



UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE AGRONOMIA

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS NATIVAS DE
SUELOS DE LA XII REGIÓN DE CHILE, PARA LA DEGRADACIÓN DE
CRUDOS DE PETRÓLEO.**

Tesis presentada como parte de
los requisitos para optar al grado
de Licenciado en Agronomía.

FABIAN ANDRES MONTENEGRO GALLARDO

VALDIVIA – 2007

CHILE

PROFESOR PATROCINANTE:

Eduardo Valenzuela F.

Lic. Sc., M. Sc. Dr. Cs.

PROFESORES INFORMANTES:

Dante Pinochet T.

Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

Roberto MacDonald H.

Ing. Agr., M. Sc.

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	4
2.1	El petróleo	4
2.2	El petróleo como contaminante orgánico	5
2.3	Influencia del petróleo sobre el suelo	6
2.4	Características edáficas de la XII Región	9
2.4.1	Acidez y salinidad de los suelos en estudio	10
2.4.2	Fertilidad de los suelos en estudio	11
2.4.2.1	Disponibilidad de fósforo	11
2.4.2.2	Disponibilidad de Potasio intercambiable	13
2.5	Microorganismos del suelo	14
2.6	Las bacterias	15
2.7	Distribución y abundancia bacteriana en el suelo	16
2.8	Bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos	18
2.9	Degradación de los hidrocarburos	21
3	MATERIAL Y MÉTODO	24
3.1	Materiales	24
3.1.1	Material biológico	24
3.1.2	Reactivos	24

3.1.3	Equipos	25
3.1.4	Otros	25
3.2	Método	26
3.2.1	Localización del área en estudio	26
3.2.2	Recolección de muestras de suelo	27
3.2.3	Tratamiento de las muestras de suelo	28
3.2.3.1.	Caracterización de los suelos	28
3.2.3.1.1	Determinación de acidez del suelo (pH) medición potenciométrica	28
3.2.3.1.2	Determinación del contenido de bases intercambiables	29
3.2.3.1.3	Determinación del contenido de Aluminio intercambiable	29
3.2.3.1.4	Determinación del contenido de materia orgánica	29
3.2.3.1.5	Determinación de nitrógeno total	30
3.2.3.1.6	Determinación de fósforo disponible mediante el método Olsen	30
3.2.3.1.7	Determinación de la conductividad eléctrica de los suelos	30
3.2.3.1.8	Determinación granulométrica por el Método Day	31
3.2.4	Aislamiento de cepas bacterianas a través del método de las diluciones seriadas	31
3.2.5	Obtención de cultivos puros bacterianos	32
3.2.6	Selección de cepas bacterianas con capacidad para crecer en medio mineral adicionado con petróleo crudo	32
3.2.6.1	Crecimiento en Medio selectivo sólido (AM+P)	32
3.2.6.2	Crecimiento en Medio selectivo líquido (CM+P)	33
3.2.7	Cinética degradativa de petróleo crudo	34

3.2.8	Identificación de cepas bacterianas	34
3.2.9	Diseño experimental y estadístico	35
4	RESULTADOS	36
4.1	Evaluación química de las muestras de suelo de sectores afectados y no afectados con derrames y confinamientos de petróleo crudo	36
4.2	Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas viables de suelos no afectados y afectados con petróleo crudo de tres sectores de la XII Región de Chile	42
4.3	Cultivo y selección de cepas bacterianas en agar mineral adicionado con petróleo crudo (AM + P)	43
4.4	Determinación del crecimiento en caldo mineral adicionado con petróleo crudo (CM + P) de las cinco cepas bacterianas seleccionadas	46
4.5	Determinación taxonómica de las dos cepas bacterianas seleccionadas para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo	47
4.6	Determinación de la degradación de grupos funcionales de petróleo crudo por las dos cepas bacterianas seleccionadas mediante espectrofotometría infrarroja	48
4.6.1	Cinética degradativa de petróleo crudo por <i>Bacillus coagulans</i>	50
4.6.2	Cinética degradativa de petróleo crudo por <i>Bacillus brevis</i>	53
4.7	Determinación de la tasa degradativa para las dos cepas bacterianas	55
4.8	Determinación de la cinética degradativa para las dos cepas bacterianas	57
5	DISCUSIÓN	59
5.1	Evaluación química de las muestras de suelo de sectores afectados y no afectados con derrames y confinamientos de petróleo crudo	59

5.2	Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas viables de suelos no afectados y afectados con petróleo crudo de tres sectores de la XII Región de Chile	65
5.3	Aislamiento, crecimiento, selección y taxonomía de cepas bacterianas pertenecientes a suelos de la XII Región de Chile afectados y no afectados por contaminación con petróleo crudo	67
5.4	Determinación mediante espectrofotometría infrarroja de la degradación de grupos funcionales de petróleo crudo y de la tasa degradativa por las dos cepas bacterianas seleccionadas.	71
6	CONCLUSIONES	77
7	RESUMEN	78
	SUMMARY	80
8	BIBLIOGRAFÍA	81
	ANEXOS	92

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación mundial para petróleos según API	5
2	Distribución de frecuencias en porcentaje para pH al agua (1:2,5)	10
3	Distribución de frecuencias en porcentaje para conductividad eléctrica	11
4	Distribución de frecuencias en porcentaje para Fósforo disponible (P-Olsen)	12
5	Distribución de frecuencias en porcentaje para Aluminio extractable	12
6	Distribución de frecuencia en porcentaje para Potasio intercambiable	13
7	Poblaciones promedios de microorganismos determinados en suelos	14
8	Diseño experimental de degradación de petróleo crudo por dos cepas bacterianas nativas de suelos de la XII Región de Chile	35
9	Resultado análisis químico de suelos afectados y no afectados por contaminación con petróleo crudo	37
10	Poblaciones bacterianas heterótrofas determinadas en suelos de la XII Región de Chile no afectados y afectados por derrames y de petróleo crudo	42
11	Tamaño máximo de colonias bacterianas seleccionadas luego de ser cultivadas en agar mineral adicionado de petróleo crudo (AM + P)	44
12	Análisis estadístico para las 13 cepas bacterianas seleccionadas que presentaron el mayor crecimiento real de colonia (mm^2) en medio agar mineral adicionado con petróleo crudo (AM + P)	45

13	Peso fresco de los cultivos de cepas bacterianas en caldo mineral adicionado de petróleo (CM + P)	46
14	Determinación taxonómica de cepas bacterianas seleccionadas para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo	47
15	Tasa de biodegradación de petróleo crudo por las cepas <i>Bacillus coagulans</i> y <i>Bacillus brevis</i>	56
16	Análisis de degradación de petróleo crudo por <i>Bacillus coagulans</i> y <i>Bacillus brevis</i>	58

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Georreferenciación de los tres sitios de donde se extrajeron las muestras de suelos.	27
2	Espectro infrarrojo de petróleo crudo control “Ostión”.	48
3	Espectro infrarrojo de la cinética degradativa de petróleo crudo Ostión tratado con <i>Bacillus coagulans</i> (Cepa C180)	50
4	Espectro infrarrojo de la cinética degradativa de petróleo crudo Ostión tratado con <i>Bacillus brevis</i> (Cepa C88)	53
5	Cinética degradativa de petróleo crudo por <i>Bacillus coagulans</i> y <i>Bacillus brevis</i>	58

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Medios de cultivos	93
2	Análisis granulométrico de los suelos estudiados	94
3	Crecimiento real para cepas aisladas del suelo Catalina Sur control (0–20 cm) cultivadas en AM + P	95
4	Crecimiento real para cepas aisladas de suelo Catalina Sur control (20–40) cm cultivadas en AM + P	96
5	Crecimiento real para cepas aisladas de suelo Catalina Sur contaminado (0–20 cm) AM + P	97
6	Crecimiento real para cepas aisladas de suelo Catalina Sur contaminado (20-40 cm) en AM + P	98
7	Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Posesión control (0–20 cm) cultivadas en AM + P	99
8	Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Posesión control (20-40 cm) cultivadas en AM + P	100
9	Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Posesión contaminado (0–20 cm) cultivadas en AM + P	101
10	Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Posesión contaminado (20-40 cm) cultivadas en AM + P	102
11	Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Clarencia control (0–20 cm) cultivadas en AM + P	103
12	Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Clarencia control (20-40 cm) cultivadas en AM + P	104
13	Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Clarencia contaminado (0–20 cm) cultivadas en AM + P	105
14	Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Clarencia contaminado (20-40 cm) cultivadas en AM + P	106

15	Rangos de frecuencia en lectura IR para petróleo crudo	107
16	Componentes del petróleo crudo y clasificación de los hidrocarburos	108

1. INTRODUCCIÓN

La actividad petrolera en Chile se encuentra concentrada en la Décima Segunda Región del país, en tres zonas denominadas “distritos”, estos son: Continente, Tierra del Fuego y Costa Afuera. Estos yacimientos de propiedad estatal, son explotados de acuerdo a la legislación vigente por la Empresa Nacional del Petróleo (ENAP).

Esta industria petrolera de más de 50 años cuenta con una amplia gama de infraestructuras; entre otras, baterías de separación, pozos de perforación, refinerías, centrales de almacenamiento, centrales de bombeo y más de 2500 kilómetros de ductos. Todas estas instalaciones presentan un inminente riesgo de sufrir roturas, ocasionando de esta manera, derrames de material hidrocarburo con la posterior contaminación del suelo. Son estos suelos afectados con hidrocarburos, los que deben ser recuperados eliminando la mayor cantidad posible del contaminante.

Para tal fin, hoy se hace indispensable contar con gestiones ambientales eficientes, económicas y ecológicas, para recuperar tales suelos contaminados.

Es bajo esta premisa que se deben implementar tecnologías limpias y naturales para recuperar aquellos ecosistemas perturbados por la actividad petrolera. La biorremediación, mediante el uso de microorganismos es entre otras, una alternativa que puede ser utilizada para la recuperación de suelos contaminados.

La biorremediación bacteriana, hace uso de aquellos microorganismos existentes en el medio ambiente, con el objetivo de degradar sustancias contaminantes o de transformarlas hasta sustancias inocuas al ambiente, que implica para el caso de los hidrocarburos, la formación de dióxido de carbono, agua y biomasa microbial.

Los suelos de la XII Región de Chile perturbados con derrames y confinamientos de petróleo crudo, presentan características únicas, motivo por el cual aquellas soluciones tecnológicas deben ser las apropiadas para las condiciones y características de la zona estepárica fría. De ahí la importancia de contar con microorganismos nativos, que eventualmente podrían ser utilizados a futuro en sistemas de biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo.

De acuerdo a lo señalado se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

Existen, en suelos de la XII Región de Chile, cepas bacterianas con capacidad de degradar o transformar fracciones de petróleo crudo en condiciones de laboratorio.

Para aceptar o rechazar la hipótesis indicada, se plantea el siguiente objetivo general y objetivos específicos.

Objetivo general:

Determinar si cepas bacterianas nativas de suelos de la XII Región de Chile poseen la capacidad de degradar petróleo crudo.

Objetivos específicos:

- Determinar las variaciones en las propiedades químicas de tres suelos de la XII Región afectados por derrames y confinamientos de petróleo crudo.
- Aislar y cuantificar las poblaciones bacterianas de tres suelos de la XII Región de Chile afectados por derrames y confinamiento de petróleo crudo.
- Determinar en las cepas bacterianas aisladas, la capacidad de crecer en medios de cultivos selectivos con petróleo crudo.

- Evaluar mediante una cinética degradativa de petróleo crudo, la capacidad de dos cepas bacterianas seleccionadas para transformar o degradar los constituyentes del petróleo crudo.
- Determinar y cuantificar, mediante espectrofotometría infrarrojo, aquellos grupos funcionales de petróleo crudo degradados por las cepas bacterianas seleccionadas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 El Petróleo.

El petróleo, es una compleja mezcla de hidrocarburos combinados con pequeñas cantidades de otros materiales orgánicos. Los principales elementos presentes son carbono e hidrógeno con heteroelementos de azufre, nitrógeno y oxígeno, los cuales se hallan en pequeñas cantidades (HIGGINS y BURNS, 1975).

Dependiendo del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran el petróleo crudo, se tienen diferentes propiedades que los caracterizan y determinan su comportamiento. Las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno constituyen las parafinas; cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas; al presentarse dobles uniones entre los átomos de carbono se forman las olefinas; las moléculas en las que se forman ciclos de carbono son conocidas como naftenos, y cuando estos ciclos presentan dobles uniones alternas (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos (INSTITUTO MEXICANO DEL PETRÓLEO; IMP, 2002).

La industria mundial de los hidrocarburos líquidos, clasifica el petróleo crudo de acuerdo a su densidad en grados API (parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo que diferencia las calidades del crudo). El Cuadro 1 describe la clasificación mundial para petróleos.

CUADRO 1 Clasificación mundial para petróleos según API.

Petróleo crudo	Densidad (g/cm ³)	Densidad grados API
Extra pesado	> 1,00	10,0
Pesado	1,00 – 0,92	10,0 – 22,3
Mediano	0,92 – 0,87	22,3 – 31,1
Ligero	0,87 – 0,83	31,1 – 39,0
Súper ligero	< 0,83	> 39,0

FUENTE: (IMP), 2002.

Los petróleos crudos de los yacimientos explotados por ENAP Magallanes, corresponden a petróleos parafínicos de cadena larga y responden a la estructura C_nH_{2n+2} . Presentan una densidad API de 31,8° y una densidad de 0,8665 g/cm³ lo que los describe según la clasificación mundial, como petróleos de tipo ligero (GALLEGO¹, 2005).

2.2 El Petróleo como contaminante orgánico.

Un tipo de contaminación exógena, es la que se produce por vertidos de compuestos orgánicos sobre el suelo, como por ejemplo el vertido accidental de hidrocarburos (DOMÉNECH, 1995).

Los hidrocarburos y sus derivados, son sustancias de alto peso molecular mayormente insolubles en agua, que resultan muy tóxicas para los organismos vivos. La mayoría de los microorganismos del suelo no pueden crecer en presencia de los hidrocarburos y mueren, entre estos microorganismos afectados están varios de importancia biológica, como las bacterias fijadoras de nitrógeno (FONTÚRBEL y ACHÁ, 2000). Las especies vegetales también se ven perjudicadas por la adición de petróleo crudo en el suelo. Junto con los efectos fitotóxicos y modificaciones a las

¹ Gallego M. Laboratorio Ingeniería ENAP-Magallanes. Comunicación personal. Enero 2005.

propiedades de los suelos, se suman las condiciones extremas que limitan más aún el crecimiento natural de especies vegetales en la Patagónia: clima árido frío, elevadas amplitudes térmicas, fuertes vientos y sequías (NAKAMATSU *et al.*, 1996).

Sin embargo, una característica común de los hidrocarburos es que son biodegradables principalmente de manera aerobia. Esta tasa de biodegradación aerobia del hidrocarburo dependerá de la complejidad de la molécula. Así, los hidrocarburos muy ramificados o que contienen muchos anillos aromáticos serán difíciles de biodegradar. Uno de los aspectos de su escasa biodegradabilidad es su baja solubilidad en agua, por otro lado, su compleja estructura hace difícil que los organismos encuentren el lugar para realizar el ataque enzimático inicial (RITTMANN, 2001).

2.3 Influencia del petróleo sobre el suelo.

Los compuestos orgánicos pueden interactuar con las partículas edáficas, tanto a través de interacciones de tipo físico como formando enlaces químicos (DOMÉNECH, 1995) como por ejemplo fuerzas de Van der Waals, enlaces hidrogeno, intercambio de aniones, intercambio catiónico e interceptación física (CARLSON, 1998). Las superficies activas implicadas en la interacción de la absorción pueden ser los minerales de arcilla, la fracción orgánica de los suelos, sedimentos, óxidos de fierro y aluminio (CARLSON, 1998). Puede darse de esta manera, que aquel material cargado negativamente sea rechazado por las arcillas pero no lo sea por la materia orgánica del suelo cargada positivamente (Neergaard *et al.* 1996, citado por CARLSON, 1998).

El tamaño de la partícula también tiene una influencia en la absorción. El hecho de que suelos con diferente tamaño de partículas tengan una absorción distinta, radica en que partículas más pequeñas tienen mayor área superficial. Otra explicación podría ser que diversos tamaños de partículas corresponden a diversos minerales que tienen características distintas (Chakrabarti y Banerjee *et al.* 1991, citado por CARLSON,

1998). Para GUTIÉRREZ y ZABALA (2001), las arcillas presentan más superficies activas que las arenas, lo que permite que los hidrocarburos sean absorbidos y acumulados en el suelo. Los suelos arenosos presentan un eficiente drenaje y pocas superficies activas, condiciones que evitan la acumulación de los hidrocarburos en los perfiles más superficiales de suelo y facilitan el negativo movimiento del hidrocarburo a profundidad.

La temperatura es otro parámetro importante que influye en la absorción. Para la mayoría de los compuestos, la absorción disminuye con el aumento de la temperatura (Hulscer y Cornelissen, 1996, citado por CARLSON, 1998).

Para Pignatello y Xing (1996), citado por CARLSON (1998), el factor tiempo también es importante para la interacción de la absorción. Mientras mayor tiempo haya transcurrido desde que el compuesto se depositó en el suelo, más difícil y largo se hace un proceso de biorremediación producto de la fuerte absorción del hidrocarburo con las partículas edáficas.

Las características del material hidrocarburo como su carácter químico, configuración, solubilidad en agua, distribución de la carga, tamaño molecular y polarización también influyen en el grado y en el índice de absorción. Se hace necesario por tanto, conocer la influencia del material hidrocarburo sobre el suelo, considerando que todos los suelos en su estado natural, presentan propiedades definidas y que son alteradas en función del tipo y concentración del contaminante (MARTÍNEZ y LOPEZ, 2001).

MARTÍNEZ y LÓPEZ (2001), en un estudio sobre los efectos de los hidrocarburos sobre las propiedades físicas y químicas de un suelo arcilloso, analizaron si en estos suelos existían modificaciones en clase textural, porosidad y densidad

aparente, así como también las variaciones en el pH y conductividad eléctrica. Similarmente, en otro experimento llevado a cabo por PALA *et al.* (2002) en Brasil, se determinó la variación en las características de un suelo arcilloso impactado con petróleo crudo. Los parámetros estudiados fueron densidad, pH, nitrógeno total, fósforo disponible, carbono orgánico y contenido de petróleo en el suelo, siendo estos dos últimos parámetros indicadores de contaminación de suelo por hidrocarburos.

Desde una perspectiva microbiológica, Jones (1977), citado por OKPOKWASILI y AMANCHUKWU (1988), observaron como un suelo afectado con hidrocarburo modificaba su población bacteriana al compararlo con un suelo no afectado por el contaminante (suelo control). Sin embargo, el nivel de actividad de ciertos microorganismos no se vio perjudicado por la polución.

Así, la contaminación de suelos por hidrocarburos puede tener un pronunciado efecto de toxicidad sobre los microorganismos y mortandad de la vegetación por efectos fitotóxicos. En Chile, esto se puede ver agravado especialmente en la Patagónia, pues es un ecosistema sumamente frágil y que presenta además, condiciones climáticas extremas que limitan naturalmente el crecimiento vegetal (LUQUE, 1997). De acuerdo a esto, resulta fundamental para la planificación de cualquier sistema de remediación de suelos afectados por derrames o confinamientos de petróleo crudo, conocer el efecto del contaminante sobre las características físicas, químicas y biológicas del suelo.

2.4 Características edáficas de la XII Región de Chile.

Las agrupaciones de suelos establecidas para la región de Magallanes corresponden a los grandes grupos de suelos de la clasificación Americana y que concierne a: suelos castaños, suelos de praderas (praderas con pH mayor que 6, praderas con pH entre 5,7 y 5,9 y praderas con pH menor que 5,7), suelos pardo-podsólicos, suelos podsoles, suelos de praderas alpinas y vegas no salinas (SÁEZ, 1995).

Los suelos correspondientes al sector Posesión y Catalina Sur, son clasificados como suelos castaños. Según el estudio de los grandes grupos de suelos de la región de Magallanes (el cual comprendió un estudio total de 2.555.555 hectáreas) se indica que estos suelos ocupan en la región, una superficie de 518.000 hectáreas, los cuales se distribuyen ocupando la región occidental de la pampa y son utilizados principalmente para la explotación extensiva de ganado ovino. Corresponden a suelos con una estrata superficial pardo oscura que los diferencia de los suelos de praderas de color negro. Su vegetación es el coironal típico bajo la isoyeta de los 300 metros (SÁEZ, 1995). Estos a la vez y según CHILE, SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (2004), son suelos que presentan una textura con predominancia de arena, delgados y con topografía plana no sujeta a inundaciones.

Por otro lado, el suelo correspondiente al sector denominado Calentador 18-Clarencia, se clasifica como un suelo de pradera. Estos suelos, abarcan la mayor superficie regional y se encuentran ubicados entre los suelos castaños y los suelos podsólicos, en la transición estepa-bosque entre la isoyeta de los 300 y 400 metros. Los suelos de pradera ocupan según NACIONES UNIDAS (1958), una superficie de 590.000 hectáreas y se distribuyen tanto en el sector continental como en la isla de Tierra del Fuego, ocupando gran parte de la región fisiográfica de las planicies orientales junto a los suelos castaños (SÁEZ, 1995). Textualmente presentan predominancia de arcilla, topográficamente presentan iguales características a los suelos castaños aunque no descarta inclusiones de suelos de vega, que si pueden presentar problemas de inundación en determinadas épocas del año (CHILE, SERVICIO AGRÍCOLA Y

GANADERO, 2003) y al igual que los suelos clasificados como castaños, son utilizados principalmente para ganadería ovina de tipo extensiva.

2.4.1 Acidez y salinidad de los suelos en estudio.

Tanto los suelos castaños como la mayoría de los suelos de pradera, presentan valores de pH superiores a 5,5 además de una baja concentración de aluminio (SÁEZ, 1995).

En el Cuadro 2, se aprecia la distribución de frecuencias (del total de suelos estudiados) en cuanto a pH al agua (1:2,5) para las agrupaciones de suelos castaños y suelos de praderas.

CUADRO 2 Distribución de frecuencias en porcentaje para pH al agua (1:2,5).

Agrupación de Suelos	Distribución de frecuencias en porcentaje (%)			
	pH			
	<5	5-5.5	5.6-6.0	>6.0
Castaños	0	2	36	62
Praderas				
pH > 6,0	0	0	16	84
pH 5,7 – 5,9	0	0	100	0
pH < 5,7	5	55	41	0

FUENTE: SAEZ (1995).

La acumulación de sales para las dos agrupaciones de suelo estudiadas, se encuentra ligadas a antiguas lagunas secas que contenían agua de mar y a veces con acumulación de agua transitoria o semipermanente en depresiones derivadas en general, del relieve glacial. Esta acumulación de sales ya sea con una alta o baja precipitación, esta estrechamente relacionado tanto con el relieve como con el sustrato de los suelos (SÁEZ, 1995).

En el Cuadro 3 se presenta, en relación al total de suelos estudiados por SAEZ (1995), la distribución de frecuencias de los valores obtenidos de conductividad eléctrica como índice de salinidad para las agrupaciones de suelo castaños y suelos de praderas.

CUADRO 3 Distribución de frecuencias en porcentaje para conductividad eléctrica.

Agrupación de Suelos	Distribución de frecuencias en porcentaje (%) conductividad eléctrica (mmhos/cm)			
	<0,40	0,41 – 0,80	0,81 – 1,20	> 1,20 < 4
Castaños	83	14	2	0
Praderas				
pH > 6,0	43	49	7	1
pH 5,7 – 5,9	69	22	9	0
pH < 5,7	70	26	2	3

FUENTE: SAEZ (1995).

2.4.2. Fertilidad de los suelos en estudio.

2.4.2.1. Disponibilidad de fósforo. Los suelos que no presentan un historial de fertilización tienen en general, una baja disponibilidad de fósforo (P). Esto se debe a que los minerales que contienen fósforo en el suelo son escasos y su solubilidad es muy baja. En el Cuadro 4, se presenta la distribución de frecuencia de los contenidos de fósforo disponible (P-Olsen) para las dos agrupaciones de suelo bajo análisis y en relación al total de muestras de suelos estudiadas.

CUADRO 4 Distribución de frecuencias en porcentaje para fósforo disponible (P-Olsen).

Agrupación de Suelos	Distribución de frecuencias en porcentaje (%) fósforo disponible P-Olsen (ppm)			
	<5	5.1-10	10.1-15	>15
Castaños	60	40	0	0
Praderas				
pH > 6,0	41	16	11	32
pH 5,7 – 5,9	42	30	6	22
pH < 5,7	38	42	8	12

FUENTE: SAEZ (1995).

En el Cuadro 5, se muestra la distribución de frecuencia de los valores de aluminio extractable como índice de la capacidad de retención de fósforo.

CUADRO 5 Distribución de frecuencias en porcentaje para aluminio extractable.

Agrupación de Suelos	Distribución de frecuencias en porcentaje (%) aluminio extractable (ppm)			
	<200	201 - 600	601 - 1000	>1000
Castaños	100	0	0	0
Praderas				
pH > 6,0	95	5	0	0
pH 5,7 – 5,9	69	30	2	0
pH < 5,7	47	48	5	0

FUENTE: SAEZ (1995).

