biodegradadores o resistentes a hidrocarburos. Inédito.
- AMATO, M. & J. LADD. 1988. Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen un extracts of fumigated soils. *Soil. Biol. Biochem.* 20: 107–114.
- BROWN J. 1994. Oil Spill in a Test Tube.  
[http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/AEF/1994/brown\\_oil.html](http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/AEF/1994/brown_oil.html)
- CHILÓN, E. 1996. Manual de Edafología. Ediciones CIDAT, La Paz, pp 69–83, 161–164.
- DANIEL, W. 1996. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. Editorial Limusa, México, p 832.
- JENKINSON, D. & S. POWLSON. 1976. The effects of biocidal treatments on metabolism in sol-I. Fumigation with chloroform. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 8: 167-177.
- MADIGAN, M., J. MARTINKO & J. PARKER. 1998. Brock: Biología de los microorganismos. 8<sup>o</sup> edición, Editorial Prentice Hall, España, pp 150-155, 405-408, 465, 523-524, 582-584, 698, 712-713, 774-777.
- MIRANDA O., J. VALDIVIA & J. A. LINARES. 2000. Estudio del crecimiento de tres poblaciones de *Escherichia coli* (silvestres) mediante modelos de Michaelis–Menten y logístico. *Revista Estudiantil de Biología* 1 (1): 7–13.
- MORALES, I., P. AMURRIO & M. C. RUIZ. 1997. Estudio de la salinidad en los sistemas de suka kollus y pampa en el transcurso de una campaña agrícola, localidad Aygachi. *Ecología en Bolivia* 30: 75–89.
- PARRISH P., J. CLARK & R. PRINCE. 1999. Alaska Oil Spill Bioremediation Monitoring Program: An update.  
USEPA, NHEERL, Gulf Ecology Division, 1 Sabine Island Drive, Gulf Breeze, FL 32561.  
<http://www.epa.gov/ged/publica/c1756.htm>
- RAY'S ENVIRONMENTAL SCIENCE WEB SITE. 2000. Bioremediation and its Application to Exxon Valdez Oil Spill in Alaska.  
<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/2094/bioremed.html>.
- TATE, K., D. ROSS & C. FELTHAM. 1988. A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 329-335.

## AGRADECIMIENTOS

Al Ing. Jaime Chincheros y Sergio Colque por el apoyo técnico. Un agradecimiento muy especial a Lic. Cristina Ruiz y Lic. Isabel Morales por la paciente asesoría y el incentivo para hacer de ésta una investigación de calidad. A Darío Achá por la valiosa información proporcionada.