Los suelos castaños presentan una baja capacidad de retención de fósforo, similar a la de los suelos aluviales de la depresión intermedia en la V región de Chile (Rodríguez, 1993 citado por SÁEZ, 1995). En los suelos de pradera se observa una estrecha relación entre el pH y el aluminio extractable. A medida que disminuye el pH aumenta el porcentaje de muestras en las categorías de alta capacidad de retención. Sin embargo, las muestras de los suelos de pradera se encuentran en alrededor del 30 % en la categoría de capacidad media de retención, similar a la de los suelos aluviales de la VI y VII región de Chile, en la depresión intermedia (SÁEZ, 1995).

2.4.2.2. Disponibilidad de potasio intercambiable. La disponibilidad de potasio intercambiable en los ecosistemas naturales, se encuentra directamente relacionada con el grado de lavado de bases de los suelos, vinculados a la precipitación y al material generador (SÁEZ, 1995). En el Cuadro 6, se presenta la distribución de frecuencias del contenido de potasio intercambiable para suelos castaños y suelos de praderas.

CUADRO 6 Distribución de frecuencia en porcentaje para potasio intercambiable.

Agrupación de Suelos	Distribución de frecuencias en porcentaje (%) potasio intercambiable (ppm)			
	< 100	101 - 150	151 - 200	> 200
Castaños	0	7	7	86
Praderas				
pH > 6,0	6	1	9	84
pH 5,7 – 5,9	9	16	17	58
pH < 5,7	12	27	11	50

FUENTE: SAEZ (1995).

2.5 Microorganismos del suelo.

Para los microorganismos, el suelo no solo aporta la materia necesaria para la síntesis de sus células, sino que también la energía para sus actividades vitales. Las características físicas y químicas del suelo, van a determinar el ambiente en el que se desarrollan los microorganismos. Dichas características afectan la composición de la comunidad microbiana tanto cuantitativa como cualitativamente (ALEXANDER, 1961).

En el Cuadro 7 se presenta una estimación del número de microorganismos presentes en forma natural en los suelos.

CUADRO 7 Poblaciones promedios de microorganismos determinados en suelos.

Poblaciones promedios de microorganismos de suelo superficial		
Organismos	Valores típicos (células / g de suelo)	Extremos (células / g de suelo)
Bacterias	0.1 – 1 billones	> 10 billones
Actinomicetes	10 – 100 millones	100 millones
Hongos	0.1 – 1 millones	20 millones
Algas	10000 - 100000	3 millones
Subsuelo (células / g de suelo)		
Bacterias	1000 – 10 millones	200 millones

FUENTE: Dragun (1988), citado por SARUBBI (2000).

2.6 Las bacterias.

Las bacterias son microorganismos procariotas que constituyen un grupo muy heterogéneo de organismos y predominan en el suelo por sobre los demás grupos de microorganismos. Según ALEXANDER (1961), la determinación del número total de bacterias presentes en el suelo se hace muy difícil y solo es posible lograr determinar solo algunas poblaciones de estas.

Las bacterias en el suelo, además de requerir nutrientes para generar su energía y multiplicarse, demandan de un entorno químico y físicamente adecuado para vivir. La temperatura, el pH, presión parcial de oxígeno y la presión osmótica son fundamentales para la sobrevivencia bacteriana (RITTMANN, 2001). De acuerdo a lo anterior, pueden mencionarse dos grandes poblaciones bacterianas presentes en los suelos y en estrecho vínculo con sus propiedades: bacterias autóctonas, que son residentes verdaderos del suelo y aquellas bacterias alóctonas.

Las poblaciones autóctonas o nativas pueden presentarse en estados de resistencia y perdurar por largos periodos de tiempo en el suelo. Estos microorganismos son naturales de un hábitat determinado; en él pueden sobrevivir, crecer y realizar sus actividades metabólicas, ocupando los nichos ambientales disponibles para las poblaciones microbianas de un ecosistema dado. Estos organismos presentan generalmente características adaptativas que los hacen fisiológicamente compatibles con su ambiente físico y químico (ALEXANDER, 1961). Por otro lado, las poblaciones alóctonas, son miembros temporales de un hábitat y no ocupan los nichos funcionales del ecosistema. Por regla general, estos microorganismos han proliferado en otro lugar y han sido transportados a un ecosistema que les resulta extraño, lo que no descarta su variabilidad en el tiempo; algunos pueden desaparecer en menos de 24 horas, mientras que otros pueden presentar adaptaciones a su nuevo medio y perdurar en él por largos períodos de tiempo (ATLAS y BARTHA, 2002).

Dentro del grupo de las bacterias, se encuentran aquellas formadoras de esporas y aquellas no formadoras de esporas, con forma de cocos, bacilos y espirilos. Estas varían en el suelo en tamaño, forma, requerimientos de oxígeno (aerobias y anaerobias), obtención de carbono (autótrofas y heterótrofas) y su relación con plantas y animales (saprofitos y parásitos). Los bacilos se encuentran en mayor proporción en los suelos y tienen la capacidad de persistir en estos bajo situaciones desfavorables o extremas, mediante la formación de esporas de resistencia que funcionan como parte del ciclo de vida de dicho microorganismo.

Las bacterias son consideradas los componentes más importantes del grupo total de microorganismos del suelo. Así, de todas las actividades del suelo vinculadas a microorganismos, las bacterias son responsables de las más importantes (ALEXANDER, 1961).

2.7 Distribución y abundancia bacteriana en el suelo.

Se ha observado en consecutivos estudios en microbiología de suelos como a medida que existe un aumento tanto en altitud como en latitud, el número de bacterias del suelo decrece, concluyendo de esta forma que suelos bajo condiciones climáticas extremas presentan una menor población microbiana (HATTORI, 1973). ALEXANDER (1961), corrobora que la cantidad de bacterias en un suelo aumenta de zonas frías a zonas más cálidas así como también con el aumento en el contenido de la materia orgánica de los suelos.

Las variaciones de las estaciones del año sobre las poblaciones microbianas son difíciles de determinar, sin embargo, un “peak” en el número de estos se observa a menudo en primavera, probablemente como una respuesta al incremento de la temperatura y a un aumento en las entradas de material para la descomposición.

Aquellos suelos sometidos a bajas temperaturas en invierno, muestran un “peak” en la población microbiana inmediatamente después del deshielo primaveral. Se piensa que junto con un aumento en la temperatura, se añade la mayor disponibilidad de nutrientes producto de la ruptura física de la estructura del suelo (GRANT, 1981).

Las bacterias también presentan una distribución de tipo vertical en el perfil del suelo. La tasa de decrecimiento en el número de microorganismos a medida que aumenta la profundidad del perfil de suelo puede ser muy dependiente de varios factores, incluyendo los de tipo edáfico (HATTORI, 1973). Así, en todos los suelos, el mayor número de microorganismos se encuentra en la capa superior, que corresponde a la zona más rica en humus (GRANT, 1981).

La capacidad de absorción de las bacterias al suelo y sus numerosos microhábitat, también determinará en gran medida el número de bacterias y la relación existente entre estas y el suelo (ATLAS y BARTHA, 2002). Esto se debe, según ALEXANDER (1961), a que las bacterias en el suelo se encuentran rara vez en fase líquida, si no que mayormente adheridas a los coloides del suelo. Así mismo, la cantidad y el tipo de bacterias presentes en un determinado suelo esta dada por el tipo de suelo y las prácticas culturales que en el existen. La carga superficial de la célula, hidrofobia y estructuras extracelulares como polisacáridos y flagelos, más la carga eléctrica del coloide determinan en gran medida esta absorción (CARLSON, 1998).

Por otro lado, las células bacterianas no siempre se encuentran distribuidas uniformemente en el suelo, muchas de ellas se encuentran en áreas pequeñas de unos cuantos centímetros cuadrados, lo que se conoce como micro distribución bacteriana del suelo (HATTORI, 1973).

2.8 Bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos.

Ambientalmente, las bacterias son muy importantes, pues tienen la capacidad de transformar una gran variedad de contaminantes orgánicos e inorgánicos a sustancias inocuas, que pueden ser reciclados al medio ambiente. Aquellas bacterias disponen de la capacidad de oxidar una gran cantidad de compuestos orgánicos producidos y utilizados industrialmente (RITTMANN, 2001). Se estima, que de todos los microorganismos presentes en el suelo, las bacterias son aquellas que se presentan en un mayor número y también las más importantes en la degradación de hidrocarburos (SARUBBI, 2000).

El fundamento de la degradación bacteriana de hidrocarburos, se basa en la utilización de estos por los microorganismos como fuente de carbono y energía. Los hidrocarburos en efecto, proveen de alimento a ciertas bacterias y microorganismos (AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE, 1972).

Beerstecher (1954), citado por SHARPLEY (1966) estima que del total de microorganismos conocidos, un número considerable de especies son capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente nutricional. Estos microorganismos logran sobrevivir en hábitat contaminados pues son capaces de utilizar metabólicamente este recurso, de esta manera, el contaminante se transforma a la vez en una potencial fuente de energía (Madigan, 1998 citado por ILYNA *et al.*, 2003). Parrish *et al.* (1999) citado por FONTÚRBEL y ACHÁ (2000), expresan que existen ciertas bacterias capaces de degradar hidrocarburos de petróleo, y que luego de una exposición por un periodo de tiempo determinado a éstos, son capaces de adecuarse y aumentar su población. Lo anterior explicaría que la mayoría de los microorganismos, si son capaces de sobrevivir en ese ambiente, pueden degradar a aquellos compuestos sin mayor inconveniente (BURGOS, 1999).

Esta tolerancia microbiana a la presencia de hidrocarburos de petróleo en el suelo, induce a la selectividad y a la disminución de la diversidad. Los microorganismos tolerantes a este ambiente de estrés, desarrollan y utilizan respuestas enzimáticas y

fisiológicas especializadas para la degradación del hidrocarburo (Atlas *et al.* 1991, citado por RIVERA-CRUZ *et al.* 2002).

De todos los factores necesarios para desarrollar un sistema de biorremediación, es de importancia inmediata conocer la presencia o ausencia de una población bacteriana capaz de degradar el residuo peligroso (LEVIN y GEALT, 1997). Para RITTMANN (2001), incluso a pesar que un contaminante sea fácilmente biodegradable, la ausencia de población microbiana con capacidad degradativa puede constituirse en un factor limitante para la biorremediación del suelo afectado.

Se hace necesario por lo tanto, realizar antes de comenzar un proyecto de remediación biológica, un estudio de factibilidad para caracterizar las propiedades específicas del sitio. Así, no solo la determinación de las propiedades físicoquímicos del material a remediar es importante, otra caracterización no menos importante es la determinación de los potenciales microorganismos del sitio con capacidad de utilizar los hidrocarburos (ADAMS, 1999).

LEVIN y GEALT (1997) estiman que son varios los microorganismos capaces de llevar a cabo este proceso degradativo. En algunos casos se han identificado y caracterizado, mientras que en otros ha sido extremadamente difícil cultivarlos e inclusive aislarlos. Para tal objetivo, la primera etapa la constituye la toma de muestras representativas, cuyos resultados se aplican a la totalidad de la comunidad o del ecosistema. Cada muestra es, por necesidad, minúscula en comparación con todo el medio; por lo tanto puede llevar a resultados poblacionales muy por encima o muy por debajo de la abundancia real (ATLAS y BARTHA, 2002).

El aislamiento y selección de bacterias a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivos puros ricos en petróleo crudo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y sobrevivencia de cepas tolerantes a concentraciones altas de petróleo (RIVERA-CRUZ *et al.*, 2002).

ILYINA *et al.* (2003) aislaron en medios selectivos usando diferentes hidrocarburos de petróleo, cepas bacterianas de suelos afectados por derrames de hidrocarburos de petróleo sometidos a biorremediación. Todas las cepas aisladas fueron sometidas posteriormente a pruebas de degradación en suelo bajo condiciones de laboratorio, a fin de determinar las mejores en la labor degradativa. De manera similar, CUBITTO y CABEZALI (2000), aislaron una cepa bacteriana que utiliza ciertos compuestos orgánicos, principalmente hidrocarburos lineales. La idea del estudio fue la identificación taxonómica de esta cepa y evaluar la actividad hidrocarburofítica de la misma sobre petróleo crudo. ALTAMIRANO y POZZO (2000), aislaron e identificaron seis bacterias hidrocarburofíticas a partir de muestras de suelo de un predio sometido a biorremediación durante un año en la provincia de Río Negro, Argentina. Mediante evaluaciones sucesivas en medios enriquecidos con hidrocarburos de petróleo, se logró identificar: *Pseudomonas paucimobilis*, *Sphingomonas vesicularis*, *Micrococcus varians*, *M. roseus* y *Micrococcus sp.* Por su parte ARENAS (1999), aisló a partir de muestras de suelo y aguas contaminadas, un total de 262 cepas bacterianas, de las cuales se seleccionaron 55. Estas 55 cepas bacterianas presentaron la mayor actividad emulsificante y degradativa sobre petróleo crudo. Los principales microorganismos aislados fueron *Pseudomonas sp.* y *Bacillus sp.* MERINO (1998), realizó un estudio con microorganismos nativos a partir de muestras de suelo afectadas con derrames de hidrocarburos, evaluando posterior a su aislamiento, su capacidad degradativa de petróleo crudo. Se concluyó que existe un elevado número de microorganismos nativos con la capacidad de degradar hidrocarburos de petróleo en sitios contaminados. Finalmente WALKER y COLWELL (1977), estudiaron el rol de bacterias nativas en la degradación de crudos de petróleo, a fin de evaluar la acción de los microorganismos aislados frente al hidrocarburo. Tanto *Bacillus* como *Pseudomonas* desarrollaron una mejor adaptación, crecimiento poblacional y degradación del petróleo crudo.

2.9 Degradación de los hidrocarburos.

Bioquímicamente, la degradación de hidrocarburos por acción bacteriana se basa, en que a nivel de la cadena respiratoria o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones oxido - reducción cuyo fin es la obtención de energía. La degradación, altera la estructura molecular de los compuestos orgánicos y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización. El término biotransformación implica la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar, en tanto que la mineralización involucra una transformación total de las moléculas orgánicas en dióxido de carbono, agua, residuos inorgánicos inertes y se incorpora el resto a las estructuras de los microorganismos. En conclusión, la biotransformación es una degradación parcial y la mineralización es completa (LAGREGA *et al.*, 1996).

El proceso más básico del metabolismo microbiano, es la transferencia de electrones desde un sustrato donador hacia un sustrato receptor. Para la bacteria, el donador de electrones primarios será uno entre varios compuestos orgánicos contaminantes y los receptores de electrones primarios normalmente son O_2 , NO_3^- , NO_2^- ó CO_2 (LEVIN y GEALT, 1997). Así, la cadena la inicia un sustrato orgánico (el hidrocarburo) que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia.

Son los microorganismos conocidos como quimioorganotróficos los encargados de utilizar estos compuestos naturales y xenobióticos (órgano-contaminantes) como fuente de carbono y dadores de electrones para la generación de energía (BURGOS, 1999).

En la practica, si bien muchas son las bacterias capaces de degradar compuestos orgánicos, son muy pocas las que pueden degradar todo o la mayoría del compuesto. Son las asociaciones microbianas aquellas con el mayor poder biodegradativo, ya que es necesario mas de un organismo para degradar la mezcla del contaminante orgánico de un área (FRITSCHKE y HOFRICHTER, 2004). De forma general, la actuación secuencial de una gran variedad de enzimas, que no proceden necesariamente de la misma especie bacteriana, degradaran eficientemente los residuos orgánicos a compuestos cada vez más simples (LAGREGA *et al.*, 1996).

Si bien la degradación de aquellos compuestos orgánicos que actúan como entes contaminadores puede darse tanto bajo condiciones aerobias como anaerobias, la más rápida y completa degradación se logra bajo condiciones aerobias. La biodegradación de compuestos orgánicos bajo condiciones aeróbicas ocurre cuando la bacteria cataliza la ruptura de moléculas en un ambiente oxigenado, obteniendo de esta manera energía química, absolutamente necesaria para los procesos metabólicos de la célula bacteriana (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1999).

Para que se produzca la degradación del sustrato, este tiene que entrar en contacto con la parte externa de la célula bacteriana. Acción que desencadena una serie de procesos metabólicos involucrados en la degradación de los residuos orgánicos (LAGREGA *et al.*, 1996). Tras el contacto de la bacteria con el sustrato, las enzimas extracelulares se encargan de formar complejos con las moléculas del sustrato. Estos complejos son los que permiten al sustrato atravesar la pared celular. Una vez en el interior de la célula, son las enzimas intracelulares las que formaran complejos con el sustrato para catalizar otras reacciones encaminadas a la obtención de energía y producción de nuevo material celular (LAGREGA *et al.*, 1996).

Para que los microorganismos puedan degradar por ejemplo los alcanos, primero deben oxidar el ultimo carbono de la molécula gracias a un complejo multienzimático que no hace mas que incorporar una molécula de oxigeno (BURGOS, 1999).

Frecuentemente este ataque inicial se realiza sobre un grupo metil terminal, formando un alcohol primario que, a su vez, se oxida posteriormente a un aldehído y finalmente a un ácido graso. Así, este ataque inicial de los alcanos lo realizan enzimas, las cuales presentan una necesidad estricta de oxígeno molecular: las monooxigenasas y dioxigenasas (ATLAS y BARTHA, 2002). En el primer caso, vale decir para la monooxigenasa, un átomo de O_2 se incorpora al alcano, produciendo un alcohol primario. El otro se reduce a H_2O , y la forma reducida del fosfato, el ($NADPH_2$) actúa como donador de electrones. Para el caso de la dioxigenasa, los dos átomos de oxígeno se integran en la molécula de alcano, produciendo un intermediario hidropéroxido inestable, que se reduce a continuación mediante el $NADPH_2$ a un alcohol y H_2O (ATLAS y BARTHA, 2002).

Así se obtiene un hidrocarburo con un grupo alcohol, convirtiéndose en una molécula más reactiva. Mediante otras enzimas, este grupo alcohol se oxida aun más hasta la formación de un grupo aldehído y finalmente carboxilo. Así se obtiene finalmente una molécula similar a un ácido graso y puede ser degradado a Acetil-CoA por beta oxidación. Este proceso de oxidación, también puede darse en carbonos no terminales dando lugar a dos ácidos grasos que se procesaran por beta oxidación (BURGOS, 1999).

Mediante rutas metabólicas periféricas de degradación, el contaminante orgánico es convertido paso a paso en compuestos intermedios (metabolismo intermedio) necesarios para la biosíntesis de células o biomasa microbial (BURGOS, 1999).

Para el caso del ácido graso formado como producto final, el catabolismo de la molécula continúa mediante la secuencia de la β -oxidación. Reacción que reduce la longitud del ácido graso en dos átomos de carbono; las unidades de AcetilCoA se convierten en CO_2 a través del ciclo tricarbóxico. De esta forma, los productos finales de la degradación de los hidrocarburos son CO_2 y H_2O (ATLAS y BATHA, 2002).

3. MATERIAL Y METODO

3.1 Materiales.

Los materiales que se utilizaron en el presente estudio se describen a continuación:

3.1.1 Material biológico. Se utilizaron 240 cepas bacterianas aisladas de tres suelos afectados y no afectados por derrames y confinamientos de petróleo crudo en la Décima segunda Región de Magallanes y Antártica Chilena.

3.1.2 Reactivos. Los reactivos utilizados en la presente investigación se indican a continuación ordenados alfabéticamente y entre paréntesis se señalan las correspondientes abreviaturas usadas en el texto:

Acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1M pH 7, ácido sulfúrico H_2SO_4 (0,05 N, 0,005 N), agar-agar, agar-peptona 2 % (AP 2%), Agua oxigenada H_2O_2 (100 volúmenes), bicarbonato de sodio, carbón activado, cloruro de calcio (CaCl_2), cloruro de estroncio (SrCl_2), cloruro de sodio al 10 % (NaCl), dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), extracto de carne, fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de Sodio ($\text{Na}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), indicador ortofenantrolina, nitrato de amonio (NH_4NO_3), indicador ortofenantrolina, óxido de magnesio (MgO), peptona, reactivo Devarda, solución indicadora N-mineral (verde bromocresol, rojo metilo, ácido bórico y etanol), solución Olsen B, solución extractiva de KCl (1M) (2 N), sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), sulfato ferroso FeSO_4 0,5 N, sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), tetracloruro de carbono (CCl_4).

3.1.3 Equipos. Agitador orbital Lab.Line Orbil Environ-shaker, autoclave Orsa, agitador magnético Stirrer, Conductiviómetro HANNA HI9835, balanza Precisa 2200C, balanza analítica Sartorius 2462, cámara de incubación Kotterman GMB type S430, cámara de frío Eurofrigo, centrifuga, destilador (Labconco Rapidstill II), espectrofotómetro de absorción atómica GBC modelo 909AA (Monocromadores 880 nm y 396,2 nm), espectrofotómetro infrarrojo Perkin Elmer FTIR bx II , hidrómetro ASTM, horno microondas, microscopio óptico Carl Zeiss, pH-metro (Model 05669-20 Cole Parmer), refrigerador Trotter, Tamíces (630, 200 y 63 micras).

3.1.4 Otros. Aceite de inmersión, agua destilada, aguja de siembra, algodón, asa de siembra, bolsas de polietileno, botellas plásticas de 50 ml, botellas de vidrio de 300 ml, embudos, frascos plásticos, lápiz marcador, matraces aforados de 1000 ml, matraces Kjerldahl (100 ml), mecheros, muestras de suelo afectados y no afectados con petróleo crudo, olla a presión Megafensa, papel filtro Wathmann n°4 y n°5, pala, papel, papel aluminio, petróleo crudo “Ostión”, pipetas automáticas de 5 ml, papel filtro, pipetas volumétricas (1, 5 y 10 ml), pisceta, porta embudos, placas Petri de 90 mm, porta objetos (75 x 25 mm de diámetro), rastrillo de siembra, tijera, tamices (2mm), tubos de ensayo de 50 ml, vasos precipitados de 500 y 2000 ml.

3.2 Método.

Los métodos utilizados en el presente trabajo se detallan a continuación:

3.2.1 Localización del área en estudio. Las muestras de suelo utilizadas en el presente estudio fueron recolectadas en tres sitios de la XII Región de Chile afectados por derrames y confinamientos de petróleo crudo y su localización es indicada en la Figura 1. De estos mismos sitios se recolectaron muestras de suelos sin contaminación de petróleo crudo (suelos controles).

La primera de las muestras de suelo contaminado con petróleo crudo se recolectó desde el suelo denominado Posesión (0517136 E y 4204645 N) perteneciente a la comuna de San Gregorio. Este suelo se encuentra afectado por un confinamiento de petróleo crudo producto de la actividad del pozo número 57 de producción.

La segunda muestra de suelo contaminada con petróleo crudo fue recolectada desde el suelo denominado Calentador 18-Clarencia (0440236 E y 4144195 N) perteneciente a la comuna de Primavera en la isla de Tierra del Fuego. Este suelo se encuentra sometido al efecto de petróleo crudo por la acción de emisiones del calentador serie 18 del oleoducto que une la planta Cúllen con el terminal Clarencia.

Finalmente, la tercera muestra de suelo corresponde al sector denominado Catalina Sur (0523808 E y 4153522 N), suelo que se encuentra ubicado en la comuna de Primavera en el sector oriental de la isla de Tierra del fuego, y que se vio afectado por un derrame de petróleo crudo producto de la ruptura de un poliducto.

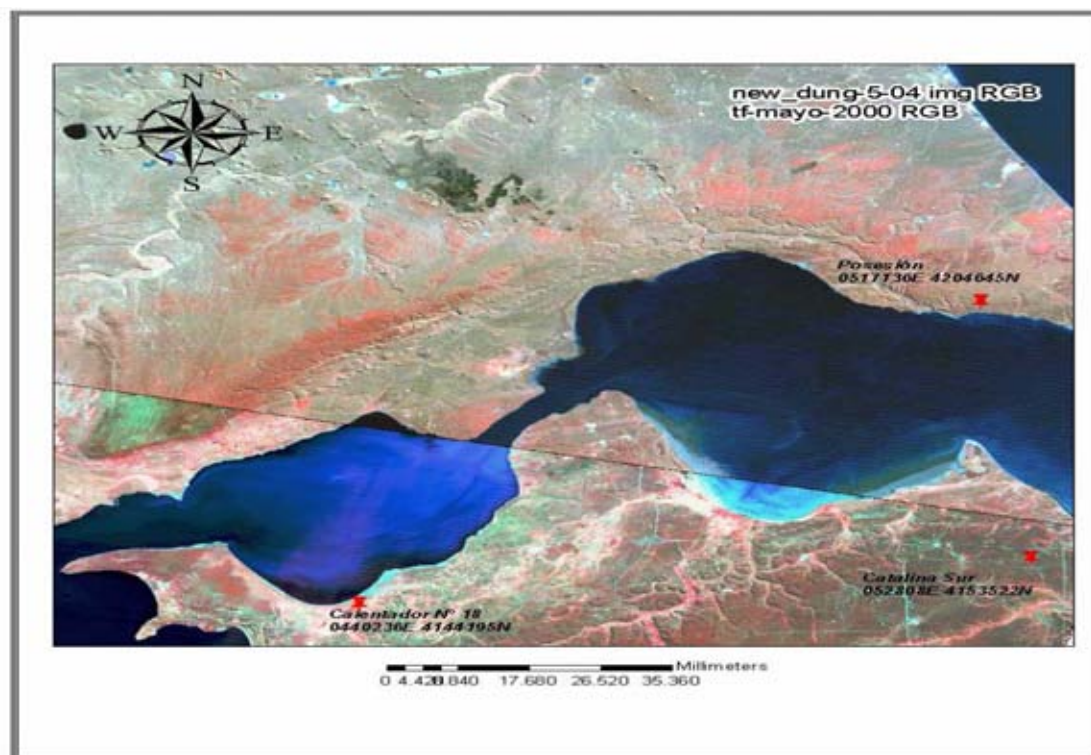


FIGURA 1 Georreferenciación de los tres sitios de donde se extrajeron las muestras de suelos.

3.2.2 Recolección de muestras de suelo. La colecta de las muestras pertenecientes a los tres suelos, fue realizada en el mes de marzo del año 2004.

De cada uno de los tres sitios muestreados (suelo afectado con petróleo crudo más su correspondiente suelo no contaminado) se extrajeron volúmenes de suelo a dos profundidades (0-20 cm y 20-40 cm). Con una pala estéril, de cada suelo y profundidad señalada se recolectaron 3 submuestras de suelo, cada una de aproximadamente 500 gramos, las que fueron depositadas independientemente en bolsas de polietileno, rotuladas según el sector y profundidad. Luego fueron trasladadas a la Universidad Austral de Chile para los análisis microbiológicos y de suelos. De esta manera se obtuvieron cuatro situaciones de muestreo para cada suelo analizado: una correspondiente al suelo afectado con petróleo crudo de la profundidad de 0–20 cm y

otra de la profundidad de 20–40 cm, mas dos muestras del mismo suelo pero sin la influencia del petróleo crudo, recolectada a las mismas profundidades antes señaladas.

3.2.3. Tratamiento de las muestras de suelo. Cada una de las muestras de suelo fue tratada de manera independiente. Para ello, se mezclaron asépticamente las submuestras correspondientes a cada suelo y situación (contaminado y no contaminado con petróleo crudo y a una profundidad de 0 a 20 cm y de 20 a 40 cm) extrayendo de ellas con la ayuda de una pinza estéril restos de raíces, piedras y hojas. Posteriormente, se trituraron y homogeneizaron, para obtener finalmente muestras únicas y representativas.

3.2.3.1. Caracterización de los suelos. Para comprobar el nivel de fertilidad de los suelos y como el petróleo crudo afecta ciertos parámetros químicos de suelo, a las muestras de suelo recolectadas a 20 cm y 40 cm de profundidad se le realizaron los análisis químicos en el laboratorio del Instituto de Ingeniería Agraria y Suelos de la Universidad Austral de Chile. Estos análisis contemplaron la determinación de acidez del suelo, contenido de bases intercambiables y aluminio intercambiable, porcentaje de materia orgánica, determinación de nitrógeno total, fósforo disponible (P-Olsen), conductividad eléctrica y análisis granulométrico.

3.2.3.1.1. Determinación de acidez del suelo (pH) medición potenciométrica. Se determinó por el método de pH al agua en una relación suelo-solución 1:2.5, para lo cual se pesaron 10 g de la muestra de suelo y se le agregaron 25 ml de agua. Luego las muestras se agitaron 3 veces a intervalos de 15 minutos durante 45 minutos, posteriormente se dejaron reposar para leer con un pH-metro (SADZAWKA *et al.*, 2000).

3.2.3.1.2. **Determinación del contenido de bases intercambiables.** Para esta determinación, se pesaron 5 g de la muestra de suelo seco tamizado a 2 mm, se les adiciono 50 ml de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1M pH 7,0. Las muestras se agitaron por 15 minutos y se filtraron. De los filtrados se tomaron alícuotas de 3 ml y fueron depositadas en matraces de 100 ml, a estos se les agregaron 10 ml de SrCl_2 para luego ser aforados con agua destilada. La lectura para Calcio, Magnesio, Potasio y Sodio se realizó en un espectrofotómetro de absorción atómica a una longitud de onda de 880 nm (SADZAWKA *et al.*, 2000).

3.2.3.1.3. **Determinación del contenido de aluminio intercambiable.** Se pesaron 10 g de la muestra de suelo seco tamizada a 2 mm. Luego fueron depositadas en un frasco plástico. Posteriormente se agregaron 50 ml de la solución intercambiadora de KCl (1M). Se filtra por papel filtro colocado en un embudo sobre un matraz de 50 ml (se incluirá un blanco y una muestra de referencia). El filtrado obtenido fue recogido en un matraz de 50 ml para ser aforado con agua destilada, posteriormente se leyó en un espectrofotómetro de absorción atómica a una longitud de onda de 396,2 nm (SADZAWKA *et al.*, 2000).

3.2.3.1.4. **Determinación del contenido de materia orgánica.** El método empleado fue el de Walkley–Black, se pesaron de 0,25 a 1 g de suelo tamizado a 0,5 mm, se agregaron 10 ml de $(\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N) al 5% y 20 ml de H_2SO_4 0,05 N, en forma rápida en matraz Erlenmeyer de 250 ml, inmediatamente se agitó por un minuto, para después dejar enfriar por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 200 ml de agua destilada y 5 gotas del indicador ortofenantrolina. Para una titulación final con FeSO_4 0,5 N (SADZAWKA *et al.*, 2000).

3.2.3.1.5. **Determinación de nitrógeno total.** Se pesaron 5 g de suelo seco, se depositaron en un frasco plástico y se le agregó 50 ml de KCl (2N). Se agitó la muestra una hora para luego dejarlas decantar por una hora más. Del filtrado se tomaron 10 ml y se depositaron en un matraz Kjeldahl de 100 ml. Posteriormente se agregaron 200 mg de MgO y reactivo Devarda, después de lo cual los matraces fueron conectados a un sistema de destilación. El destilado fue recibido en un matraz Erlenmeyer de 50 ml, con 5 ml de solución indicadora (verde bromocresol más rojo de metilo, en ácido bórico y etanol), hasta completar un volumen de 30 ml. Posteriormente se tituló con H_2SO_4 0,005 N, hasta lograr una transformación de un color verde a rosa pálido (SADZAWKA *et al.*, 2000).

3.2.3.1.6. **Determinación de fósforo disponible mediante el método Olsen.** Se pesaron 2,5 g de la muestra de suelo, se agregaron 0,3 g de carbono activado y 50 ml de $NaHCO_3$. Se agitó durante 30 minutos y a continuación se filtró. El filtrado fue recogido en envases plásticos. Posteriormente se tomaron 5 ml del filtrado y se depositaron en matraces aforados de 50 ml, para luego agregar 20 ml de solución Olsen B. Se aforó con agua destilada y se agitó para mezclar, posteriormente se procedió a leer en el espectrofotómetro de UV / VIS a una longitud de onda de 880 nm (SADZAWKA *et al.*, 2000).

3.2.3.1.7. **Determinación de la conductividad eléctrica de los suelos.** Se mezcló suelo seco adicionando agua y agitando constantemente en un recipiente de loza por un período de 45 minutos. Luego de obtener finalmente una pasta saturada, se procedió a medir la conductividad eléctrica de los suelos expresada en ($\mu S/cm$) mediante un conductivímetro (SADZAWKA *et al.*, 2000).

3.2.3.1.8. Determinación granulométrica por el método Day. A 40 g de suelo seco con un tamaño inferior a 2 mm, se le agregó 60 ml de H₂O₂ de 100 volúmenes. Se dejó reposar por 24 horas para oxidar la materia orgánica, para agregar a la muestra finalmente 100 ml de dispersante (Na₄P₂O₄ 0,1 N) y agitar por 10 minutos. La suspensión se llevó a una probeta aforada a 1000 ml, la cual se mantuvo a 30 °C. Luego, la suspensión se agitó y se introdujo un hidrómetro ASTM para posteriormente medir en los intervalos de tiempo: 30 segundos; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128 minutos y registrar la lectura del hidrómetro.

La fase mineral se dividió en un set de tamices (630, 200 y 63 micras) los que fueron agitados y se les aplicó finalmente presión de agua (Day 1965, citado por JONES, 2001)

3.2.4. Aislamiento de cepas bacterianas a través del método de las diluciones seriadas. Cada una de las muestras de suelo se trató individualmente. Se pesaron 10 g de las muestras de los suelo respectivos y fueron depositados en un matraz que contenía 100 ml de agua destilada estéril. Esta mezcla fue agitada vigorosamente por 5 minutos para su homogeneización, obteniéndose así una primera dilución, denominada 10⁻¹. A partir de esta dilución, se extrajo con ayuda de una pipeta estéril 1 ml de la mezcla y se depositó en un tubo que contenía 9 ml de agua destilada estéril obteniéndose una dilución 10⁻². De la dilución 10⁻² se extrajo con una nueva pipeta estéril 1 ml de la mezcla y se depositó en un nuevo tubo que contenía 9 ml de agua destilada estéril obteniéndose así una dilución 10⁻³. Esta misma metodología, se utilizó hasta la obtención de una dilución 10⁻⁷, teniendo presente agitar el tubo previo a la extracción de la muestra. Una vez obtenidas las diluciones, se sembraron independientemente cada una de ellas en placas Petri que contenían AP 2%. Para esto se extrajo de la respectiva dilución 0,1 ml y se depositó en la placa Petri, luego esta muestra fue diseminada por toda la placa con la ayuda de un rastrillo de siembra. Una vez realizada la siembra, las placas fueron rotuladas e incubadas a 23 +/- 2 °C por 48 a 72 horas en una cámara de incubación.

Terminado el período de incubación, se procedió por una parte al recuento de las poblaciones bacterianas que se expresa como unidades formadoras de colonia por gramo de suelo (UFC/g de suelo) y por otra parte, al rescate y siembra de 240 colonias bacterianas.

3.2.5. Obtención de cultivos puros bacterianos. Las colonias bacterianas, se obtuvieron a partir de las placas AP (2%) que fueron sembradas como se señaló en el punto 3.2.4. Cada colonia fue replicada en tubos que contenían AP 2% inclinados. Una vez sembrados los tubos se incubaron a 23 ± 2 °C por 48 a 72 horas. Tras este período, los cultivos fueron revisados para detectar algún tipo de contaminación y luego almacenados a 5 °C para su posterior estudio.

En total se seleccionaron 240 colonias (40 de cada suelo), 120 de los suelos contaminados con petróleo; de los cuales 20 colonias provenían del suelo colectado a 0–20 cm y 20 colonias del suelo colectado a una profundidad de 20–40 cm. Situación válida para los tres suelos bajo análisis. Las otras 120 colonias provienen de los suelos no contaminados (controles) y de las profundidades antes señaladas.

3.2.6. Selección de cepas bacterianas con capacidad para crecer en medio mineral adicionado con petróleo crudo. Con el fin de determinar si las cepas bacterianas (240 en total) son capaces de crecer en presencia de petróleo crudo y luego seleccionar las dos mejores cepas bacterianas para realizar una cinética degradativa de petróleo crudo en condiciones de laboratorio, se aplica la siguiente metodología.

3.2.6.1. Crecimiento en medio selectivo sólido (AM+P): Cada una de las 240 cepas bacterianas aisladas fue sembrada independientemente en medio selectivo sólido señalado por ILYNA *et al.* (2003) el cual consta de agar mineral inorgánico (Anexo 1) y 10 ml petróleo crudo (AM+P). Para ello, a partir del cultivo puro y fresco bacteriano, se

extrajo con un asa de siembra una cantidad de inóculo bacteriano que fue depositado sobre el agar AM+P por triplicado, el inóculo fue inmediatamente medido con un piezómetro (largo y ancho del inóculo, en milímetros) y dibujado al dorso de la placa Petri. Una vez realizada la siembra de las placas, estas fueron incubadas a 23 +/- 2 °C por 15 días, de manera de no discriminar a aquellas bacterias con una adaptación más lenta a la nueva fuente de carbono. Al término del período de incubación, se procedió a determinar el crecimiento real que obtuvo cada una de las 240 cepas sometidas al ensayo. Finalmente, se seleccionaron las cinco cepas bacterianas que presentaron un mayor crecimiento real de la colonia en el medio AM+P. Para ello las medidas de cada colonia (largo y ancho) por triplicado se sometieron al análisis estadístico, mediante un análisis de varianza (ANDEVA) utilizando el programa computacional Statgraphics 2.0.

3.2.6.2. Crecimiento en medio selectivo líquido (CM+P): Las cinco cepas bacterianas seleccionadas tras cultivo en AM+P, fueron cultivadas de manera individual en medio selectivo líquido adicionado con petróleo crudo (CM+P). El medio de cultivo selectivo líquido es el mismo utilizado por ILYNA *et al.* (2003), más un 3 % v/v de petróleo crudo (Anexo 1). A partir de cultivo puro y fresco bacteriano de la cepa seleccionada en estudio, se extrajo una cantidad de cultivo bacteriano que fue pesado y luego depositado en un matraz con 1000 ml de medio CM+P. Cada cepa bacteriana se sembró por duplicado, de manera que se sembraron en total 10 matraces para las cinco cepas. Los matraces fueron mantenidos por 15 días en agitación constante a 175 r.p.m. a una temperatura de 15 a 18 °C. Al término del periodo de incubación y como criterio para seleccionar las dos potenciales cepas bacterianas para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo, se determinó el aumento en el peso bacteriano (indicador de crecimiento) de cada una de las cinco cepas como criterio de selección.

3.2.7. Cinética degradativa de petróleo crudo. Para determinar la capacidad de las cepas bacterianas seleccionadas para degradar algunos constituyentes de petróleo crudo, se realizó una cinética degradativa de petróleo crudo a lo largo del tiempo. Para este efecto, las dos cepas bacterianas seleccionadas fueron sembradas en forma individual y por duplicado en un medio mineral salino adicionado con petróleo crudo. El medio de cultivo es indicado por ABU-ELGHEIT y YUSEF (1981) (Anexo 1).

Los matraces sembrados se incubaron en un agitador orbital a 18 ± 2 °C, a 175 r.p.m., para realizar mediciones a los tiempos 0, 7, 15 y 30 días desde ocurrida la inoculación con las cepas seleccionadas. Una vez finalizado cada tiempo de incubación, el petróleo crudo sometido a la acción bacteriana fue extraído con tetracloruro de carbono y analizado por espectrofotometría infrarroja en los laboratorios de ENAP Magallanes, para poder determinar aquellas fracciones de petróleo crudo que han sido biodegradadas.

Para la determinación de aquellas fracciones (grupos funcionales) de petróleo crudo, se tomó 1 ml del petróleo crudo sometido a degradación y fue depositado en una celda autosample. Una vez ingresada la celda autosample con la muestra al interior del espectrofotómetro infrarrojo, se procedió a una lectura espectral a una longitud de onda que va de los 400 a los 4000 nm.

3.2.8. Identificación de cepas bacterianas. Se realizó una determinación taxonómica hasta el rango de especie para las dos cepas bacterianas seleccionadas que fueron utilizadas en la cinética degradativa de petróleo crudo. Para ello, se realizó una caracterización macroscópica de las colonias bacterianas (color, forma, margen y tamaño) y microscópica de las bacterias, mediante tinción de gram para establecer la morfología, agrupación y reacción de las bacterias a esta tinción. De acuerdo a las determinaciones macroscópicas y microscópicas, se realizaron pruebas bioquímicas (ensayo de oxidación, hidrólisis de la gelatina, prueba de la catalasa, prueba del citrato,

prueba del indol, prueba de la oxidasa, prueba de reducción de nitratos, prueba del rojo metilo y prueba de Voges Proskauer) y tinción de Wirtz, establecidas en esquemas de clasificación del manual de Bergey's (BUCHANAN y GIBBONS, 1974).

3.2.9. Diseño experimental y estadístico. En el Cuadro 8, se detalla el diseño para el análisis de las muestras que representan la cinética degradativa de petróleo crudo por acción bacteriana.

CUADRO 8 Diseño experimental de degradación de petróleo crudo por dos cepas bacterianas nativas de suelos de la XII Región de Chile.

Muestras	Análisis	Tiempo medición (días)			
		0	7	15	30
Control MSL	Espectrofotometría IR	X			
MSL + Cepa 1*	Espectrofotometría IR	X	X	X	X
MSL + Cepa 2*	Espectrofotometría IR	X	X	X	X
Petróleo	Químico	X			

* = cepas cultivadas por duplicado X: días de evaluación

Para evaluar el crecimiento de las bacterias se realizó un análisis de la varianza (ANDEVA) y un test de tukey para separar entre grupos homogéneos de medias. Los ANDEVA fueron ejecutados por medio del software Statgraphics Plus versión 2.0. Los análisis de regresión se realizaron ajustando regresiones no lineales utilizando el programa estadístico GraphPad Prism v 4.0.

4. RESULTADOS

4.1 Evaluación química de las muestras de suelo de sectores afectados y no afectados con derrames y confinamientos de petróleo crudo

En el Cuadro 9, se muestran las características químicas para las muestras de suelos recolectadas a las profundidades 0–20 cm y 20–40 cm en los sectores Posesión, Catalina Sur y Calentador 18–Clarencia en la región de Magallanes. Cada una de las muestras de suelos y su respectiva profundidad presenta dos situaciones; suelo afectado y suelo control, no afectado por derrame y confinamiento de petróleo crudo.

Los parámetros seleccionados para establecer variaciones e influencias del petróleo crudo sobre los suelos fueron: pH (en agua), Materia orgánica (%), Nitrógeno total (%), Fósforo disponible (mg/kg), Potasio intercambiable (mg/kg), Sodio intercambiable (cmol₊/kg), Calcio intercambiable (cmol₊/kg), Magnesio intercambiable (cmol₊ /kg), Aluminio intercambiable (cmol₊/kg) y Conductividad eléctrica (dS/m). El análisis granulométrico de los suelos se detalla en el Anexo 2.

CUADRO 9 Resultado análisis químico de suelos afectados y no afectados por contaminación con petróleo crudo.**Suelo Calentador 18-Clarencia**

Tipo de muestra	Profundidad (cm)	pH (H₂O)	Mat. org. (%)	C org. (%)	N Total (%)	C:N	P Disponible (mg/kg)	Conductividad eléctrica (dS/m)
Muestra control	0-20	6,80	3,5	2,0	0,17	11,8	5,1	0,18
	20-40	7,31	1,8	1,0	0,10	10,0	3,2	0,26
Muestra contaminada	0-20	7,40	4,4	2,5	0,31	8,1	4,0	0,17
	20-40	7,45	2,8	1,6	0,18	8,9	2,9	0,27

Suelo Posesión

Tipo de muestra	Profundidad (cm)	pH (H₂O)	Mat. org. (%)	C org. (%)	N Total (%)	C:N	P Disponible (mg/kg)	Conductividad eléctrica (dS/m)
Muestra control	0-20	6,90	2,1	1,2	0,12	10	7,5	0,43
	20-40	6,80	0,6	0,4	0,02	17,5	2,0	0,64
Muestra contaminada	0-20	7,12	2,6	1,5	0,31	4,80	6,8	0,47
	20-40	7,22	1	0,6	0,06	10,0	2,0	0,15

Suelo Catalina Sur

Tipo de muestra	Profundidad (cm)	pH (H₂O)	Mat. org. (%)	C org. (%)	N Total (%)	C:N	P Disponible (mg/kg)	Conductividad eléctrica (dS/m)
Muestra control	0-20	4,50	8,6	5,0	0,08	14,3	4,2	0,17
	20-40	4,51	5,6	3,3	0,35	41,3	2,3	0,20
Muestra contaminada	0-20	5,44	16,8	9,8	0,33	23,9	3,1	0,20
	20-40	5,45	7	4,0	0,41	12,1	1,9	0,22

CUADRO 9 Resultado análisis químico de suelos afectados y no afectados por contaminación con petróleo crudo.**Suelo Calentador 18-Clarencia**

Tipo de muestra	Profundidad (cm)	K Inter. (mg/kg)	Na Inter. (cmol ₊ /Kg)	Ca Inter. (cmol ₊ /Kg)	Mg Inter. (cmol ₊ /Kg)	Suma de bases (cmol ₊ /Kg)	Al Inter. (cmol ₊ /Kg)	CICE (cmol ₊ /Kg)
Muestra control	0-20	295	1,91	5,1	2,57	10,34	0,019	10,36
	20-40	162	2,56	4,31	2,52	9,8	0,019	9,82
Muestra contaminada	0-20	215	2,38	6,47	2,02	11,42	0,017	11,44
	20-40	215	2,49	6,47	2,38	11,89	0,018	11,91

Suelo Posesión

Tipo de muestra	profundidad (cm)	K Inter. (mg/kg)	Na Inter. (cmol ₊ /Kg)	Ca Inter. (cmol ₊ /Kg)	Mg Inter. (cmol ₊ /Kg)	Suma de bases (cmol ₊ /Kg)	Al Inter. (cmol ₊ /Kg)	CICE (cmol ₊ /Kg)
Muestra control	0-20	190	0,36	3,36	1,67	5,87	0,015	5,89
	20-40	112	0,48	2,59	1,32	4,68	0,018	4,70
Muestra contaminada	0-20	102	0,29	1,91	1,01	3,47	0,012	3,48
	20-40	92	0,27	2,94	1,1	4,54	0,014	4,55

Suelo Catalina Sur

Tipo de muestra	profundidad (cm)	K Inter. (mg/kg)	Na Inter. (cmol ₊ /Kg)	Ca Inter. (cmol ₊ /Kg)	Mg Inter. (cmol ₊ /Kg)	Suma de bases (cmol ₊ /Kg)	Al Inter. (cmol ₊ /Kg)	CICE (cmol ₊ /Kg)
Muestra control	0-20	235	2,16	6,07	2,97	11,8	0,048	11,848
	20-40	114	0,1	4,88	2,51	7,78	0,012	7,792
Muestra contaminada	0-20	355	2,1	6,22	2,9	12,13	0,092	12,222
	20-40	222	1,25	5,21	2,77	9,8	0,01	9,81

Los suelos pertenecientes al sector Calentador 18-Clarencia y Posesión se encuentran dentro del rango ligeramente alcalino a ligeramente ácido, estando sus valores alrededor del pH 7,0. Por su parte, el suelo Catalina Sur presenta valores de pH fuertemente ácidos. La variación del pH al agua debido a la adición de petróleo mostró un incremento del valor de pH en las muestras colectadas de 0-20 cm de profundidad en los suelos afectados con petróleo crudo en comparación con su control. Esta situación se presentó de igual manera para los tres suelos a la profundidad de 20–40 cm.

El incremento del pH en los suelos por efecto del petróleo crudo aumentó en 0,14 unidades de pH para el suelo Calentador 18-Clarencia en las muestras de 20-40 cm y en 0,94 unidades de pH para las muestras del suelo Catalina Sur, en ambas profundidades. Tanto en el suelo Calentador 18-Clarencia como en el suelo Posesión se registra un aumento en el pH de mayor importancia en los primeros 20 centímetros de suelo, en tanto que en el suelo Catalina Sur el incremento en el pH fue igual en ambas profundidades.

El contenido de materia orgánica de los suelos presenta una menor concentración a medida que aumenta la profundidad del perfil de suelo. Esto es común a todo tipo de suelo. Sin embargo, los contenidos de materia orgánica son diferentes entre los suelos estudiados. Las muestras de los suelos de los sectores Calentador 18-Clarencia y Posesión presentaron valores inferiores al 5%, situación característica de los suelos minerales de la región, en tanto las muestras de suelo del sector Catalina Sur, presentaron valores superiores al 8% correspondientes a suelos con una mayor cantidad de materia orgánica, usualmente producida en suelos de vegas de la región magallánica (SAEZ, 1995).

Al evaluar el efecto del petróleo derramado en las muestras de suelos en comparación con su condición sin adición de petróleo crudo en ambas profundidades (0–20 cm y 20–40 cm) se determinó un incremento en el contenido de carbono orgánico del suelo y por consiguiente en la materia orgánica.

La materia orgánica varió desde un valor de incremento de 0,4 % en el suelo Posesión para las profundidades mayores (20-40 cm) hasta un 8,2 %, en el suelo Catalina sur en las estratas superficiales (0-20 cm). Los incrementos en la materia orgánica por la adición de petróleo crudo fueron similares en ambas profundidades para las muestras del suelo Calentador 18-Clarencia (0,9 % a 0-20 cm y 1 % a 20-40cm) y Posesión (0,5 % a 0-20 cm y 0,4 % para 20-40 cm) mientras que para las muestras del suelo Catalina Sur fue mucho mayor en los primeros 20 cm de suelo (8,2 % versus un 1,4 % para los 20 a 40 cm).

El contenido de nitrógeno total de los suelos, sigue un patrón similar al determinado para la materia orgánica. Los suelos presentaron una menor concentración de nitrógeno total a medida que aumenta la profundidad del perfil de suelo. Existió un incremento en el contenido de nitrógeno total para los suelos bajo influencia de petróleo crudo, incremento válido para los tres suelos y para ambas profundidades de muestreo. Estos incrementos en el contenido de nitrógeno total son mucho mayor en los primeros 20 centímetros de suelo. Estos varían desde un incremento de 0,14 % en el suelo Calentador 18-Clarencia hasta un incremento de 0,25 % en el suelo Catalina Sur. Por su parte, los aumentos en el nitrógeno total para una profundidad de 20-40 cm varían de 0,04 % a un 0,08 %, en las distintas muestras de suelo evaluadas.

El contenido de potasio, sodio, calcio y magnesio intercambiables, que constituyen la suma de bases de intercambio, mostró valores mayores a 10 cmol₊/kg en las muestras de suelo de Catalina Sur y Calentador 18-Clarencia y valores menores a 6 cmol₊/kg para el suelo Posesión. Las bases del suelo presentaron un incremento en el contenido de Ca intercambiable por la adición del petróleo crudo, en tanto que K, Na y Mg, no presentan una tendencia clara de alteración de su contenido inicial.

El fósforo disponible (P-Olsen) de las muestras de suelos presentaron valores de clasificación como de muy baja concentración de fósforo (menores a 5 mg/kg) para Calentador 18-Clarencia y Catalina sur, en tanto que estuvieron alrededor de 7,0 mg/kg

para el suelo Posesión, los cuales son clasificados como de baja concentración de fósforo disponible. Se determinó un descenso de la concentración de P disponible en los suelos que han sufrido adición de petróleo crudo, situación válida para los tres suelos y para las dos profundidades de muestreo, siendo más importante en los estratos más superficiales. El valor más alto de descenso lo presenta el suelo Calentador 18-Clarencia y Catalina Sur 0-20 cm con una disminución de 1,1 mg/kg, mientras que el suelo Posesión 20-40 cm no presenta diferencia en relación a su concentración de P disponible.

La conductividad eléctrica de los suelos, da una medida del aumento en salinidad de los suelos evaluados (valores expresados en dS/m) y mostró que todas las muestras de suelos se encuentran en la categoría de suelos con una conductividad baja (inferior a 0,5 dS/m). Se determinó, además, que los suelos no sufren modificaciones de importancia en este parámetro por la acción del petróleo crudo derramado. Las variaciones en dichos valores, fueron similares a la observada en las variaciones de las sumas de bases de los suelos.

4.2 Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas viables de suelos no afectados y afectados con petróleo crudo de tres sectores en la XII Región de Chile.

En el Cuadro 10, se indican los valores de los recuentos de las poblaciones bacterianas heterótrofas viables determinadas en muestras de suelos (de dos profundidades 0-20 cm y 20-40 cm) no afectados (control) y afectados con petróleo crudo recolectados en la XII Región de Chile.

CUADRO 10 Poblaciones bacterianas heterótrofas determinadas en suelos de la XII Región de Chile no afectados y afectados por derrames y confinamientos de petróleo crudo.

Suelo	Población bacteriana ($\times 10^2$ UFC/g de suelo)			
	Suelo Control (0-20 cm)	Suelo Afectado (0-20 cm)	Suelo Control (20-40 cm)	Suelo Afectado (20-40 cm)
Catalina Sur	13.800	1.080	1.690	580
Calentador 18-Clarencia	13.200	1.330	1.210	1.570
Posesión	10.300	1.060	1.070	720

En el Cuadro 10, se observa que la mayor población bacteriana (13.800×10^2 UFC/g de suelo) se determinó en las muestras de suelo control (0-20 cm) del sector Catalina Sur y la menor población bacteriana (580×10^2 UFC/g de suelo), se determinó en las muestras de suelo del sector Catalina Sur afectado con petróleo crudo (20-40 cm).

Se observa la tendencia clara a una disminución en la población bacteriana a medida que se incrementa la profundidad del perfil de suelo en las tres situaciones analizadas (suelos controles).

Por otro lado, al comparar los suelos considerando el factor contaminación, se puede observar que los suelos afectados por derrames y confinamientos de petróleo crudo presentan poblaciones notoriamente inferiores al ser comparados a los mismos suelos sin influencia del hidrocarburo (suelos controles), a excepción de las poblaciones determinadas en el suelo Calentador 18-Clarencia a profundidad de 20–40 cm, donde no se registra una clara modificación en la población bacteriana.

4.3 Cultivo y selección de cepas bacterianas en agar mineral adicionado con petróleo crudo (AM + P).

En el Cuadro 11, se indican las 13 cepas bacterianas seleccionadas en el ensayo de crecimiento en medio AM + P, las cuales registraron colonias con un crecimiento real igual o mayor a $0,2 \text{ mm}^2$ como criterio de selección. En la primera columna del Cuadro 11, se indica el código asignado a la cepa, en la segunda columna se señala el tamaño promedio de crecimiento de la colonia y en la tercera columna se indica la muestra de suelo (no afectado o afectado con petróleo crudo), el sector y profundidad desde la cual se aisló la respectiva cepa. En los anexos 3 al 14, se muestran los resultados individuales de crecimiento real para la totalidad de las cepas ensayadas.

CUADRO 11 Tamaño máximo de colonias bacterianas seleccionadas luego de ser cultivadas en agar mineral adicionado con petróleo crudo (AM + P).

Cepa	Crecimiento real promedio (mm²)	Muestra de suelo, sector y profundidad
C61	0,20	Afectado con petróleo crudo, Catalina Sur, 0-20 cm
C26	0,25	Control, Catalina Sur, 20-40 cm
C40	0,23	Control, Catalina Sur, 20-40 cm
C42	0,20	Afectado con petróleo crudo, Posesión, 20-40 cm
C43	0,41	Afectado con petróleo crudo, Posesión, 20-40 cm
C147	0,26	Control, Posesión, 20-40 cm
C152	0,33	Control, Posesión, 20-40 cm
C103	0,24	Afectado con petróleo crudo, Clarencia, 0-20 cm
C189	0,38	Afectado con petróleo crudo, Clarencia, 20-40 cm
C177	0,22	Control, Clarencia, 0-20 cm
C179	0,28	Control, Clarencia, 0-20 cm
C180	0,74	Control, Clarencia, 0-20 cm
C88	0,51	Control, Clarencia, 20-40 cm

En el Cuadro 11, se puede apreciar que de las 13 cepas seleccionadas, el tamaño máximo de la colonia lo presentó la cepa C180 con un crecimiento real promedio de 0,74 mm². Esta cepa fue aislada desde la muestra de suelo control, recolectada a la profundidad de 0-20 cm del sector Calentador 18-Clarencia. En el mismo Cuadro 11, se puede observar que los tamaños máximos de las colonias bacterianas tienden a ser presentados por las cepas aisladas de la profundidad 20-40 cm., tanto de los suelos controles como en aquellos afectados con petróleo crudo.

En el Cuadro 12, se muestran los resultados del análisis estadístico a que fueron sometidas las 13 cepas seleccionadas, con la finalidad de seleccionar cinco para ser utilizadas en los ensayos de crecimiento en caldo mineral adicionado con petróleo crudo (CM + P).

CUADRO 12 Análisis estadístico para las 13 cepas bacterianas seleccionadas que presentaron el mayor crecimiento real de colonia (mm^2) en medio agar mineral adicionado con petróleo crudo (AM + P)

Cepa	Repeticiones	Media (mm^2)	Grupos Homogéneos
C42	3	0,20	a
C61	3	0,20	a
C177	3	0,22	a
C40	3	0,23	a
C103	3	0,24	a
C26	3	0,25	a
C147	3	0,26	a
C179	3	0,28	a
C189	3	0,38	a
C152	3	0,40	a
C43	3	0,41	ab
C88	3	0,51	ab
C180	3	0,74	b

Como se observa en el Cuadro 12, el análisis de ANDEVA para las trece cepas bacterianas seleccionadas luego de cultivo en (AM + P) por 15 días, muestra que el crecimiento real de las colonias ($0,74 \text{ mm}^2$) de la cepa C180 difiere en forma estadísticamente significativa ($p \leq 0,005$) del resto de las colonias de las otras cepas seleccionadas. Por su parte, las colonias de las cepas C189, C152, C43 y C88, si bien no presentan diferencias estadísticamente significativas en su crecimiento al ser comparadas entre si, se seleccionaron por presentar los mayores valores promedios de crecimiento.

4.4 Determinación del crecimiento en caldo mineral adicionado con petróleo crudo (CM + P) de las cinco cepas bacterianas seleccionadas.

En el Cuadro 13, se muestran los resultados del crecimiento de las cinco cepas bacterianas seleccionadas luego de su cultivo en caldo mineral adicionado con petróleo crudo (CM + P) por 15 días. Como criterio de selección para este ensayo, se estimó el incremento del peso fresco del cultivo bacteriano expresado en gramos.

CUADRO 13 Peso fresco de los cultivos bacterianos en caldo mineral adicionado con petróleo (CM + P).

Cepa	Peso fresco promedio de los cultivo bacterianos seleccionadas (g de Pellet bacteriano /1000 ml de CM+P)	
	Día 0 de ensayo	Día 15 de ensayo
C180	0,01	0,02
C189	0,01	0,01
C152	0,02	0,02
C88	0,02	0,03
C43	0,03	0,03

Como se observa en el Cuadro 13, al final del ensayo (día 15) el mayor incremento de peso fresco se registro en los cultivos de las cepas C180 y C88 (0.01 g/100 ml), el resto de las cepas ensayadas no registraron incremento en el peso. Por lo cual las cepas C88 y C180 fueron seleccionadas para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo.

4.5 Determinación taxonómica de las dos cepas bacterianas seleccionadas para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo.

En el Cuadro 14, se indican las características morfológicas, tintoriales, fisiológicas y bioquímicas determinadas para las dos cepas seleccionadas y que confrontadas con las tablas diagnósticas del manual de identificación bacteriológica de Bergey's, permitieron identificar taxonómicamente hasta el rango de especie las cepas en estudio.

CUADRO 14 Determinación taxonómica de cepas bacterianas seleccionadas para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo.

Características Morfológicas, tintoriales, fisiológicas y bioquímicas	Cepas bacterianas	
	C180	C88
Forma de la célula bacteriana	Bacilos	Bacilos
Gram de la célula bacteriana	Positivos	Positivos
Tinción de Wirtz	Positivos	Positivos
Formación de endospora bacteriana	Positiva	Positiva
Forma de endospora bacteriana	Elíptica	Elíptica
Posición de endospora bacteriana	Central	Central
Prueba de la Catalasa	+	+
Prueba de la Oxidasa	-	-
Prueba del Rojo Metilo (ácido)	+	-
Prueba de Voges Proskauer (acetoina)	-	-
Prueba de reducción del Nitrato	+	+
Hidrólisis de Almidón	+	-
Crecimiento en Anaerobiosis	+	-

Prueba Positiva = (+). Prueba negativa = (-).

De acuerdo a las características morfológicas, tintoriales y a los resultados de las pruebas fisiológicas y bioquímicas a que fueron sometidas las dos cepas bacterianas seleccionadas, se determinó que ambas pertenecen al género *Bacillus*. La cepa C180 corresponde a *Bacillus coagulans* y la cepa C88 a *Bacillus brevis*.

4.6 Determinación de la degradación de grupos funcionales de petróleo crudo por las dos cepas bacterianas seleccionadas mediante espectrofotometría infrarroja.

Las lecturas obtenidas mediante espectrofotometría infrarroja, representan la relación existente entre absorbancia y frecuencia de radiación, entregando de esta manera, una lectura de los principales grupos constituyentes del petróleo crudo bajo estudio. En la Figura 2, se muestra lectura espectral para la muestra control de petróleo crudo “Ostión” (Día cero).

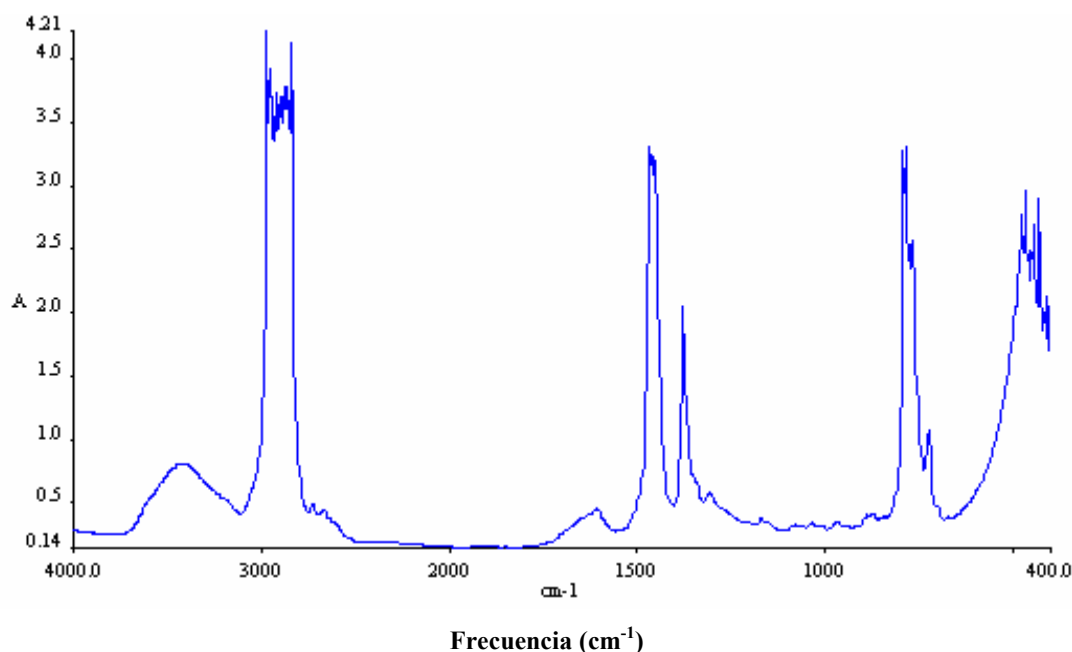


FIGURA 2. Espectro infrarrojo de petróleo crudo control “Ostión”.

El lectura del espectro infrarrojo de la muestra control de petróleo crudo (Figura 2), se puede fraccionar en tres regiones principales, estas son: 1) región comprendida entre los $4000 - 2500 \text{ cm}^{-1}$, cuyos constituyentes orgánicos presentan enlaces simples con hidrogeno o enlaces triples. 2) región comprendida entre los $2000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$, con constituyentes orgánicos que presentan enlaces dobles y 3) región comprendida entre los $1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$, con marcada predominancia de compuestos orgánicos sin presencia de hidrogeno.

En la Figura 2 se advierte además la presencia de 5 picos, típicos de petróleos de tipo parafínicos. El primero de ellos se manifiesta en la frecuencia 2950 cm^{-1} y corresponde principalmente a grupos metilo, el segundo pico de absorción corresponde a la frecuencia de los 1468 cm^{-1} y corresponde a una gran banda Metileno/Metilo, el tercer pico de absorción se registra en la frecuencia de los 1377 cm^{-1} y corresponde a una débil banda Metilo, el cuarto y ultimo pico de absorción se registra en la frecuencia de los 721 cm^{-1} y corresponde a una banda adicional de Metileno. Otros grupos funcionales de importancia para una lectura espectral de petróleo crudo y su respectivo rango de frecuencia se indican en el Anexo 3.

4.6.1. Cinética degradativa de Petróleo Crudo por *Bacillus coagulans*.

En la Figura 3, se muestra la lectura para la muestra de petróleo crudo “Ostión” sometida a cinética degradativa (0, 7, 15 y 30 días) con la cepa C180: *Bacillus coagulans*.

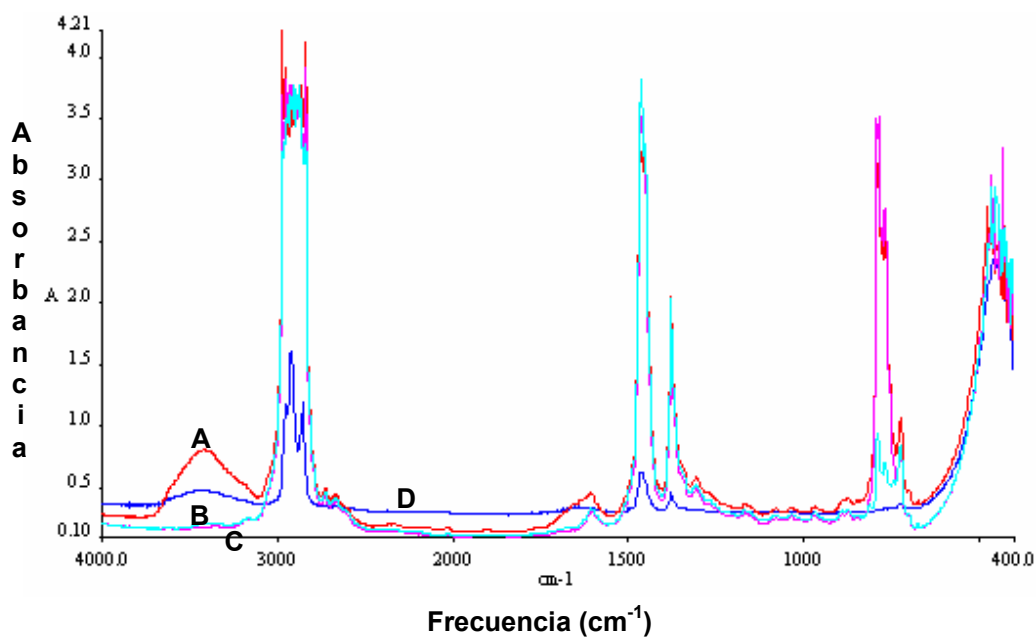


FIGURA 3 Cinética degradativa de petróleo crudo Ostión tratado con *Bacillus coagulans* (cepa C180).

En la Figura 3, para la cinética degradativa de petróleo crudo, se indican los resultados determinados para los días en que se realizaron las lecturas, a saber, con la letra “A” para el día cero (Rojo), con la letra “B” para el día siete (Celeste), con la letra “C” para el día quince (Magenta) y con la letra “D” para el día treinta (Azul).

De manera general, se puede apreciar que la mayor reducción de los grupos funcionales del petróleo crudo ocurre al día siete (B) de la cinética degradativa, esta degradación continúa con menor intensidad para los días quince (C) y treinta (D) del ensayo.

Al día siete, se puede observar una degradación de prácticamente todos los grupos funcionales del petróleo crudo, menos el sector de los hidrocarburos totales - TPH (2850 cm^{-1} a 3000 cm^{-1}) con predominancia de grupos de alcanos saturados y no saturados, ciertos grupos aromáticos, terminales alquinos y aldehídos.

Dentro de las fracciones más afectadas por la acción degradadora de *Bacillus coagulans* se encuentra el sector comprendido por sobre los 3000 cm^{-1} de longitud de onda, este segmento del espectro representa un sector muy rico en grupos alcoholes, fenoles, aminas mas la presencia de los grupos funcionales alcanos por el lado de los hidrocarburos saturados y ciertos grupos aromáticos por el lado de los Insaturados. De esta manera, en el espectro infrarrojo se observa claramente una reducción importante para estos grupos funcionales a los siete días del ensayo con una reducción de 66,8 % de aquellos grupos funcionales presentes en la lectura superior a los 3000 cm^{-1} . Si bien existe degradación al día quince, esta no logra la importancia que se registra durante la primera semana de ensayo, ya que del día siete al quince de ensayo la disminución de los grupos funcionales fue de a penas un 1,1 % adicional.

Una situación diferente se observa para el día treinta de medición, donde se aprecia un incremento en dichos grupos funcionales. Este incremento en la concentración de grupos funcionales, llega a aumentar a más del doble la concentración existente en el día quince de medición (concentración de grupos funcionales de un 78 %).

En el sector comprendido entre los 2850 cm^{-1} y los 3000 cm^{-1} , denominado de los hidrocarburos totales de petróleo (TPH), existe una dominancia de grupos alcanos saturados y anillos aromáticos principalmente y sólo se determinó una degradación apreciable al día treinta de medición. Esta degradación corresponde a un 71 % en relación al valor medido el día cero de ensayo.

Por su parte, los valores de frecuencia entre los 2800 cm^{-1} y 2700 cm^{-1} registran dos picos de grupos aldehídos, los que presentan una degradación parcial a contar del día siete, hasta el día treinta de medición.

Referente al sector comprendido entre los 1500 cm^{-1} y los 1900 cm^{-1} , donde predominan los grupos con enlaces dobles (como anhídridos, esterés, aldehídos, quetonas, ácidos carboxílicos y amidas entre otros), no sufren una degradación sino hasta el día quince de medición, variando esta situación el día treinta en donde se registró un incremento en la concentración de dichos grupos funcionales. Situación similar es la que ocurre entre los 2000 cm^{-1} y los 2700 cm^{-1} , con predominancia de grupos funcionales alquinos y compuestos nitrogenados principalmente, estos compuestos presentan una disminución en la medición correspondiente al día quince pero al día treinta se determinó un incremento de estos grupos en el espectro.

Finalmente, para los picos de las típicas bandas alifáticas, representadas en los segmentos 1470 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} y $725 - 720\text{ cm}^{-1}$ que corresponden a picos de metileno/metilo, metilo y metileno respectivamente (con predominancia de grupos funcionales como alcanos saturados, compuestos aromáticos, grupos alquinos y compuestos clorados entre otros), se registraron situaciones diferentes. Por un lado los picos metileno/metilo y metilo (1470 cm^{-1} y 1380 cm^{-1}) no presentan degradación sino hasta el día treinta (72,3 % y 51 % respectivamente), mientras que para el pico $725 - 720\text{ cm}^{-1}$ representado por una banda metileno se presenta degradación a contar de la segunda medición (día 15 con 66,35 % y día 30 con 89,57 % y día 15 con 22,7 % y día 30 con un 63 % de los grupos funcionales degradados respectivamente).

4.6.2 Cinética degradativa de Petróleo Crudo por *Bacillus brevis*.

En la Figura 4, se muestra la lectura para la muestra de petróleo crudo sometida a cinética degradativa (0-30 días) con la cepa C88: *Bacillus brevis*.

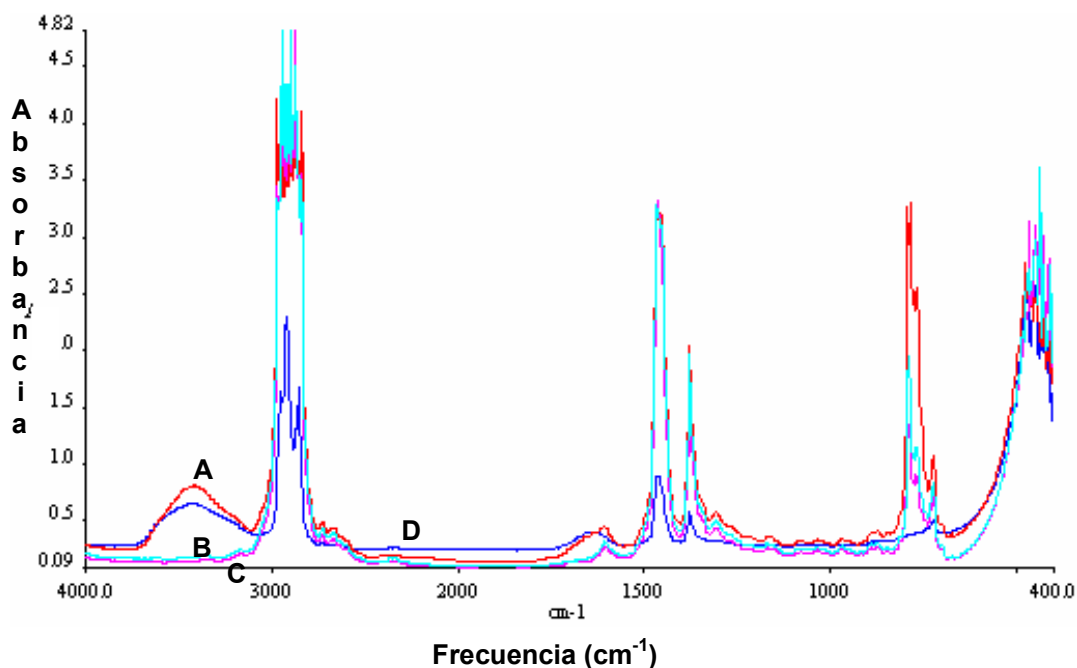


FIGURA 4 Cinética degradativa de petróleo crudo Ostión tratado con *Bacillus brevis* (cepa C88)

En la Figura 4, para la cinética degradativa de petróleo crudo, se indican los espectros determinados para los días en que se realizaron las lecturas, a saber, con la letra “A” para el día cero (Rojo), con la letra “B” para el día siete (Celeste), con la letra “C” para el día quince (Magenta) y con la letra “D” para el día treinta (Azul).

Como se observa en la Figura 4, una reducción importante de la mayoría de los grupos funcionales del petróleo crudo Ostión se registró principalmente en la medición realizada al día siete (B) de la cinética degradativa, continuando de manera mas pausada a los quince días (C). Si bien en el día treinta de medición (D) se observa también

disminución en cuanto a ciertos grupos funcionales del petróleo, esta requiere un análisis particular debido a la aparición de otros grupos funcionales.

De acuerdo a la Figura 4, en el sector comprendido por sobre los 3000 cm^{-1} de longitud de onda, con predominio de grupos alcoholes, fenoles, aminas y compuestos que presentan enlaces simples con hidrogeno y grupos funcionales como los alcanos y ciertos aromáticos, se determino una reducción sustancial para estos grupos funcionales al día siete del ensayo, existiendo una menor degradación registrada al día quince. Así al día 7, los grupos funcionales habían sido degradados en un 71,3 % y al día 15 en un 78,9 %. También se registró una situación similar a la ocurrida con *Bacillus coagulans* al día treinta de la cinética degradativa, con un incremento de dichos grupos funcionales, los cuales llegaron a aumentar la concentración.

Por su parte, en el sector comprendido entre los 2850 cm^{-1} y los 3000 cm^{-1} , con dominancia de grupos alcanos saturados (TPH), sólo se registró una degradación apreciable el día treinta de la cinética degradativa, la que alcanzó un 64,4 %. Los valores de frecuencia entre los 2800 cm^{-1} y 2700 cm^{-1} , representan dos picos correspondientes a grupos aldehídos, y presentan una degradación parcial desde el día siete hasta el día treinta de la cinética.

Para el sector comprendido entre los 1500 cm^{-1} y los 1900 cm^{-1} con predominancia de grupos con dobles enlaces (anhídridos, esterés, aldehídos, quetonas, ácidos carboxílicos y amidas entre otros) no sufren una degradación sino hasta el día quince de medición. Para el día treinta de medición, la situación varía, existiendo un aumento de dichos grupos funcionales. Una situación similar es la que ocurre entre los 2000 cm^{-1} y los 2700 cm^{-1} , con predominancia de grupos funcionales alquinos y compuestos nitrogenados principalmente, estos presentan una disminución de estos compuestos hasta la medición correspondiente al día quince, al día treinta de medición se observa un incremento de estos grupos en el espectro.

Por último para las bandas 1470 cm^{-1} , 1380 cm^{-1} y $725\text{-}720\text{ cm}^{-1}$ que corresponden a metileno/metilo, metilo y metileno respectivamente, presentan situaciones diferentes. Por un lado, los picos metileno/metilo y metilo (1470 cm^{-1} y 1380 cm^{-1}) no presentan degradación sino hasta el día treinta de medición, con un 71,7 % y un 52,3 % respectivamente, mientras que para la banda $725\text{-}720\text{ cm}^{-1}$ se detecta dicha situación a contar del día siete. Para la banda 725 cm^{-1} , al día siete la degradación alcanza un 47,3 %, al día quince un 59,4 % y finalmente día treinta, un 82,3 %. Para la banda 720 cm^{-1} , las degradaciones a los días siete, quince y treinta son de un 21 %, 38 % y 60 % respectivamente.

4.7 Determinación de la tasa degradativa para las dos cepas bacterianas.

En el Cuadro 15 se representan las variaciones porcentuales de los constituyentes del petróleo registrados a los tiempos 0, 7, 15 y 30 días de iniciado el ensayo de la cinética degradativa realizada en forma independiente para cada cepa bacteriana seleccionada. Para ello se desarrollo una estimación porcentual de disminución de los grupos funcionales del petróleo crudo y su concentración en el tiempo (absorbancia), variación determinada con espectrofotometría infrarroja.

De acuerdo a las concentraciones de los componentes del petróleo (grupos funcionales) determinados para cada muestra, se calculó la tasa de biodegradación de cada fracción según la siguiente expresión:

$$TB = \frac{Cb - Cm}{Cb} * 100 \quad (4.1)$$

Donde:

TB: Tasa de Biodegradación de cada fracción expresada en %.

Cb: Concentración del blanco

Cm: Concentración de la muestra

CUADRO 15 Tasa de biodegradación de petróleo crudo por las cepas *Bacillus coagulans* y *Bacillus brevis*.

Cepa Bacteriana	Día	Repetición	Concentración TB (%) (Cm)	Promedio TB (%)
<i>Bacillus coagulans</i>	7	1	1860,3	21,0
		2	1872,3	20,5
		3	1879,5	20,2
	15	1	1710,2	27,4
		2	1698,6	27,9
		3	1710,5	27,4
	30	1	1569,9	33,4
		2	1572,0	33,3
		3	1561,4	33,7
<i>Bacillus brevis</i>	7	1	1867,3	20,7
		2	1897,5	19,5
		3	1875,6	20,4
	15	1	1824,6	22,5
		2	1836,8	22,0
		3	1844,2	21,7
	30	1	1665,3	29,3
		2	1689,7	28,3
		3	1679,5	28,7

Valor concentración Cb: 2355,8

En la Tabla 15 se observa como los grupos funcionales de petróleo crudo muestran una degradación por la acción de ambas cepas bacterianas.

La cepa *Bacillus coagulans* (C180) presenta una tasa degradativa rápida en un comienzo para estabilizarse con el tiempo, esta tasa alcanza valores de biodegradación (TB %) superiores sobre el mismo petróleo crudo a contar del día 7 en comparación a la TB % de *Bacillus brevis* (C88). Para las mediciones efectuadas al día quince, la degradación de *Bacillus coagulans* sobre el petróleo crudo, logra disminuir sus grupos funcionales en un 27,56 % mientras que al día treinta de medición esta degradación alcanza un valor de 33,45 %.

Bacillus brevis presenta la misma tendencia degradativa sobre petróleo crudo, muy rápida en un comienzo para estabilizarse en el tiempo. A los siete días de iniciado el ensayo, el petróleo crudo sufre una degradación promedio de sus grupos funcionales en un 20,19 %, al cabo de quince días, esta degradación alcanza un 22,10 %. Finalmente, al día treinta del ensayo, el petróleo crudo alcanza un decrecimiento en sus grupos funcionales de un 28.76 %.

4.8 Determinación de la cinética degradativa para las dos cepas bacterianas.

Las variaciones porcentuales en la concentración de los constituyentes del petróleo crudo, fueron sometidas a un análisis destinado a determinar la cinética degradativa para ambas cepas bacterianas. En el Cuadro 16 se observan los resultados correspondientes al análisis de degradación del petróleo crudo por las dos cepas bacterianas, la que se ajustó a una función de hipérbola según la siguiente expresión:

$$Y = \frac{BMAX * t}{KD + t} \quad (4.2)$$

En donde:

Y = cantidad acumulada de petróleo degradado

$BMAX$ = Cantidad máxima o potencial de degradación del sustrato agregado

t = Tiempo

KD = Constante que representa el valor del tiempo en que se alcanza la mitad de $BMAX$

CUADRO 16 Análisis de degradación de petróleo crudo por *Bacillus coagulans* y *Bacillus brevis*.

VARIABLES	<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus brevis</i>
<i>BMAX</i>	41,27	31,86
<i>KD</i>	7,18	4,67
Intervalos de confianza (95%)		
<i>BMAX</i>	40.25 a 42.29	28.06 a 35.65
<i>KD</i>	6.621 a 7.742	2.428 a 6.916
<i>Sy.x.</i>	0,336	1,562
<i>R²</i>	0,999	0,982

En el Cuadro 16, se observa que las cepas bacterianas presentan una igual cinética degradativa, expresada a través del valor *KD*. Sin embargo es la cepa *Bacillus coagulans* la que presenta un mayor potencial de degradación de petróleo crudo, representada por el valor de *BMAX*.

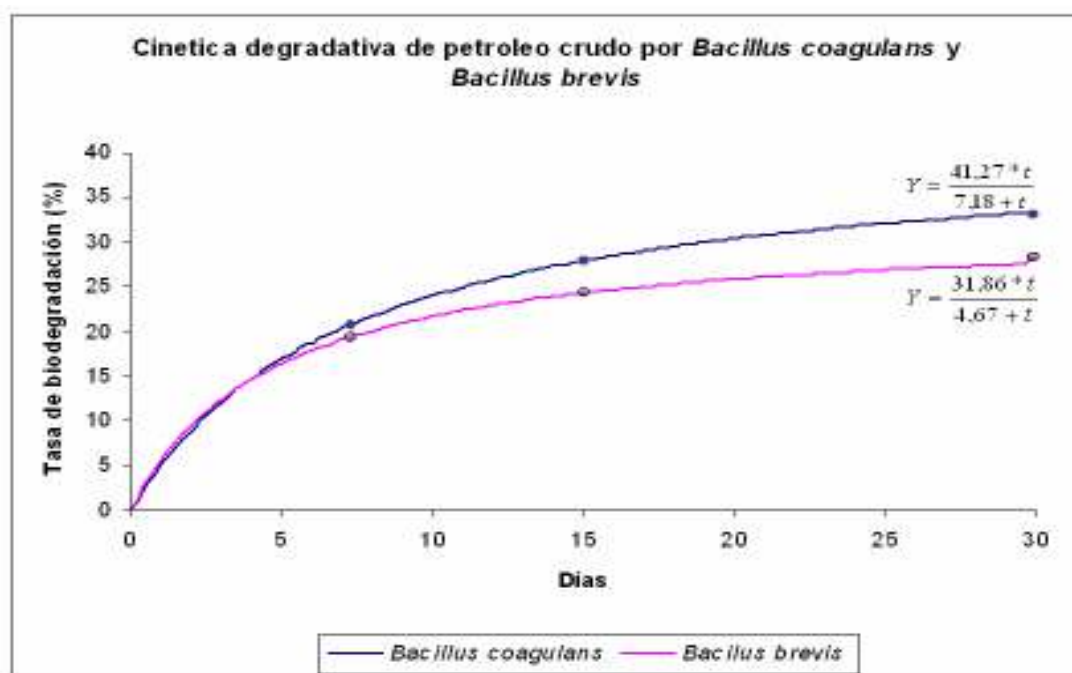


FIGURA 5 Cinética degradativa de petróleo crudo por *Bacillus coagulans* y *Bacillus brevis*.

5. DISCUSIÓN

5.1 Evaluación química de las muestras de suelo de sectores afectados y no afectados con derrames y confinamientos de petróleo crudo.

El pH en suelos contaminados con petróleo crudo en general, de acuerdo a los estudios realizados en diversas partes del mundo, muestra que los valores se mantienen o muestran un aumento del valor de pH. Así, PALA *et al.* (2002), en un estudio realizado en suelos arcillosos de Brasil contaminados con petróleo crudo, determinaron que el pH no sufrió modificaciones en relación a su condición natural. Similarmente, MARTINEZ y LOPEZ (2001) quienes estudiaron el efecto de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de un suelo arcilloso de México, determinaron que las variaciones de pH para los suelos bajo influencia de petróleo crudo no fueron regulares. Sin embargo, mostraron una ligera tendencia al aumento del pH por la acción de petróleo crudo. De la misma forma, ADENIPEKUN y FASIDI (2005), al evaluar la tasa degradativa de petróleo crudo en suelos arenosos de Nigeria por la acción de microorganismos nativos, determinaron que los suelos contaminados con petróleo crudo no sufren modificaciones importantes ni presentan una tendencia regular en las variaciones de pH. Por su parte, ODOKUMA y DICKSON (2003) señalan que los suelos contaminados con petróleo crudo no presentan grandes modificaciones en su pH, salvo que estos se sometan a un sistema de biorremediación, donde sí pueden observarse descensos en dicho parámetro producto del mismo proceso degradativo. Sin embargo, los resultados de OBIRE y NWAUBETA (2002), quienes evaluaron el efecto de distintos tipos de hidrocarburos sobre las propiedades físico-químicas y microbiológicas de suelos de Nigeria, señalan que los suelos evaluados por ellos presentaron pH más elevados que sus controles no contaminados, variaciones que llegaron hasta 0,6 unidades de pH.

Los resultados del presente estudio no concuerdan con la mayoría de los trabajos de literatura, puesto que los suelos afectados por derrames y confinamientos de petróleo crudo mostraron un incremento en el pH. Los aumentos de este estudio son atribuidos a la composición del petróleo crudo, ya que este material desde los yacimientos de la zona magallánica, presentan cantidades variables de Na, Ca y Mg debido a los orígenes de su formación en aguas marinas y salobres (GALLEGOS¹, 2005). Es esta interacción suelo-petróleo crudo, la que hace que la tendencia de los suelos contaminados en la XII Región, con petróleo sea al incremento y no al descenso de pH. Esta “alcalinización” de los suelos es atribuida a las características químicas y a la correspondiente clasificación mundial para el petróleo crudo derramado y confinado en suelos de la XII Región de Chile. Este petróleo, ha sido clasificado como “liviano” o “dulce” (GALLEGOS¹, 2005) a diferencia de otros petróleos, presenta características de pH neutros y, además, no cuenta con presencia de azufre y de una serie de compuestos asociados como el ácido sulfúrico, que lograrían provocar una condición de acidez en los suelos (Instituto Mexicano del Petróleo; IMP, 2002).

Los compuestos OH^- , presentes en el petróleo, asociados a Ca y Mg, los cuales aumentan en el suelo al adicionar petróleo, son los que provocarían una disminución de H^+ del suelo, aumentando de esta manera el pH de los mismos. Las modificaciones de pH en los suelos analizados tenderían a favorecer las poblaciones microbianas al aumentar el pH, condiciones que según LAGREGA *et al.* (1996) serían propicias para el crecimiento y sobrevivencia microbiana y por ende, para la biodegradación del petróleo crudo.

Referente al carbono orgánico y a la materia orgánica como se señaló en el capítulo de resultados para los tres suelos estudiados, los derrames y confinamientos de petróleo crudo conducen a un aumento en el contenido de materia orgánica. Estos resultados son coincidentes con la totalidad de los reportes encontrados en la literatura revisada. Así, los datos obtenidos por Ellis y Adams (1960) citados por BRISSIO (2005), al estudiar el efecto de los hidrocarburos de petróleo en suelos arenosos (USA)

determinaron que bajo contaminación, estos suelos muestran incrementos en la materia orgánica y en el carbono orgánico. Este carbono orgánico se vería incrementado directamente en proporción a la cantidad de contaminante hidrocarburo adicionado. Similarmente, MARTINEZ y LOPEZ (2001) en su estudio en suelos arcillosos de México, determinaron aumentos de la materia orgánica de los suelos proporcional a la concentración de hidrocarburos presentes en estos como material contaminante. De la misma manera, en un estudio realizado por ADENIPEKUN y FASIDI (2005) se estableció en suelos de Nigeria, mediante mediciones sucesivas con distintos rangos de contaminación de petróleo crudo, que el aumento en el porcentaje de materia orgánica y carbono orgánico de los suelos se encuentra estrechamente vinculado a la concentración de C del agente contaminante. Resultados similares fueron determinados por OKOLO *et al.* (2005) en un suelo arenoso de Nigeria. Estos autores determinaron que el carbono orgánico de los suelos se incrementa por la adición del petróleo crudo desde un 2,15 % para un suelo control hasta un 7,06 % después de la adición de petróleo. Situación que no coincide con lo ocurrido para el suelo Posesión, quien presenta un incremento de un 0,5 %, valor más cercano a lo obtenido por OBIRE y NWAUBETA (2002) quienes registraron esta un incremento en el carbono orgánico en un 1 % para un suelo arenoso afectado con petróleo crudo, sin embargo, debe considerarse que el aumento es dependiente del monto de petróleo derramado.

El reporte de RIVERA CRUZ *et al.* (2005) en suelo franco arcilloso de México incrementos de hasta un 46 % en los suelos con adiciones de 79500 mg/kg de TPH (hidrocarburos totales de petróleo). Estos valores son altos debido a la alta concentración de petróleo adicionado. Valores más cercanos a los obtenidos en el presente estudio son los que encontraron ADENIPEKUN y FASIDI (2005), quienes registraron incrementos de un 3 % en el carbono orgánico en suelos afectados con un 40 % de petróleo crudo y ODOKUMA y DICKSON (2003) con incrementos de carbono orgánico cercanos al 8%, valores más coincidentes al incremento en un 5 % para el suelo Catalina Sur y un 1 % para el suelo Calentador 18-Clarencia.

Este aumento en el carbono orgánico y consecuentemente en la materia orgánica de los suelos afectados por la acción del petróleo crudo, no significa en ningún caso que sea beneficioso para la vida microbiana. Independiente de que el método de determinación de materia orgánica de los suelos de Walkley–Black no es capaz de reconocerlo, es importante poder discernir entre aquella materia orgánica biogénica y aquella petrogénica, aportada por el petróleo crudo sobre los distintos perfiles de suelo afectados.

El incremento en los valores de materia orgánica es debido a que el petróleo crudo que afecta los suelos sometidos a estudio se encuentra constituido por pocos compuestos saturados y poliaromáticos, lo que hace que el petróleo sea más fácil de oxidar por el método de Walkley–Black, por lo que gran parte de sus componentes es oxidado repercutiendo en un incremento del valor final obtenido (MARTINEZ y LOPEZ, 2001). Se estima que el 75 % del carbono presente en el petróleo crudo es oxidable (ORTINEZ *et al.*, 2005), valor que es el mismo que se supone que existe en estado oxidable en los suelos.

El nitrógeno total (%) como para los suelos contaminados con petróleo crudo presentó un incremento en su concentración. Estos resultados son coincidentes con la mayoría de los trabajos consultados en literatura y siguen un patrón similar al incremento de materia orgánica. Los resultados son similares a los obtenidos por OKOLO *et al.* (2005), quienes en los suelos afectados con petróleo crudo mostraron un aumento en la concentración de nitrógeno total desde un 0,16 % y en este estudio para el suelo Calentador 18–Clarencia de 0.14% en los primeros 20 cm. De la misma forma, PALA *et al.* (2002) en suelos arcillosos contaminados con petróleo crudo, mostró que el nitrógeno total se incremento de un 0,006 %. Lo que hace pensar que el incremento es proporcional al contenido de N que esté presente en el petróleo crudo que se derrama. De esta forma, OBIRE y NWAUBETA (2002) en su estudio de suelos contaminados con hidrocarburos, no registraron modificaciones de importancia al comparar suelos contaminados con hidrocarburos versus su suelo control. El aumento en la concentración

de nitrógeno total de los suelos se encuentra según ADENIPEKUN y FASIDI (2005) al igual que otros parámetros químicos del suelo influenciados en directa relación a la cantidad de contaminante adicionado en las estratas de suelo, en donde este incremento puede ser atribuido principalmente a la incorporación de diversos compuestos nitrogenados presentes en el petróleo crudo.

En relación al fósforo disponible (P-Olsen), los suelos con influencia de petróleo crudo muestran un descenso en la concentración de este. Estos resultados son similares a los encontrados en la literatura revisada. De esta manera, OGBOGHODO *et al.* (2005) establecieron a través de un estudio sobre los efectos que provoca la incorporación de petróleo crudo a los suelos y su repercusión en las propiedades químicas y físicas, que se produce una disminución del contenido de fósforo en los suelos afectados por el hidrocarburo. Situación similar detectaron OKOLO *et al.* (2005), quienes al comparar suelos controles con sus similares contaminados con petróleo crudo determinaron que existía una merma en la disponibilidad de fósforo en los suelos contaminados con petróleo. Similarmente, BENKA-COKER y EKUNDAYO (1995), en su estudio en suelos arcillosos, determinaron que los suelos afectados por eventos de contaminación, presentaban cantidades de fósforo disponible más bajas en relación con sus respectivos suelos controles. Esta disminución en la concentración de fósforo de los suelos fue determinada en el presente estudio para los tres suelos contaminados con petróleo y puede encontrarse vinculada a la precipitación del fósforo por la influencia del calcio agregado en el petróleo (WANDRUSZKA, 2006)

Los suelos analizados en el presente estudio mostraron un incremento en los valores para calcio intercambiables. Este aumento del contenido de calcio y para los suelos estudiados, concuerdan con la mayoría de la literatura consultada, aunque en algunos casos se incluye incrementos adicionales en la concentración de K y Na. Así, OKOLO *et al.* (2005) encontraron incrementos en sodio, calcio y potasio para suelos alterados por la acción contaminante del petróleo crudo.

Sin embargo, en este estudio el potasio, al comparar los suelos controles versus su condición contaminada, se observan tanto descensos (Posesión) como aumentos (Catalina Sur). Efectos similares fueron determinados por ADENIPEKUN y FASIDI (2005) quienes muestran una disminución en la concentración de potasio de suelos sometidos a presencia de petróleo crudo, mientras que para OBIRE y NWAUBETA (2002) tanto potasio como calcio muestran un incremento en suelos bajo eventos de contaminación con petróleo crudo. Ello parece indicar que no se ha establecido una tendencia general en cuanto a las variaciones del potasio. Estas variaciones observadas pueden ser atribuidas según Karimi-Lotfad *et al.* (1996) citado por MARTINEZ y LOPEZ (2001), a la concentración de petróleo adicionado y a la composición del petróleo crudo adicionado, con cantidades variables de Na, Ca y Mg debido a los orígenes de su formación (Instituto Mexicano del Petróleo; IMP, 2002).

En relación a la capacidad de intercambio catiónico de los suelos estudiados, MARTINEZ y LOPEZ (2001), no encontraron grandes modificaciones en la CIC de los suelos sometidos a análisis, sin una tendencia definida. Similarmente, AROCENA y RUTHERFORD (2005) quienes evaluaron las influencias en las propiedades químicas de suelos salinos por acción de hidrocarburos, comprobaron que la CIC no presenta modificaciones de importancia al comparar suelos adicionados con petróleo y suelo control. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en el estudio, en donde existió un leve aumento en la disponibilidad de ciertas bases y por ende en la CICE de los suelos, pero que no modifican sustancialmente las condiciones de las muestras controles.

Según los resultados obtenidos en el estudio, la conductividad eléctrica no presenta diferencias de importancia, resultados concordantes con los consultados en literatura. De esta manera, MARTINEZ y LOPEZ (2001), no detectaron una influencia directa del hidrocarburo sobre la conductividad eléctrica de suelos con problemas de contaminación. De la misma forma, AROCENA y RUTHERFORD (2005) no encontraron variaciones en la conductividad eléctrica de suelos afectados con petróleo

crudo. La influencia del petróleo crudo sobre las pequeñas modificaciones en la conductividad eléctrica en suelos contaminados con petróleo crudo se encontraría vinculada a la cantidad adicionada y la concentración de bases en los constituyentes del petróleo.

5.2 Recuento de poblaciones bacterianas heterótrofas viables de suelos no afectados y afectados con petróleo crudo de tres sectores de la XII Región de Chile.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio, se determinó una disminución de las poblaciones bacterianas heterótrofas viables de los suelos, al comparar los resultados de los análisis microbiológicos de suelos controles de la profundidad de 0–20 cm versus 20–40 cm. Para el suelo Catalina Sur, Calentador 18-Clarencia y Posesión, esta disminución bordea el 90 % (87,8 %, 90,8% y 89,6 %, respectivamente), dejando de manifiesto que las poblaciones bacterianas disminuyen de acuerdo a un aumento en la profundidad del perfil de suelo, ya sea por una menor concentración de oxígeno, disponibilidad de nutrientes y/o material orgánico. Según HATTORI (1973) las bacterias presentan una distribución poblacional de tipo vertical en el perfil del suelo y GRANT (1981) indica que en todos los suelos el mayor número de microorganismos se encuentra en el estrato superior del suelo, que corresponde a la zona más rica en materia orgánica y humus con la correspondiente disminución poblacional en profundidad.

Al analizar la influencia de la contaminación con petróleo crudo producto de derrames y confinamientos ocurridos en los tres suelos estudiados, hay que considerar que los hidrocarburos son sustancias de composición variable, que tienen diversos efectos tóxicos sobre los ecosistemas edáficos y que la mayoría de los microorganismos no pueden crecer en presencia de los hidrocarburos y mueren. (FONTURBEL y ACHA, 2000). Al respecto JONES (1977) citado por OKPOKWASILI y AMANCHUKWU (1988) determinaron que los suelos contaminados con hidrocarburos reducían notoriamente el número total microbiano en comparación al mismo suelo sin el efecto

del hidrocarburo, sin embargo, el nivel de actividad para el remanente microbiano presente permanecía sin ser afectado por la contaminación. Esta situación se explica por la existencia de ciertas bacterias con tolerancia al petróleo crudo, gracias a la capacidad de utilizarlo como sustrato y fuente de energía. Un número considerable de otras especies no pueden hacerlo y son gradualmente eliminadas del sistema (SONG *et al.*, 1990, citado por OBIRE y NWAUBETA, 2002). Situación que es representada en los suelos estudiados con el 90 % de la población aproximadamente.

Para el caso en estudio, los tres suelos, cada uno analizado de manera independiente, registraron una reducción poblacional por el efecto contaminante del petróleo crudo. Esta disminución poblacional cercana al 90 % para los tres suelos a una profundidad 0–20 cm, responde a la introducción de petróleo crudo como contaminante. Sin embargo, esto no descarta que el remanente poblacional (10% aproximadamente) tenga la capacidad de desarrollarse en dicho ambiente y de utilizar al petróleo crudo como fuente de carbono y energía. De esta manera, MACNAUGHTON *et al.* (1999), estudiaron las variaciones poblacionales de los microorganismos producto de derrames de petróleo crudo, determinando que la estructura y diversidad bacteriana se modifica sustancialmente. Para LI *et al.* (2000) la situación es similar, ya que comprobaron en su estudio, que el número poblacional bacteriano en un suelo contaminado disminuía de acuerdo a la presencia y concentración de petróleo crudo.

En casi todos los ambientes del planeta existen microorganismos capaces de degradar hidrocarburos a formas menos tóxicas y emplearlos como fuente de carbono (PARRISH *et al.* 1999 citado por FONTURBEL y ACHA, 2000) lo que explica su presencia y aumento poblacional en ambientes contaminados luego de tiempo de exposición. Teóricamente, si estos microorganismos tienen la capacidad de sobrevivir en ese ambiente, pueden llegar a degradar aquellos compuestos sin mayor inconveniente. (BURGOS, 1999), por lo que no se descarta que la población bacteriana presente en aquellos suelos con problemas de contaminación por petróleo crudo presenten la capacidad de degradar dicho hidrocarburo.

En el presente estudio al analizar las poblaciones bacterianas presentes a una profundidad de 20–40 cm, se determinó que si bien se evidencia una disminución de las poblaciones bacterianas, al ser comparado con sus respectivos suelos controles, esta no es tan importante como en la profundidad de 20-40 cm, lo que puede deberse a que por las características del petróleo crudo, estos no alcanzan a migrar en forma considerablemente mas allá de los 20 cm de profundidad, lo que repercute menos drásticamente sobre la reducción de la población bacteriana. Esta escasa movilidad del crudo se ve influenciada aparte de sus propiedades físicas por las bajas temperaturas ambientales de la XII Región de Chile gran parte del año, la que disminuyen su densidad y al contenido de arcillas de los suelos que son capaces de absorber el hidrocarburo.

5.3 Aislamiento, crecimiento, selección y taxonomía de cepas bacterianas pertenecientes a suelos de la XII Región de Chile afectados y no afectados por contaminación con petróleo crudo.

En el estudio de suelos afectados y no afectados con petróleo crudo, se aislaron 240 cepas bacterianas con la finalidad de seleccionar las dos que presentaran mejor crecimiento en medios de cultivo sólido (AM+P) y líquido (CM+P) adicionados de petróleo crudo. El porcentaje de cepas bacterianas capaces de crecer en los medios de cultivos ensayados superan el 70 %, y de estas, solo un 5,42 % (13 cepas) lograron obtener un crecimiento aceptable para posteriormente evaluar su capacidad hidrocarburofítica.

Según LI *et al.* (2000) en un estudio de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, establecieron que un gran porcentaje de la población bacteriana con capacidad hidrocarburofítica se encuentran en los primeros 15 centímetros de suelo, independiente si su condición es o no influenciada por el hidrocarburo. En otro estudio llevado a cabo por RIVERA-CRUZ *et al.* (2002), se estudio la adaptación y selección de bacterias autóctonas en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo al 1%. Señalan que de un total de 34 colonias aisladas, solo 3 tuvieron la capacidad de

adaptación y crecimiento en medios de cultivos adicionados con petróleo crudo como fuente de carbono y energía. La pequeña cantidad de aislados bacterianos con capacidad hidrocarburofítica, es coincidente con los resultados del estudio, en donde finalmente se seleccionaron las dos mejores cepas bacterianas del un total de 240 aisladas.

La importante ventaja del aislamiento de microorganismos por la técnica del cultivo por enriquecimiento, consiste principalmente en que esta permite aislar y seleccionar microorganismos según criterios y necesidades propios del tipo de ensayo en el cual se utilizaran (ATLAS y BARTHA, 2002). La capacidad de las cepas bacterianas de adaptarse y crecer en medios de cultivo adicionados con petróleo crudo se debe principalmente, según ATLAS (1981) a que existe una amplia gama de microorganismos con la capacidad de utilizar aeróbicamente diversos hidrocarburos, los cuales constituyen para los microorganismos biodegradadores una fuente de energía y carbono.

De esta manera ALTAMIRANO y POZZO (2000) aislaron e identificaron seis especies bacterianas nativas con capacidad hidrocarburofítica de suelos sometidos a biorremediación mediante medios selectivos adicionados con petróleo crudo. De esta misma manera, CUBITTO y CABEZALI (2002), mediante cultivos semicontinuos adicionados con petróleo crudo lograron aislar bacterias con capacidad de degradar principalmente hidrocarburos de tipo lineal.

Según ATLAS *et al.* (1991), la tolerancia microbiana a la presencia de petróleo crudo representada por su adaptación a los medios de cultivos con hidrocarburos, permite la selectividad poblacional, pues solo aquellas cepas bacterianas con la capacidad de utilizar los hidrocarburos para sus procesos metabólicos podrán crecer y multiplicarse en dichos medios (LOPOLITO *et al.* 1996). Los desiguales rangos de adaptabilidad bacteriana a la presencia de petróleo crudo en el estudio y la capacidad de ciertas bacterias de poseer características degradativas se manifiesta por tanto en el crecimiento o no de colonias en los medios de cultivo.

Referente a la clasificación taxonómica de las dos cepas bacterianas seleccionadas para realizar la cinética degradativa de petróleo crudo, como se señaló en el capítulo de resultados, correspondieron a *Bacillus brevis* y *Bacillus coagulans*.

Al respecto, WALKER y COLWELL (1977) describieron la importancia de bacterias nativas en la remoción de petróleo crudo desde suelos afectados por derrames. De esta manera, del total de la población bacteriana aerobia aislada y seleccionada, las que tuvieron mayor importancia poblacional y degradativa sobre el petróleo crudo, fueron bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*. Igualmente, en un estudio desarrollado por JOBSON *et al.* (1972), quienes estudiaron la utilización de petróleo crudo utilizando bacterias aisladas desde suelos contaminados con petróleo crudo, lograron mediante selección poblacional en medios con alta concentración de petróleo crudo y mediante pruebas de cinética degradativa, determinar que las principales cepas bacterianas con capacidad de degradar petróleo crudo pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter* y *Bacillus*.

De manera similar, ARAFA (2003) en un estudio que buscaba evaluar el potencial de biodegradación bacteriano sobre petróleo crudo en Arabia Saudita, se aislaron y seleccionaron bacterias principalmente del género *Bacillus*, entre las que destacaron *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus pallidus* y *Bacillus coagulans*. En un estudio similar desarrollado por GILES *et al.* (2001), que buscaba caracterizar un derrame de petróleo crudo y determinar bacterias con la capacidad de degradar dicho compuesto, lograron aislar un total de 20 cepas bacterianas nativas del lugar afectado. Dentro de las cepas con mayor actividad degradadora figura *Bacillus coagulans*. Kachholz y Rehm (1977) citados por PERRY (1979) describen en uno de sus estudios sobre degradación de alcanos de petróleo crudo por *Bacillus*, que son cuatro las principales especies de *Bacillus* con capacidad de degradar alcanos de petróleo por cooxidación, estas especies corresponden a *Bacillus macerans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus coagulans*.

Por otro lado, en un estudio realizado por PARDO *et al.* (2002), se determinó que de los cuatro microorganismos bacterianos aislados de suelos contaminados con petróleo crudo y seleccionados según su capacidad degradativa, dos corresponden a *Bacillus brevis*. De forma similar, ARENAS (1999) aisló un total de 262 cepas bacterianas a partir de muestras de suelo contaminado con petróleo crudo, de las cuales se seleccionaron las 55 cepas que presentaron mayor actividad degradativa de petróleo crudo. Entre las bacterias aisladas se encuentran *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas aureofasciens*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus brevis*. De igual forma, GOMEZ *et al.* (2004) aislaron y seleccionaron bacterias nativas de suelos afectados por hidrocarburos con capacidad degradativa para ser utilizados en futuros sistemas de saneamiento ambiental. De las cepas bacterianas identificadas, bioquímicamente se determinaron las siguientes especies: *Pseudomonas. aeuroginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus aerius* y *Bacillus brevis* entre otras.

Los estudios presentes en la literatura, demuestran que algunas especies pertenecientes al género *bacillus* poseen la capacidad de degradar hidrocarburos. Estas bacterias presentan capacidad adaptativa y fisiológica para sobrevivir en ambientes y medios ricos en petróleo crudo y pueden por tanto en mayor o menor medida utilizarlo como fuente de carbono y energía. La capacidad de generar estas respuestas fisiológicas y enzimáticas de adaptabilidad y de utilización del petróleo crudo como sustrato, es para WATKINSON (1978), un indicador de que estas bacterias, presentarían ciertos genes codificados para poder degradar determinados hidrocarburos, estos genes se encuentran en el ADN extracromosomal formando un plasmido.

Sumado a lo anterior se agrega la capacidad que poseen las bacterias de este género para formar endosporas de resistencia, que las faculta para persistir en ambientes adversos por largos períodos de tiempo (HATTORI, 1973), lo que las haría habitantes habituales en suelos de la XII Región de Chile.

Por esta razón, las bacterias estudiadas pueden ser consideradas una alternativa a considerar para evaluaciones posteriores para su utilización en sistemas de bioaumentación y bioestimulación bacterianas en suelos sometidos a sistemas de biorremediación como una herramienta biológica para la descontaminación de suelos.

5.4 Determinación mediante espectrofotometría infrarroja de la degradación de grupos funcionales de petróleo crudo y de la tasa degradativa por las dos cepas bacterianas seleccionadas.

Para determinar la capacidad que poseen las cepas *Bacillus coagulans* C180 y *Bacillus brevis* C88, para degradar algunos constituyentes del petróleo crudo, se evaluó una cinética degradativa de petróleo crudo. Los productos de la degradación o transformación de los constituyentes del petróleo se determinaron por espectrofotometría infrarroja. La espectroscopia de infrarrojo detecta las vibraciones (tensión y flexión) que ocurren cuando una molécula absorbe energía (calor) en la región infrarroja del espectro electromagnético. De esta manera, diferentes grupos funcionales y tipos de enlaces tienen distintas frecuencias e intensidades de absorción infrarroja, los que son detectados y cuantificados (BRISSIO, 2005). Por lo tanto, la absorbancia infrarrojo (IR) es una medida que representa la suma de todos los compuestos que constituyen los componentes del petróleo crudo. Los métodos para Hidrocarburos Totales de Petróleo (HTP) basados en IR no proveen información detallada sobre el tipo de contaminación ni las fracciones específicas que lo componen, pero constituye un instrumento válido en estudios de determinación de degradación de hidrocarburos por su simpleza, rapidez y bajo costo.

La disminución en la intensidad de las bandas detectadas por espectrofotometría infrarroja (Absorción) es tomada como un indicador de la biodegradación del petróleo crudo realizada por las cepas bacterianas seleccionadas. Esta técnica ha sido utilizada en numerosos estudios de biodegradabilidad de hidrocarburos para cuantificar la degradación (ABU – ELGHEIT y YUSEF, 1981).

El petróleo es una mezcla compleja que contiene principalmente hidrocarburos (moléculas con átomos de carbono e hidrógeno), compuestos con heteroátomos (moléculas con átomos de carbono e hidrógeno con heteroátomos tales como azufre, nitrógeno u oxígeno) y bajas concentraciones de constituyentes metálicos (Anexo 5).

La complejidad del petróleo y sus derivados se incrementa con el número de carbonos (BRISSIO, 2005). Los hidrocarburos del petróleo se encuentran conformadas por fracciones saturadas (grupos alcanos e isoalcanos, también llamados de manera industrial compuestos alifáticos), insaturadas (alquenos y alquinos), fracciones aromáticas (benceno, alquilbenceno, BTXS) y asfálticas o fracción sólida (BRISSIO, 2005). De manera general, cada petróleo cuenta con distintos porcentajes y presencias de estas fracciones (GALLEGOS¹, 2005). De las fracciones anteriormente nombradas y de los compuestos que las conforman, WALKER y COLWELL (1977) y ATLAS (1981) indican que los alcanos (compuestos alifáticos) son los más susceptibles a la degradación por acción de bacterias autóctonas de suelos afectados por contaminación de hidrocarburos. Sin embargo, es posible que en el proceso degradativo del petróleo crudo se originen grupos alcanos (Kallio 1974, citado por WALKER y COLWELL 1977), aspecto que fue determinado en las lecturas espectrales sobre el rango de los 3000 cm^{-1} de degradación del petróleo crudo por las cepas seleccionadas. Esta “neogénesis” de alcanos y grupos más simples durante el proceso degradativo, es atribuible a la hidrólisis y simplificación de compuestos complejos del petróleo crudo.

La degradación que sufren los constituyentes del petróleo crudo en las lecturas espectrales obtenidas es atribuida a la acción degradadora de *Bacillus coagulans* y *Bacillus brevis*, debido a que el petróleo parafínico con predominancia de compuestos alifáticos utilizado en el estudio, es capaz de reaccionar con oxígeno y oxidarse solo en fase vapor y a temperaturas superiores a los 250 °C (ASTLE, 1962). El medio salino no interfiere en la composición química del petróleo crudo y el contenido salino en las muestras evaluadas en este estudio no aumentó significativamente.

La biodegradación de los n-alcenos, quienes son componentes importantes en el petróleo utilizado en el estudio, normalmente ocurre por un ataque monoterminal con la formación de un alcohol primario, luego un aldehído y finalmente un ácido monocarboxílico (ATLAS, 1981). Así, para ASTLE (1962) y SABIROVA *et al.* (2006), los productos obtenidos de una oxidación de petróleos parafínicos por acción bacteriana son principalmente alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos grasos. Lo que coincide con lo determinado en las lecturas espectrales de las muestras de petróleo sometidas a biodegradación, donde aquellas fracciones formadas por compuestos más simples son degradadas en primera instancia y coincidente también con la aparición de estos productos por acción de la misma degradación de los grupos funcionales más complejos.

Por lo tanto y de manera general, aquellos hidrocarburos parafínicos o alifáticos o saturados, serán más propensos a ser biodegradados que aquellos petróleos aromáticos por la acción bacteriana (MOURSY y EL-ABAGY, 1981). De acuerdo a esto, JOBSON *et al.* (1972), encontraron que existe por parte de los microorganismos, una preferencia al ataque sobre aquellas fracciones saturadas de cadena corta antes que las de cadena larga. Situación que en el presente estudio puede ser observada en la lectura de los espectros infrarrojo del petróleo crudo tratado con ambas cepas bacterianas, en donde se produjeron degradaciones parciales de una gran cantidad de grupos funcionales que conforman el petróleo crudo parafínico utilizado. Según GALLEGOS¹ (2005), los petróleos parafínicos pueden estar constituidos entre un 70 a un 90 % por constituyentes alifáticos (n-alcenos) lo que hace que su degradación por acción bacteriana sea mayor frente a otros tipos de petróleos.

Aquellas fracciones aromáticas presentes en el petróleo crudo como compuestos aromáticos y asfálticos son, para PINIETA-FLORES y MESTA-HOWARD (2001), los más difíciles de degradar, debido a su estructura molecular extremadamente compleja, los cuales presentan distintas proporciones de nitrógeno, azufre y oxígeno, siendo el tiempo de eliminación de los asfaltenos desde una semana para las estructuras más simples, hasta 990 días para aquellos con varios anillos aromáticos. La presencia de

grupos aromáticos en la composición del petróleo crudo, es la que hace imposible poder degradarlo completamente bajo condiciones de laboratorio. Si bien las poblaciones microbianas son capaces de degradar una porción significativa de fracciones saturadas, solamente algunas fracciones aromáticas son atacadas (JOBSON *et al.*, 1972).

El sector comprendido entre los 2850 cm^{-1} y los 3000 cm^{-1} es muy utilizado como información de contaminación de suelos. Debido a la gran cantidad de compuestos que forman el petróleo, es poco práctico medir cada uno individualmente; resulta útil por tanto poder medir la cantidad total de hidrocarburos que se encuentran en una muestra particular. A este grupo de compuestos que forman el petróleo se les denomina hidrocarburos totales del petróleo - TPH (BRISSIO, 2005). La degradación de esta fracción puede llegar en condiciones de laboratorio de un 38 % hasta un 57 % después de un periodo de 50 días (LI *et al.* 2002). Valores inferiores a los obtenidos en el presente estudio, en donde al cabo de 30 días es posible observar disminuciones de entre un 65 % para *Bacillus brevis* hasta un 71 % para *Bacillus coagulans*. La degradación de estos compuestos puede ser explicada atendiendo al estudio realizado por ARAFA (2003), donde cepas bacterianas entre las cuales se encontraba *Bacillus coagulans* son capaces de adaptarse y crecer en medios adicionados con petróleo crudo.

La cinética degradativa de los grupos funcionales constituyentes del petróleo crudo realizada por ambas cepas bacterianas aisladas y seleccionadas, mostró una rápida degradación en un comienzo (día 7), producto principalmente de la gran cantidad de grupos alifáticos presentes en el petróleo utilizado, los que de acuerdo con ATLAS (1981) son los más rápidos y fácilmente degradables por los microorganismos en la compleja mezcla de hidrocarburos que componen el petróleo crudo frente a aquellos componentes aromáticos y asfálticos. Para JOBSON *et al.* (1972) en su estudio sobre la utilización microbial de petróleo crudo, describe que la degradación para las fracciones saturadas constituye la primera fuente de carbono y energía para el crecimiento microbial. Razón que explicaría la rápida degradación de algunos constituyentes del petróleo determinado en los primeros días de ensayo del presente estudio. Al respecto,

OBIRE y NWAUBETA (2002) describieron a través de un estudio de biodegradación de hidrocarburos de petróleo, que en las primeras semanas de ensayo existió un incremento progresivo de la tasa degradativa del sustrato para después con el tiempo estabilizarse y finalmente disminuir. Esta alta actividad durante el período inicial de ensayo se debe a la mayor disponibilidad de fracciones fácilmente degradables, la que con el tiempo se hace más dificultosa para los microorganismos al enfrentarse en las etapas finales de degradación a aquellas fracciones más pesadas del petróleo crudo. Por su parte, THOUAND *et al.* (1999) en su estudio de biodegradación de bacterias aisladas de suelos con petróleo crudo, muestran que esta fracción insaturada del petróleo crudo nunca fue perceptiblemente biodegradada, pero que de manera general, las bacterias fueron capaces de degradar el 25 % de los grupos funcionales totales de petróleo crudo al día 30 de medición, valores coincidentes con los presentados en el presente estudio.

La desaceleración de la tasa de degradación de petróleo rudo junto con la presencia de grupos funcionales no sometidos a degradación (MOURSY y EL-ABAGY, 1981) y STONE *et al.* (1941) puede responder también a una inhibición de las enzimas bacterianas encargadas de la oxidación del compuesto (SCHAEFFER *et al.*, 1979)

La biodegradación de petróleo crudo es, por tanto, dependiente del tipo de los grupos funcionales que lo constituyen. Así, JOBSON *et al.* (1972) determinaron que la degradación supera el 30% después de 21 días, resultados que concuerdan con los obtenidos en el presente estudio por las cepas *Bacillus brevis* y *Bacillus coagulans*, pues ambas lograron al día 30 de medición degradar respectivamente el 28 % y el 34 % de los grupos funcionales totales del petróleo crudo sometido a ensayo. Sin embargo, otros estudios como el de MARCHAL *et al.* (2003) muestran que la tasa de degradación para Diesel varía entre un 60% a un 73%, al cabo de 28 días de ensayo, atribuyendo este alto porcentaje de degradación a la alta presencia de grupos alcanos en el Diesel y el remanente, a la poca presencia de hidrocarburos pesados recalcitrantes a la biodegradación. En el estudio desarrollado por WALKER y COLWELL (1977) se determinó, en pruebas degradativas de petróleo con bacterias autóctonas, que al cabo de

una semana, es posible obtener valores de degradación de compuestos alcanos cercanos al 70% y otros compuestos no alcanos hasta un 30%. Sin embargo, para DIAZ *et al.* (2003) esta biodegradación de compuestos alcanos pertenecientes a la fracción alifática alcanza el 50 % mientras que la fracción aromática un 30 %.

6. CONCLUSIONES

- Los suelos afectados por derrames y confinamientos de petróleo crudo, evidencian modificaciones en ciertas propiedades químicas (materia orgánica y carbono orgánico principalmente) y originan alteraciones cuantitativas en la poblaciones bacterianas presentes en estos.
- Desde suelos de la XII Región de Chile, independiente de la profundidad de la muestra de suelo y si este se encuentra afectado o no afectado por petróleo crudo, se aislaron y cultivaron bacterias con capacidad hidrocarburoclítica.
- Las cepas bacterianas que presentaron el mejor crecimiento en agar mineral y caldo mineral corresponden a *Bacillus coagulans* y *Bacillus brevis*.
- Mediante la cinética degradativa de petróleo crudo realizada con las cepas bacterianas seleccionadas *Bacillus coagulans* y *Bacillus brevis*, se determinó que ambas cepas tienen la capacidad de degradar una amplia gama de los constituyentes del petróleo crudo y al día treinta de medición la degradación es cercana al 30 % de los grupos funcionales que conforman el petróleo crudo.
- Las cepas bacterianas seleccionadas en el estudio, son consideradas aptas para ser utilizadas en futuras pruebas y estudios que permitan generar tecnologías de biorremediación apropiadas para suelos de la XII Región de Chile con problemas de contaminación con petróleo crudo.

7. RESUMEN

Algunos suelos de la XII Región de Chile se han visto afectados por derrames y confinamientos de petróleo crudo producto de la actividad petrolera imperante en la zona. Con miras a la recuperación de estos suelos mediante métodos biológicos, se han planteado como objetivos determinar las alteraciones químicas que sufren estos suelos y aislar desde ellos bacterias con capacidad hidrocarburofítica.

Desde los sectores Catalina Sur, Clarencia y Posesión se recolectaron a dos profundidades (0 – 20 cm y 20 – 40 cm) Muestras de suelos afectados y no afectados con petróleo crudo. A cada una de las muestras se les determino el pH, materia orgánica, nitrógeno total y fósforo total, bases intercambiables y su granulometría mediante los métodos convencionales para análisis de suelo. Microbiológicamente, desde cada muestra de suelo, se aislaron bacterias mediante el método de las diluciones seriadas, posteriormente se sembró en agar peptona al 2% y para seleccionar las cepas con capacidad hidrocarburofítica se realizaron cultivos en agar (AM + P) y caldo mineral (CM + P) adicionado con petróleo crudo. Las cepas seleccionadas se sometieron a una cinética de degradación de petróleo crudo hasta por 30 días cuantificada mediante espectrofotometría infrarrojo.

Como la principal alteración en los suelos afectados con petróleo crudo, se determino un incremento de la Materia orgánica y en consecuencia el Carbono orgánico en comparación a estos mismos suelos no afectados con petróleo crudo. Desde los suelos afectados y no afectados con petróleo crudo, se aislaron un total de 240 cepas bacterianas. Las cepas que presentaron mejor crecimiento en AM + P y un incremento de la biomasa en CM + P fueron *Bacillus coagulans* y *Bacillus brevis*, seleccionadas para realizar la cinética de degradación de petróleo crudo. Al día 30 de la cinética degradativa realizada independientemente con cada cepa seleccionada se determinaron valores de degradación de los grupos funcionales totales del hidrocarburo de alrededor

de un 30 % y que ambas cepas son capaces de degradar un amplio rango de grupos funcionales constituyentes del petróleo crudo, entre ellos grupos alifáticos y aromáticos.

SUMMARY

Some soils from the XII District in Chile have been affected by crude oil spills and confinements due to oil industry, which have been carried out in the area. Looking for recuperating these soils through biological approaches, some objectives have been set in order to determine chemical alterations that affect these soils and to isolate bacteria having hydrocarbon degrading capacity.

Samples of soils affected and non-affected by crude oil have been collected from Catalina Sur, Clarencia and Posesión from two different depths (0 - 0,2 m and 0,2 – 0,4 m). To each sample pH, organic matter, organic carbon, mineral nitrogen, available phosphorus, exchangeable bases and texture were determined by conventional soil analysis methods. From each soil sample bacteria were isolated microbiologically through dilution series method and they were sowed on AP 2% in order to select strains having hydrocarbon degrading capacity. Also tests in AM +P and CM+P were carried out. To each selected strain a crude oil degrading kinetic was carried out during 30 days and measured by infrared spectrophotometry.

Increase of soil organic matter and organic carbon was detected in comparison to the non-affected soils by crude oil as the main alteration of soils affected by crude oil. From affected and non-affected soils, 240 bacterial strains were isolated. The strains that showed better growth in AM+P and increase of their biomass in CM+P were *Bacillus coagulans* and *Bacillus brevis*. Thus, they were selected to decay crude oil evaluating their degrading kinetic. After 30 days of independent incubation for each strain some degrading values were determined of the total functional groups of the hydrocarbon of about 30% and also it was determined that both strains can degrade a wide range of functional groups from the crude oil, such as aliphatic and aromatic groups.

8. BIBLIOGRAFÍA

- ABU-ELGHEIT M. A. y YUSEF H. M. 1981. Isolation of hydrocarbon degrading microorganisms in mediterranean waters. *Environment international*. Vol. 4: 417–420.
- ADAMS R. 1999. A full comparison of introduced vs Indigenous microorganism for bioremediation. Conference of the Colorado hazardous wastes management. Denver–Colorado, USA. 22–24 Oct. Disponible en <http://www.epa.gov>. Consultado el 03 jun. 2004.
- ADENIPEKUN C. y FASIDI O. 2005. Bioremediation of oil-polluted soil by *Lentinus subnudus*, a Nigerian white-rot fungus. *African journal of biotechnology*. Vol. 4 (8): 796 – 798.
- ALEXANDER, M. 1961. *Introduction to soil microbiology*. John Wiley. New York, USA. 472 p.
- ALTAMIRANO, M. y POZZO, M. 2000. Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburoclíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVII Congreso interamericano de Ingeniería ambiental y sanitaria. Buenos Aires, Argentina. 6 p. Disponible en www.ingenieroambiental.com, Consultado el 03 jun. 2004.
- AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE (API). 1972. Detection, sampling, and analysis of hydrocarbons. The migration of petroleum products in soil and ground water. Washington-D.C, USA. Publication 4149: 24-27.

- ARAF A M. 2003. Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (BTEXs) by a bacterial consortium isolated from polluted site in Saudi Arabia. *Pakistan Journal of biological sciences*. Vol. 17 (6): 1482-1486
- ARENAS S. 1999. Aislamiento y caracterización de bacterias de ambientes contaminados con petróleo en refinería, La Pampilla. Tesis para optar al grado de Biólogo. Universidad Nacional de La Molina. Lima, Perú. Facultad de Ciencias Biológicas. 112 p.
- AROCENA J., RUTHERFORD M. 2005. Properties of hydrocarbon and salt contaminated flare pit soils in northeastern British Columbia (Canada). University of Northern British Columbia, Prince George, BC Canada. Vol. 60 (4): 567-75.
- ASTLE M. 1962. *Petroquímica*. Editorial Universitaria. Primera Edición. Buenos Aires, Argentina. 310 p.
- ATLAS R. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspectiva. *Microbiological reviews*. Vol. 45 (1): 180-209.
- ATLAS R., HOROWITZ A., KRICHEVSKY M., BEJ K. 1991. Response of microbial population to environmental disturbance. *Microbiology. Ecol.* Vol. 22: 249 – 256.
- ATLAS R. y BARTHA R. 2002. *Ecología Microbiana y microbiología ambiental*. 4ta edición. Addison Wesley. Madrid, España. 677 p.

- BENKA-COKER M y EKUNDAYO J. 1995. Effects of an oil spill on soil physico-chemical properties of a spill site in the Niger Delta Area of Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*. Vol. 36 (2): 1573-2959.
- BRISSIO P. 2005. Evaluación preliminar del estado de contaminación en suelos de la provincia del Neuquén donde se efectúan actividades de explotación hidrocarburífera. Tesis Saneamiento y Protección Ambiental. Universidad Nacional del Comahue. Argentina. Disponible en <http://www.tesis.bioetica.org/pab7.htm>, consultado el 12 de Febrero del 2006.
- BUCHANAN R., y GIBBONS N. 1974. *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*. Eighth edition. Williams & Wilkins Company. USA. 123 p.
- BURGOS R. 1999. Degradación de hidrocarburos. Disponible en <http://www.bioinformatica.uab.es>. Consultado el 03 jun. 2004.
- CARLSON, C. 1998. Influences of sorption on microbial degradation. University of Lund. Sweden. Disponible en <http://www.ecotox.lu.se>. Consultado el 03 jun. 2004.
- COATES J. 2000. Interpretation of Infrared Spectra, A Practical Approach. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd. USA. 10837 p.
- COULON F. 2005. Degradation of petroleum hydrocarbons in two sub-antarctic soils: influence of an oleophilic fertilizar. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 23 (8): 1893–1901.

- CUBITO M. y CABEZALI C. 2000. Tipificación y evolución de la actividad degradadora de hidrocarburos de una cepa bacteriana aislada del estuario de Bahía Blanca, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 33 (3): 141–148.
- DOMÉNECH X. 1995. *Química de Suelos, El impacto de los contaminantes*. Miraguano. Madrid, España. 190 p.
- DIAZ I., RAMIREZ H., GUTIERREZ M., FAVELA E. 2003. Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Can. J. Microbiol. Rev. can. microbiol.* Vol. 49 (12): 755-761.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). 1999. *Aerobic biodegradation of organic chemicals in environmental media: A summary of field and laboratory studies*. 183 p.
- FONTÚRBEL, F. y ACHÁ D. 2000. Empleo del método de determinación de biomasa microbiana por fumigación-extracción para el estudio en suelos del altiplano boliviano contaminados por hidrocarburos. *Ciencia abierta*. Disponible en <http://cabierta.uchile.cl>. Consultado el 15 ene. 2004.
- FRITSCHÉ W. y HOFRICHTER M. 2004. *Environmental Biotechnology*. 1ra edición, II. Soil Treatment. Wiley VCH. London, UK. 380 p.
- GILES W., KRIEL K. y STEWART J. 2001. Characterization and Bioremediation of a Weathered Oil Sludge. *Environmental Geosciences*. Vol. 8. (2): 110-122.

- GOMEZ M., CAMPOS N., HURTADO C., CASANOVA R. 2004. Selección y aplicación de bacterias con capacidad degradadora. Programa de Calidad Ambiental Marina. Instituto de Investigaciones marinas y costeras. Bogota, Colombia. 18 p.
- GRANT, W.D. 1981. Environmental microbiology. John Willet and Sons. New Cork - USA. 207 p.
- GUTIÉRREZ M. y ZAVALA J. 2001. Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. Documento Insituto de recursos naturales de la Universidad de Tabasco, México: 101-11.
- HATTORI T. 1973. Microbial life in the soil; An introduction. M. Dekker. New York, USA. 427 p.
- HIGGINS I. y BURNS R. 1975. The chemistry and microbiology of pollution. Academic Press, London, UK. VIII edition. 248 p.
- ILYNA, A. SANCHEZ, C. VILLARREAL, J. RAMIREZ, G. CANDELAS J. 2003. Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. Becth. Mock. Vol. 44 (1): 88-91.
- INSTITUTO MEXICANO DEL PETROLEO; IMP. 2002. El petróleo. Disponible en <http://www.imp.mx>, Consultado el 4 de Mar. 2004.
- JOBSON A., COOK F. y WESTLAKE D. 1972. Microbial utilization of crude oil. Applied microbiology. Vol. 23 (6): 1082-1089.

- JONES J.B. 2001. Laboratory guide for conducting soil test and plants analysis. Editorial CRC Press. Florida, USA. 256 p.
- LAGREGA, M. BUCKINGHAM, L., EVANS, J. 1996. Gestión de Residuos Tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Volumen II. McGraw-Hill. Madrid, España. 316 p.
- LEVIN M. y GEALT M. 1997. Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. McGraw-Hill. Madrid, España. 153 p.
- LI G., HUANG W., LERNER D. y ZHANG X. 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soil. Elsevier Science. Vol. 34 (15): 3845 – 3853.
- LOPOLITO M., MOLINA M., CORBELLA M., KABBAS S., GARCIA E., LANFRANCHI D., GOMEZ L. 1996. Biodegradación de hidrocarburos de petróleo y compuestos relacionados. Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Hídrica. Buenos Aires-Argentina. Disponible en <http://www.ingenieroambiental.com>. Consultado el 15 Ene. 2004.
- LUQUE J. 1997. Saneamiento de un área de derrames de hidrocarburos mediante biodegradación. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria – INTA. Argentina. Disponible en <http://www.agrohispana.com>. Consultado el 05 feb. 2004.
- MACNAUGHTON S., STEPHEN J., VENOSA A., DAVIS G., CHANG Y. y WHITE D. 1999. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65 (8): 3566 – 3574.

- MARCHAL R., PENET S., SOLANO-SERENA F., VANDECASTEELE J. 2003. Gasoline and diesel oil biodegradation. *Oil and Gas science and technology*. Vol. 58 (4): 441 – 448.
- MARTÍNEZ, V. y LÓPEZ, F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de un suelo arcilloso. Publicado en *Terra* 19: 9-17.
- MERINO F. 1998. Estudio de microorganismos nativos productores de emulsificantes de petróleo. Tesis para optar al grado de Biólogo. Universidad Nacional La Molina. Lima, Perú. Facultad de Ciencias Biológicas. 98 p.
- MOURSY A. y EL-ABAGY M. 1981. Biodegradability of hydrocarbons in the refinery wastewater from Moustoros oil refinery. *Environmental international*. Vol. 5: 39 – 46.
- NACIONES UNIDAS. 1958. Great soil groups in Chile and their relationship to natural land and water resources. Food and agriculture organization of the united nations in cooperation with the ministry of agriculture Chile - South America. 308 p.
- NAKAMATSU, V; N. CIANO; J. LUQUE; C. LISONI; J.M. QUINTEROS; O. MACKEPRANG. 1996. Adaptación de especies vegetales nativas a suelos contaminados con hidrocarburos. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, INTA. Argentina. Segundas Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria Petrolera: 613-619.
- OBIRE O. y NWAUBETA O. 2002. Effects of Refined Petroleum Hydrocarbon on Soil Physicochemical and Bacteriological Characteristics. *Journal of Applied Sciences & Environmental Management*, Vol. 6 (1): 39-44.

- ODOKUMA L. y DICKSON A. 2003. Bioremediation of a Crude Oil Polluted Tropical Mangrove Environment. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. Vol. 7 (2): 23-29.
- OGBOGHODO I., AZENABOR U., OSEMWOTA I. 2005. Amelioration of a Crude-Oil-Polluted Soil with Poultry Manure and the Effects on Growth of Maize and Some Soil Properties. *Journal of Plant Nutrition*. Vol. 28 (1): 21–32.
- OKOLO J., AMADI E., ODU C. 2005. Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a sandy loam soil. Department of microbiology Federal university of Nigeria. Disponible en www.ecology.kee.hu. Consultado el 17 de Marzo del 2006.
- OKPOKWASILI G. y AMANCHUKWU S. 1988. Petroleum hydrocarbons degradation by Candida Species. *Environmental international*. Vol. 14: 243 – 247.
- ORTINEZ O., IZE I. y GAVILAN A. 2005. Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. Instituto Nacional de Ecología de Mexico. Disponible en <http://www.ine.gob.mx>. Consultado el 12 de Oct. De 2006.
- PALA, D. FREIRE, D. SANT'ANNA JR., G. 2002. Bioremediation of clay soils impacted by petroleum. 17 th World Petroleum Congress. Rio de Janeiro–Brasil. Programa de Engenharia Química. pp. 29-32. Disponible en <http://www.pipe.ufpr.br>, consultado el 05 feb. 2004.

- PARDO J., PERDOMO M., BENAVIDES J. 2002. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo a nivel de laboratorio. Tesis para optar al título de Ingeniero Ambiental. Universidad De La Salle, Costa Rica. Facultad de Ingeniería Ambiental y Sanitaria. 188 p.
- PERRY J. 1979. Microbial cooxidations involving hydrocarbons. *Applied microbiology*. Vol. 43 (1): 59-72.
- PINIETA-FLORES G. y MESTA-HOWARD A. 2001. Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de microbiología*. Vol. 43 (3): 143–150.
- RITTMANN, B. 2001. *Biotechnología del medio ambiente, Principios y aplicaciones*. McGraw-Hill. Madrid, España. 745 p.
- RIVERA-CRUZ, M. FERRERA, R. VOLKE, V. RODRIGUEZ, R. FERNANDEZ, L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Publicado por Terra* 20: 423-434.
- SADZAWKA R. 2000. *Métodos de análisis de suelos*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Estación experimental INIA, La Platina. Santiago, Chile. 89 p.
- SAEZ, C. 1995. *Fertilidad de los suelos de la Región de Magallanes*. Escuela de Ciencia y Tecnología en Recursos Agrícolas y acuícolas. Universidad de Magallanes. Punta Arenas, Chile. 31 p.

- SARUBBI, A. 2000. Aspectos importantes en biorremediación. AIDIS Argentina. Disponible en <http://www.aidisar.org>. Consultado el 15 ene. 2004
- SCHAEFFER T., CANTWELL S., BROWN J., WATT D., FALL R. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 38 (4): 742–746
- SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2003. El pastizal de Tierra del Fuego. Guía de uso, condición actual y propuesta de seguimiento para determinación de tendencia. Proyecto FNDR -Protección y recuperación de pastizales de la XII Región-. Punta Arenas, Chile. 117 p.
- SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO. 2004. El pastizal de Magallanes. Guía de uso, condición actual y propuesta de seguimiento para determinación de tendencia. Proyecto FNDR -Protección y recuperación de pastizales de la XII Región-. Punta Arenas, Chile. 127 p.
- SHARPLEY J. M. 1966. *Petroleum Microbiology*. Gulf publishing company. Houston - Texas, USA. 249 p.
- SHEVNIN V., DELGADO O., ZEGARRA H., MOUSATOV A., RYJOV A. 2004. Estudio en la variación de la resistividad del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en laboratorio y campo. Informe GEOS. Instituto Mexicano del Petróleo (IMP). Vol. 24 (2): 183 p.
- STONE R., FENSKE M., WHITE A. 1941. Bacteria attacking petroleum and oil fractions. Department of bacteriology, Pennsylvania state college. *Journal of Bacteriology*. Vol. 44 (2): 169–178.

- THOUAND G., BAUDA P., OUDOT J., KRISCH G., SUTTON C., VIDALIE J. 1999. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. *Can. J. Microbiol. Rev. can. microbiol.* 45 (2): 106-115.
- WALKER J.D. y COLWELL R.R. 1977. Role of autochthonous bacteria in the removal of spilled oil from sediment. *Environmental pollution*. Vol. 12 (1): 51-56.
- WANDRUSZKA R. 2006. Phosphorus retention in calcareous soils and the effect of organic matter on its mobility. *Geochemical transaction*. Vol. 7 (6): 1-8.
- WATKINSON R. 1978. *Developments in biodegradation of hydrocarbons*. Applied science publishers. London, UK. 232 p.

ANEXOS

ANEXO 1. Medios de cultivos

Agar Mineral (AM+P). FUENTE: ILYNA *et al.* (2003)

Agar – agar	20 gr.
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 gr.
Na ₂ HPO ₄	0,2 gr.
Água destilada estéril	1000 mL.
Petróleo crudo	10 mL.

Caldo Mineral (CM+P). FUENTE: ILYNA *et al.* (2003)

(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 gr.
Na ₂ HPO ₄	0,2 gr.
Água destilada estéril	1000 mL.
Petróleo crudo	3% v/v.

Medio Mineral Salino para cinética degradativa de petróleo crudo.

FUENTE: ABU-ELGHEIT y YUSEF (1981)

NH ₄ NO ₃	2 gr.
Na ₂ HPO ₄	1,5 gr.
MgSO ₄ -7H ₂ O	0,5 gr.
Água destilada estéril	1000 mL.
Petróleo crudo	3% v/v.

ANEXO 2 Análisis granulométrico de los suelos estudiados.

Muestras suelo	Arcilla (%)	Limo (%)	Arena (%)	Clase Textural
Calentador 18-Clarencia	40	20	40	Franco arcilloso
Posesión	10	20	70	Franco arcilloso
Catalina Sur	10	30	60	Franco arenoso

ANEXO 3 Crecimiento real para cepas aisladas del suelo Catalina Sur control (0–20 cm) cultivadas en AM + P.

Suelo Catalina Sur control (0-20 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
C121	1	0,5	0,3	0,6	0,7	0,06	C131	1	0,5	0,3	0,5	0,5	0,02
	2	0,5	0,4	0,9	0,5			2	0,6	0,3	0,7	0,4	
	3	0,5	0,3	1	0,5			3	0,3	0,3	0,9	0,4	
C122	1	0,3	0,2	0,7	0,6	0,12	C132	1	0,4	0,3	0,5	0,3	0,00
	2	0,3	0,3	0,6	0,6			2	0,5	0,3	0,6	0,3	
	3	0,4	0,3	0,8	0,6			3	0,4	0,4	0,6	0,4	
C123	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,00	C133	1	0,4	0,3	0,6	0,3	0,01
	2	0,3	0,2	0,3	0,2			2	0,4	0,3	0,5	0,4	
	3	0,3	0,2	0,3	0,2			3	0,2	0,2	0,4	0,3	
C124	1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,00	C134	1	0,3	0,3	0,7	0,7	0,16
	2	0,2	0,2	0,3	0,3			2	0,3	0,2	0,6	0,6	
	3	0,2	0,2	0,3	0,2			3	0,3	0,2	0,7	0,7	
C125	1	0,4	0,3	1	0,4	0,06	C135	1	0,5	0,3	0,5	0,5	0,03
	2	0,5	0,3	0,8	0,6			2	0,5	0,2	0,7	0,6	
	3	0,3	0,3	0,6	0,4			3	0,8	0,3	0,8	0,5	
C126	1	0,4	0,3	0,9	0,4	0,06	C136	1	0,2	0,2	0,8	0,6	0,17
	2	0,8	0,3	1,3	0,4			2	0,3	0,3	0,7	0,6	
	3	0,5	0,3	1,3	0,4			3	0,3	0,3	0,8	0,6	
C127	1	0,2	0,2	0,6	0,6	0,13	C137	1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,00
	2	0,3	0,2	0,9	0,4			2	0,2	0,2	0,3	0,3	
	3	0,3	0,2	0,8	0,4			3	0,2	0,2	0,3	0,2	
C128	1	0,4	0,3	1	0,4	0,06	C138	1	0,3	0,3	0,4	0,4	0,04
	2	0,5	0,3	0,8	0,6			2	0,3	0,3	0,5	0,4	
	3	0,3	0,3	0,6	0,4			3	0,3	0,2	0,8	0,4	
C129	1	0,3	0,3	0,4	0,4	0,04	C139	1	0,5	0,3	0,5	0,5	0,02
	2	0,3	0,3	0,5	0,4			2	0,6	0,3	0,7	0,4	
	3	0,3	0,2	0,8	0,4			3	0,3	0,3	0,9	0,4	
C130	1	0,4	0,3	0,7	0,5	0,05	C140	1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,05
	2	0,4	0,3	0,6	0,5			2	0,2	0,2	0,9	0,4	
	3	0,3	0,3	0,8	0,4			3	0,3	0,2	0,4	0,3	

ANEXO 4 Crecimiento real para cepas aisladas de suelo Catalina Sur control (20–40) cm cultivadas en AM + P.

Suelo Catalina Sur control (20-40 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
C21	1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,00	C31	1	0,2	0,2	0,7	0,5	0,13
	2	0,2	0,2	0,3	0,3			2	0,3	0,3	0,6	0,5	
	3	0,2	0,2	0,3	0,2			3	0,4	0,2	1	0,5	
C22	1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,06	C32	1	0,2	0,2	0,9	0,3	0,15
	2	0,1	0,1	0,5	0,4			2	0,2	0,2	0,9	0,4	
	3	0,2	0,2	0,6	0,3			3	0,2	0,2	1	0,5	
C23	1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,00	C33	1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,00
	2	0,4	0,2	0,5	0,3			2	0,2	0,2	0,2	0,2	
	3	0,6	0,2	0,6	0,2			3	0,2	0,2	0,2	0,2	
C24	1	0,4	0,2	0,8	0,3	0,02	C34	1	0,3	0,3	0,6	0,6	0,12
	2	0,3	0,2	0,4	0,4			2	0,3	0,3	0,6	0,5	
	3	0,4	0,2	0,5	0,3			3	0,3	0,3	0,8	0,7	
C25	1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,00	C35	1	0,4	0,3	0,8	0,4	0,08
	2	0,4	0,3	0,4	0,3			2	0,3	0,2	1	0,4	
	3	0,3	0,2	0,3	0,2			3	0,3	0,3	0,9	0,4	
C26	1	0,3	0,2	1,2	0,8	0,25	C36	1	0,2	0,2	0,8	0,6	0,17
	2	0,4	0,2	0,8	0,6			2	0,3	0,3	0,7	0,6	
	3	0,2	0,2	0,6	0,3			3	0,3	0,3	0,8	0,6	
C27	1	0,3	0,2	0,7	0,6	0,12	C37	1	0,2	0,2	0,6	0,5	0,06
	2	0,3	0,3	0,6	0,6			2	0,3	0,1	0,8	0,2	
	3	0,4	0,3	0,8	0,6			3	0,2	0,2	0,7	0,2	
C28	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,00	C38	1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,05
	2	0,3	0,2	0,3	0,2			2	0,2	0,2	0,9	0,4	
	3	0,3	0,2	0,3	0,2			3	0,3	0,2	0,4	0,3	
C29	1	0,2	0,2	0,9	0,3	0,03	C39	1	0,5	0,2	1	0,3	0,02
	2	0,3	0,3	0,5	0,4			2	0,5	0,3	1	0,3	
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,4	0,3	0,5	0,3	
C30	1	0,4	0,3	0,9	0,3	0,02	C40	1	0,2	0,2	1,2	0,6	0,23
	2	0,3	0,3	0,8	0,4			2	0,3	0,2	1	0,5	
	3	0,4	0,3	0,5	0,4			3	0,2	0,2	0,9	0,3	

ANEXO 5 Crecimiento real para cepas aisladas de suelo Catalina Sur contaminado (0–20 cm) AM + P.

Suelo Catalina Sur Contaminado (0-20 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
C61	1	0,3	0,3	1	1	0,20	C71	1	0,4	0,2	0,8	0,6	0,06
	2	0,3	0,3	0,9	0,4			2	0,6	0,4	1,1	0,4	
	3	0,3	0,3	0,6	0,5			3	0,7	0,4	1	0,5	
C62	1	0,3	0,2	0,4	0,2	0,00	C72	1	0,4	0,2	0,9	0,3	0,08
	2	0,4	0,4	0,4	0,4			2	0,4	0,2	0,7	0,5	
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,6	0,3	1,1	0,5	
C63	1	0,2	0,2	0,4	0,6	0,07	C73	1	0,6	0,3	1	0,4	0,05
	2	0,4	0,4	0,6	1			2	0,4	0,3	0,8	0,4	
	3	0,3	0,3	0,3	0,4			3	0,3	0,3	0,6	0,5	
C64	1	0,4	0,3	0,8	0,6	0,15	C74	1	0,4	0,4	0,6	0,6	0,03
	2	0,2	0,2	0,6	0,6			2	0,4	0,4	0,6	0,6	
	3	0,2	0,2	1	0,4			3	0,5	0,3	0,6	0,4	
C65	1	0,6	0,3	1	0,4	0,05	C75	1	0,6	0,4	1,1	0,7	0,10
	2	0,4	0,3	0,8	0,4			2	0,4	0,4	1,1	0,6	
	3	0,3	0,3	0,6	0,5			3	0,5	0,4	0,8	0,4	
C66	1	0,4	0,4	0,6	0,6	0,03	C76	1	0,5	0,5	0,6	0,5	0,00
	2	0,4	0,4	0,6	0,6			2	0,3	0,3	0,6	0,3	
	3	0,5	0,3	0,6	0,4			3	0,3	0,3	0,4	0,4	
C67	1	0,6	0,4	1,1	0,7	0,10	C77	1	0,5	0,3	0,9	0,6	0,09
	2	0,4	0,4	1,1	0,6			2	0,4	0,3	0,7	0,5	
	3	0,5	0,4	0,8	0,4			3	0,4	0,2	0,8	0,4	
C68	1	0,5	0,5	0,6	0,5	0,00	C78	1	0,5	0,3	0,6	0,7	0,06
	2	0,3	0,3	0,6	0,3			2	0,5	0,4	0,9	0,5	
	3	0,3	0,3	0,4	0,4			3	0,5	0,3	1	0,5	
C69	1	0,5	0,3	0,9	0,6	0,09	C79	1	0,4	0,2	0,8	0,6	0,06
	2	0,4	0,3	0,7	0,5			2	0,6	0,4	1,1	0,4	
	3	0,4	0,2	0,8	0,4			3	0,7	0,4	1	0,5	
C70	1	0,5	0,3	0,6	0,7	0,06	C80	1	0,4	0,3	1	0,4	0,06
	2	0,5	0,4	0,9	0,5			2	0,5	0,3	0,8	0,6	
	3	0,5	0,3	1	0,5			3	0,3	0,3	0,6	0,4	

ANEXO 6 Crecimiento real para cepas aisladas de suelo Catalina Sur contaminado (20-40 cm) en AM + P.

Suelo Catalina Sur Contaminado (20-40 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
C1	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,00	C11	1	0,2	0,2	0,6	0,3	0,04
	2	0,2	0,2	0,2	0,2			2	0,3	0,3	0,6	0,4	
	3	0,2	0,2	0,2	0,2			3	0,4	0,3	0,9	0,4	
C2	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,00	C2	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,00
	2	0,3	0,3	0,3	0,3			2	0,3	0,3	0,3	0,3	
	3	0,4	0,3	0,4	0,3			3	0,3	0,3	0,3	0,3	
C3	1	0,4	0,2	0,4	0,2	0,00	C13	1	0,3	0,3	0,7	0,5	0,06
	2	0,2	0,2	0,2	0,2			2	0,3	0,3	0,8	0,4	
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,4	0,3	0,7	0,5	
C4	1	0,4	0,3	0,7	0,5	0,05	C14	1	0,5	0,3	0,8	0,5	0,11
	2	0,2	0,2	0,5	0,5			2	0,2	0,2	1	0,5	
	3	0,3	0,3	0,4	0,4			3	0,4	0,2	0,5	0,4	
C5	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,00	C15	1	0,3	0,2	0,4	0,2	0,00
	2	0,3	0,2	0,3	0,2			2	0,2	0,2	0,3	0,2	
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,3	0,2	0,4	0,3	
C6	1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,02	C16	1	0,3	0,3	0,4	0,4	0,01
	2	0,3	0,3	0,5	0,4			2	0,4	0,2	0,5	0,3	
	3	0,3	0,3	0,5	0,5			3	0,2	0,2	0,3	0,3	
C7	1	0,2	0,2	0,8	0,5	0,14	C17	1	0,3	0,3	1	0,4	0,03
	2	0,2	0,2	0,6	0,5			2	0,3	0,2	0,5	0,3	
	3	0,2	0,2	0,6	0,5			3	0,3	0,2	0,3	0,3	
C8	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,00	C18	1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,00
	2	0,2	0,2	0,2	0,2			2	0,2	0,2	0,3	0,3	
	3	0,3	0,2	0,3	0,2			3	0,2	0,2	0,3	0,2	
C9	1	0,4	0,3	0,5	0,4	0,01	C19	1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,00
	2	0,4	0,3	0,5	0,4			2	0,2	0,2	0,2	0,2	
	3	0,4	0,3	0,5	0,4			3	0,2	0,2	0,2	0,2	
C10	1	0,3	0,3	0,4	0,3	0,02	C20	1	0,2	0,2	0,6	0,4	0,06
	2	0,3	0,3	0,5	0,4			2	0,2	0,2	0,5	0,4	
	3	0,3	0,3	0,6	0,4			3	0,3	0,2	0,5	0,4	

ANEXO 7 Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Posesión control (0–20 cm) cultivadas en AM + P.

Suelo Posesión control (0-20 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
221	1	0,4	0,3	0,6	0,5	0,03	231	1	0,4	0,2	0,8	0,3	0,02
	2	0,3	0,2	0,5	0,4			2	0,3	0,2	0,4	0,4	
	3	0,4	0,2	0,5	0,4			3	0,4	0,2	0,5	0,3	
222	1	0,4	0,3	1	0,4	0,06	232	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,00
	2	0,5	0,3	1,1	0,4			2	0,4	0,3	0,4	0,3	
	3	0,3	0,3	1	0,4			3	0,5	0,3	0,5	0,3	
223	1	0,2	0,2	0,7	0,3	0,05	233	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,00
	2	0,3	0,1	0,8	0,3			2	0,4	0,2	0,4	0,2	
	3	0,3	0,3	0,4	0,3			3	0,7	0,2	1	0,2	
224	1	0,2	0,1	0,6	0,2	0,03	234	1	0,5	0,2	0,9	0,7	0,07
	2	0,4	0,1	0,6	0,2			2	0,6	0,2	0,6	0,6	
	3	0,5	0,1	0,8	0,2			3	0,5	0,3	0,6	0,5	
225	1	0,2	0,2	0,6	0,4	0,05	235	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,00
	2	0,2	0,2	0,4	0,4			2	0,4	0,2	0,4	0,2	
	3	0,4	0,2	0,6	0,4			3	0,4	0,2	0,4	0,2	
226	1	0,4	0,4	0,6	0,4	0,03	236	1	0,5	0,2	0,7	0,5	0,05
	2	0,4	0,3	1	0,4			2	0,4	0,3	0,6	0,5	
	3	0,6	0,3	0,8	0,4			3	0,4	0,3	0,6	0,5	
227	1	0,1	0,1	0,3	0,1	0,05	237	1	0,4	0,4	0,6	0,6	0,05
	2	0,2	0,2	0,7	0,3			2	0,3	0,3	0,6	0,5	
	3	0,1	0,1	0,6	0,3			3	0,4	0,3	0,6	0,5	
228	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,00	238	1	0,5	0,2	1	0,3	0,02
	2	0,3	0,1	0,3	0,1			2	0,5	0,2	0,7	0,2	
	3	0,2	0,2	0,3	0,3			3	0,7	0,2	0,8	0,2	
229	1	0,5	0,3	0,6	0,3	0,00	239	1	0,7	0,2	1,2	0,5	0,12
	2	0,3	0,2	0,4	0,3			2	0,4	0,3	0,6	0,4	
	3	0,4	0,2	0,4	0,2			3	0,4	0,3	1	0,6	
230	1	0,4	0,4	0,6	0,4	0,03	240	1	0,6	0,4	0,7	0,6	0,06
	2	0,4	0,3	1	0,4			2	0,5	0,4	0,9	0,6	
	3	0,6	0,3	0,8	0,4			3	0,6	0,3	0,8	0,7	

ANEXO 8 Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Posesión control (20-40 cm) cultivadas en AM + P.

Suelo Posesión control (20-40 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
141	1	0,3	0,3	0,4	0,3	0,01	151	1	0,2	0,2	0,8	0,2	0,00
	2	0,3	0,2	0,4	0,3			2	0,5	0,2	0,6	0,2	
	3	0,2	0,2	0,4	0,3			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
142	1	0,5	0,3	0,8	0,5	0,13	152	1	0,5	0,2	0,7	0,4	0,33
	2	0,6	0,3	1,2	0,7			2	0,4	0,3	1,4	0,7	
	3	0,4	0,4	1,4	0,5			3	0,3	0,3	1,4	0,8	
143	1	0,4	0,1	0,5	0,2	0,01	153	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,02
	2	0,3	0,3	0,4	0,4			2	0,4	0,3	0,5	0,5	
	3	0,1	0,1	0,3	0,1			3	0,2	0,2	0,4	0,4	
144	1	0,5	0,3	0,7	0,4	0,03	154	1	0,3	0,2	0,8	0,3	0,04
	2	0,5	0,2	0,7	0,3			2	0,4	0,2	1	0,3	
	3	0,4	0,4	0,6	0,6			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
145	1	0,5	0,4	0,5	0,4	0,00	155	1	0,5	0,3	1,1	0,4	0,03
	2	0,5	0,3	0,5	0,3			2	0,3	0,3	0,9	0,3	
	3	0,5	0,3	0,5	0,3			3	0,5	0,3	0,8	0,4	
146	1	0,5	0,3	1	0,5	0,11	156	1	0,7	0,2	1,2	0,3	0,04
	2	0,5	0,3	1	0,5			2	0,6	0,3	1,1	0,3	
	3	0,3	0,3	1	0,5			3	0,5	0,3	1,1	0,4	
147	1	0,5	0,5	1,5	1,2	0,26	157	1	0,2	0,2	0,9	0,6	0,20
	2	0,4	0,3	0,4	0,3			2	0,4	0,3	1,1	0,6	
	3	0,4	0,3	1,2	0,4			3	0,4	0,3	1	0,5	
148	1	1	0,2	1	0,2	0,00	158	1	0,5	0,2	0,6	0,4	0,03
	2	0,6	0,2	0,6	0,3			2	0,3	0,2	0,4	0,4	
	3	0,3	0,2	0,4	0,3			3	0,2	0,2	0,4	0,4	
149	1	0,3	0,3	0,8	0,8	0,12	159	1	0,4	0,3	0,6	0,5	0,03
	2	0,4	0,3	0,9	0,4			2	0,3	0,2	0,5	0,4	
	3	0,3	0,2	0,9	0,3			3	0,4	0,2	0,5	0,4	
150	1	0,4	0,3	1,1	0,3	0,01	160	1	0,2	0,2	0,5	0,2	0,00
	2	0,4	0,2	1,1	0,2			2	0,4	0,2	0,6	0,2	
	3	0,5	0,2	0,9	0,3			3	0,3	0,2	0,5	0,2	

ANEXO 9 Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Posesión contaminado (0-20 cm) cultivadas en AM + P.

Suelo Posesión contaminado (0-20 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
201	1	0,3	0,3	0,4	0,4	0,04	211	1	0,5	0,2	0,6	0,2	0,00
	2	0,3	0,3	0,5	0,4			2	0,3	0,2	0,3	0,2	
	3	0,3	0,2	0,8	0,4			3	0,3	0,3	0,3	0,3	
202	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,00	212	1	0,2	0,2	0,3	0,3	0,01
	2	0,2	0,2	0,3	0,3			2	0,2	0,2	0,3	0,3	
	3	0,3	0,2	0,3	0,3			3	0,2	0,2	0,3	0,2	
203	1	0,3	0,2	0,5	0,3	0,01	213	1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,00
	2	0,4	0,2	0,6	0,3			2	0,4	0,4	0,4	0,5	
	3	0,2	0,1	0,3	0,1			3	0,4	0,2	0,4	0,2	
204	1	0,4	0,2	0,5	0,3	0,05	214	1	0,3	0,2	0,5	0,3	0,05
	2	0,3	0,2	0,5	0,5			2	0,4	0,2	0,8	0,3	
	3	0,3	0,2	0,6	0,5			3	0,6	0,3	1	0,5	
205	1	0,4	0,3	0,4	0,3	0,00	215	1	0,5	0,3	0,6	0,3	0,00
	2	0,3	0,3	0,3	0,3			2	0,3	0,2	0,4	0,3	
	3	0,4	0,3	0,4	0,3			3	0,4	0,2	0,4	0,2	
206	1	0,2	0,1	0,6	0,2	0,03	216	1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,00
	2	0,4	0,1	0,6	0,2			2	0,6	0,4	0,6	0,4	
	3	0,5	0,1	0,8	0,2			3	0,4	0,3	0,4	0,3	
207	1	0,4	0,2	0,8	0,3	0,02	217	1	0,6	0,2	0,8	0,3	0,02
	2	0,3	0,2	0,4	0,4			2	0,3	0,3	0,6	0,3	
	3	0,4	0,2	0,5	0,3			3	0,4	0,2	0,7	0,3	
208	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,00	218	1	0,3	0,3	0,7	0,3	0,00
	2	0,4	0,3	0,4	0,3			2	0,3	0,3	0,5	0,3	
	3	0,5	0,3	0,5	0,3			3	0,3	0,3	0,5	0,3	
209	1	0,3	0,2	0,6	0,3	0,02	219	1	0,8	0,2	0,8	0,3	0,01
	2	0,3	0,1	0,6	0,2			2	0,2	0,2	0,3	0,4	
	3	0,4	0,2	0,5	0,2			3	0,3	0,3	0,4	0,4	
210	1	0,3	0,3	0,4	0,3	0,00	220	1	0,4	0,2	0,4	0,2	0,01
	2	0,4	0,2	0,5	0,3			2	0,2	0,2	0,5	0,3	
	3	0,3	0,3	0,3	0,3			3	0,2	0,2	0,3	0,3	

ANEXO 10 Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Posesión contaminado (20-40 cm) cultivadas en AM + P.

Suelo Posesión contaminado (20-40 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
41	1	0,8	0,2	0,8	0,3	0,01	51	1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,01
	2	0,2	0,2	0,3	0,4			2	0,4	0,4	0,5	0,4	
	3	0,3	0,3	0,4	0,4			3	0,3	0,2	0,4	0,3	
42	1	0,3	0,3	1	0,5	0,20	52	1	0,5	0,3	0,9	0,4	0,05
	2	0,3	0,3	1,6	0,5			2	0,3	0,2	0,5	0,5	
	3	0,4	0,3	1,4	0,5			3	0,5	0,3	0,7	0,6	
43	1	0,4	0,3	0,8	1,2	0,54	53	1	0,2	0,2	0,8	0,2	0,00
	2	0,3	0,3	1,6	0,9			2	0,5	0,2	0,6	0,2	
	3	0,4	0,2	1,2	0,8			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
44	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,00	54	1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,00
	2	0,2	0,2	0,2	0,2			2	0,4	0,2	0,5	0,3	
	3	0,4	0,3	0,4	0,3			3	0,6	0,2	0,6	0,2	
45	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,00	55	1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,00
	2	0,4	0,3	0,4	0,3			2	0,4	0,2	0,5	0,3	
	3	0,5	0,3	0,5	0,3			3	0,6	0,2	0,6	0,2	
46	1	0,3	0,2	0,4	0,3	0,01	56	1	0,2	0,2	0,8	0,2	0,00
	2	0,4	0,4	0,5	0,4			2	0,5	0,2	0,6	0,2	
	3	0,3	0,2	0,4	0,3			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
47	1	0,5	0,3	0,9	0,4	0,05	57	1	0,3	0,3	0,4	0,3	0,01
	2	0,3	0,2	0,5	0,5			2	0,3	0,2	0,4	0,3	
	3	0,5	0,3	0,7	0,6			3	0,2	0,2	0,4	0,3	
48	1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,00	58	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,00
	2	0,4	0,2	0,5	0,3			2	0,3	0,2	0,3	0,2	
	3	0,6	0,2	0,6	0,2			3	0,3	0,2	0,3	0,2	
49	1	0,4	0,2	0,8	0,3	0,02	59	1	0,3	0,1	0,9	0,3	0,12
	2	0,3	0,2	0,4	0,4			2	0,3	0,2	0,6	0,5	
	3	0,4	0,2	0,5	0,3			3	0,3	0,1	1	0,3	
50	1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,00	60	1	0,2	0,2	0,4	0,2	0,00
	2	0,4	0,3	0,4	0,3			2	0,2	0,2	0,3	0,2	
	3	0,5	0,3	0,5	0,3			3	0,3	0,2	0,3	0,2	

ANEXO 11 Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Clarencia control (0–20 cm) cultivadas en AM + P.

Suelo Clarencia control (0-20 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
C161	1	0,4	0,3	0,5	0,5	0,02	C171	1	0,5	0,2	1,2	0,6	0,19
	2	1,1	0,2	1,4	0,3			2	0,6	0,3	1,4	0,5	
	3	0,6	0,3	0,7	0,4			3	0,3	0,2	1	0,4	
C162	1	0,3	0,2	1	0,5	0,13	C172	1	0,5	0,3	0,5	0,3	0,00
	2	0,4	0,2	1,4	0,3			2	0,3	0,2	0,3	0,2	
	3	0,5	0,2	1,4	0,3			3	0,3	0,3	0,3	0,3	
C163	1	0,5	0,3	0,6	0,4	0,03	C173	1	0,6	0,2	0,9	0,4	0,10
	2	0,5	0,2	1,1	0,3			2	0,5	0,2	1,1	0,5	
	3	0,2	0,2	0,5	0,3			3	0,5	0,3	1,1	0,4	
C164	1	0,3	0,3	1,3	0,3	0,11	C174	1	0,6	0,4	0,9	0,4	0,17
	2	0,2	0,2	1,4	0,3			2	0,2	0,2	1,3	0,6	
	3	0,2	0,2	1,2	0,4			3	0,4	0,3	0,7	0,5	
165	1	0,3	0,3	0,9	0,4	0,05	C175	1	0,3	0,2	0,9	0,4	0,12
	2	0,4	0,2	1	0,3			2	0,4	0,3	1,2	0,5	
	3	0,3	0,3	0,7	0,4			3	0,4	0,3	0,8	0,5	
C166	1	0,4	0,3	0,4	0,4	0,01	C176	1	0,3	0,3	0,8	0,4	0,05
	2	0,4	0,3	0,6	0,4			2	0,3	0,3	1,1	0,4	
	3	0,4	0,3	0,5	0,5			3	0,3	0,3	0,6	0,4	
C167	1	0,7	0,2	1	0,3	0,06	C177	1	0,2	0,2	1	0,6	0,22
	2	0,5	0,3	1,1	0,4			2	0,4	0,2	1,3	0,5	
	3	0,5	0,3	0,9	0,5			3	0,6	0,3	1	0,5	
C168	1	1	0,2	1,6	0,2	0,00	C178	1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,00
	2	0,5	0,2	0,7	0,2			2	0,2	0,2	0,2	0,2	
	3	0,4	0,2	0,7	0,2			3	0,2	0,2	0,2	0,2	
C169	1	0,3	0,3	1,5	0,5	0,18	C179	1	0,3	0,3	1,6	0,6	0,28
	2	0,4	0,2	1	0,6			2	0,5	0,3	1,4	0,6	
	3	0,3	0,3	0,9	0,4			3	0,4	0,2	1	0,5	
C170	1	0,6	0,2	0,9	0,5	0,08	C180	1	0,2	0,2	1,2	0,8	0,74
	2	0,4	0,2	1	0,3			2	0,2	0,2	1,6	0,9	
	3	0,3	0,3	1,3	0,4			3	0,1	0,1	2,2	0,4	

ANEXO 12 Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Clarencia control (20-40 cm) cultivadas en AM + P.

Suelo Clarencia control (20-40 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
81	1	0,3	0,3	0,5	0,3	0,01	91	1	0,3	0,2	0,3	0,3	0,02
	2	0,5	0,3	0,6	0,4			2	0,2	0,2	0,6	0,3	
	3	0,5	0,3	0,6	0,4			3	0,2	0,2	0,4	0,3	
82	1	0,3	0,2	1	0,5	0,11	92	1	0,4	0,4	1,4	0,5	0,07
	2	0,5	0,3	0,9	0,5			2	0,8	0,3	1,1	0,5	
	3	0,3	0,3	0,8	0,4			3	0,5	0,5	0,9	0,6	
83	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,01	93	1	0,5	0,3	1,2	0,5	0,13
	2	0,2	0,5	0,4	0,6			2	0,3	0,3	1,6	0,4	
	3	0,3	0,2	0,3	0,2			3	0,6	0,4	1	0,7	
84	1	0,6	0,2	1,1	0,6	0,19	94	1	0,5	0,3	1,5	0,5	0,13
	2	0,5	0,2	1,1	0,5			2	0,5	0,3	1,2	0,5	
	3	0,4	0,3	1	0,6			3	0,5	0,3	0,8	0,5	
85	1	0,3	0,2	0,7	0,3	0,08	95	1	0,6	0,3	1,2	0,8	0,19
	2	0,2	0,2	0,6	0,6			2	0,5	0,3	1,1	0,5	
	3	0,5	0,3	0,8	0,4			3	0,6	0,3	1,1	0,6	
86	1	0,4	0,3	0,9	0,4	0,06	96	1	0,5	0,3	0,5	0,5	0,00
	2	0,5	0,3	1	0,4			2	0,5	0,3	0,5	0,3	
	3	0,3	0,3	1,1	0,4			3	0,5	0,2	0,5	0,4	
87	1	0,8	0,3	1	0,4	0,15	97	1	0,7	0,3	1,4	0,4	0,03
	2	0,6	0,3	0,9	0,6			2	0,2	0,2	0,4	0,3	
	3	0,3	0,3	1,4	0,6			3	0,6	0,1	0,6	0,1	
88	1	0,5	0,3	1,6	1,2	0,51	98	1	0,6	0,3	1,1	0,4	0,07
	2	0,4	0,2	0,8	0,7			2	0,2	0,2	0,5	0,5	
	3	0,3	0,3	1	0,8			3	0,3	0,2	0,6	0,4	
89	1	0,5	0,3	0,9	0,3	0,08	99	1	0,7	0,3	1,2	0,6	0,07
	2	0,5	0,2	1,1	0,4			2	0,8	0,3	1	0,5	
	3	0,5	0,3	0,9	0,6			3	0,5	0,3	0,7	0,4	
90	1	0,4	0,3	0,5	0,5	0,02	100	1	0,8	0,3	1,6	0,5	0,12
	2	1,1	0,2	1,4	0,3			2	1,2	0,3	2,1	0,4	
	3	0,6	0,3	0,7	0,4			3	0,4	0,3	1	0,5	

ANEXO 13 Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Clarencia contaminado (0-20 cm) cultivadas en AM + P.

Suelo Clarencia contaminado (0-20 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
C101	1	0,5	0,3	0,5	0,5	0,02	C111	1	0,5	0,3	1,1	0,5	0,06
	2	0,6	0,3	0,7	0,4			2	0,3	0,3	1	0,4	
	3	0,3	0,3	0,9	0,4			3	0,4	0,3	1,1	0,3	
C102	1	0,4	0,3	0,7	0,4	0,07	C112	1	0,6	0,3	1,4	0,4	0,09
	2	0,5	0,2	0,7	0,5			2	0,4	0,3	0,9	0,4	
	3	0,3	0,3	0,9	0,5			3	0,5	0,3	1	0,6	
C103	1	0,4	0,2	1,5	0,5	0,24	C113	1	0,7	0,3	1,4	0,5	0,08
	2	0,6	0,2	0,9	0,3			2	0,4	0,3	0,9	0,5	
	3	0,5	0,4	1,4	0,8			3	0,4	0,4	1	0,4	
C104	1	0,6	0,3	0,6	0,3	0,00	C114	1	0,5	0,4	0,5	0,4	0,00
	2	0,7	0,3	0,7	0,3			2	0,6	0,3	0,6	0,3	
	3	0,6	0,3	0,6	0,3			3	0,6	0,4	0,6	0,4	
C105	1	0,6	0,3	1,1	0,5	0,06	C115	1	0,5	0,4	0,8	0,6	0,07
	2	0,5	0,3	0,7	0,4			2	0,3	0,3	0,5	0,5	
	3	0,5	0,3	1	0,4			3	0,4	0,3	0,8	0,6	
C106	1	0,4	0,3	1,1	0,4	0,05	C116	1	0,3	0,3	0,5	0,3	0,01
	2	0,5	0,3	1,2	0,4			2	0,5	0,3	0,6	0,4	
	3	0,3	0,3	0,8	0,3			3	0,5	0,3	0,6	0,4	
C107	1	0,7	0,3	1	0,5	0,08	C117	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,00
	2	0,6	0,4	0,7	0,6			2	0,3	0,3	0,3	0,3	
	3	0,6	0,4	1	0,8			3	0,4	0,4	0,4	0,4	
C108	1	0,5	0,3	1	0,4	0,12	C118	1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,06
	2	0,5	0,3	1,5	0,4			2	0,1	0,1	0,5	0,4	
	3	0,2	0,2	1,2	0,4			3	0,2	0,2	0,6	0,3	
C109	1	0,2	0,2	0,5	0,5	0,10	C119	1	0,6	0,3	0,8	0,6	0,04
	2	0,5	0,3	0,7	0,5			2	0,4	0,4	0,8	0,5	
	3	0,3	0,3	1,1	0,5			3	0,5	0,5	0,6	0,6	
C110	1	0,3	0,2	1	0,5	0,11	C120	1	0,7	0,3	1	0,5	0,04
	2	0,4	0,3	1,4	0,4			2	0,6	0,3	0,9	0,4	
	3	0,6	0,3	0,9	0,4			3	0,5	0,3	0,7	0,4	

**ANEXO 14 Crecimiento real de cepas aisladas de suelo Clarencia contaminado
(20-40 cm) cultivadas en AM + P.**

Suelo Clarencia contaminado (20-40 cm)													
Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)	Cepa	R	Tamaño colonia (mm)				Crecimiento Real Promedio (mm ²)
		Día 0		Día 15					Día 0		Día 15		
		L	A	L	A				L	A	L	A	
C181	1	0,2	0,2	0,5	0,5	0,10	C191	1	0,1	0,1	0,5	0,1	0,00
	2	0,5	0,3	0,7	0,5			2	0,1	0,1	0,3	0,1	
	3	0,3	0,3	1,1	0,5			3	0,4	0,2	0,6	0,2	
C182	1	0,4	0,3	0,8	0,3	0,01	C192	1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,00
	2	0,7	0,2	0,9	0,3			2	0,2	0,2	0,2	0,2	
	3	0,4	0,3	0,8	0,3			3	0,4	0,1	0,4	0,3	
C183	1	0,4	0,3	1,1	0,4	0,05	C193	1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,01
	2	0,5	0,4	1	0,5			2	0,4	0,3	0,5	0,3	
	3	0,8	0,3	1,1	0,4			3	0,3	0,3	0,5	0,4	
C184	1	0,5	0,2	0,8	0,4	0,02	C194	1	0,5	0,2	1	0,2	0,06
	2	0,4	0,2	0,5	0,2			2	0,5	0,3	1,4	0,4	
	3	0,2	0,2	0,2	0,2			3	0,5	0,3	1,4	0,4	
C185	1	0,4	0,4	0,6	0,4	0,03	C195	1	0,1	0,1	0,8	0,3	0,06
	2	0,4	0,3	1	0,4			2	0,2	0,2	0,4	0,3	
	3	0,6	0,3	0,8	0,4			3	0,1	0,1	0,4	0,2	
C186	1	0,4	0,3	0,4	0,3	0,00	C196	1	0,3	0,2	1,1	0,4	0,12
	2	0,6	0,3	0,6	0,3			2	0,3	0,2	0,8	0,4	
	3	0,7	0,3	0,7	0,3			3	0,3	0,3	0,8	0,5	
C187	1	0,4	0,3	0,6	0,3	0,04	C197	1	0,3	0,3	0,5	0,3	0,01
	2	0,3	0,3	0,7	0,4			2	0,5	0,3	0,6	0,4	
	3	0,3	0,3	1,1	0,4			3	0,5	0,3	0,6	0,4	
C188	1	0,4	0,3	1,4	0,5	0,12	C198	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,00
	2	0,4	0,3	1	0,4			2	0,3	0,3	0,3	0,3	
	3	0,3	0,3	1,3	0,4			3	0,4	0,4	0,4	0,4	
C189	1	0,3	0,3	1,3	0,9	0,38	C199	1	0,4	0,3	0,6	0,3	0,04
	2	0,1	0,1	0,6	0,7			2	0,3	0,3	0,7	0,4	
	3	0,1	0,1	0,7	0,5			3	0,3	0,3	1,1	0,4	
C190	1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,02	C200	1	0,4	0,3	1,4	0,5	0,12
	2	0,1	0,1	0,4	0,3			2	0,4	0,3	1	0,4	
	3	0,2	0,2	0,5	0,2			3	0,3	0,3	1,3	0,4	

ANEXO 15 Rangos de frecuencia en lectura IR para petróleo crudo.

Enlaces simples con Hidrogeno		
Enlace	Lectura Espectro IR/cm.⁻¹	Grupos de interés
C - H	3000 - 2850	Alcanos saturados, grupos aromáticos, compuestos C - H : (TPH)
= C - H	3100 - 3000	Alcanos saturados y grupos aromáticos
≡ C - H	3300	Terminal alquino
O = C - H	2800 & 2700	Dos bandas aldehídos
O - H O - H (libre)	3400 - 3000 - 3600	Alcoholes y Fenoles
N - H	3450 - 3100	Aminas

Enlaces dobles		
Enlace	Lectura Espectro IR/cm.⁻¹	Grupos de interés
C = O	1840 -1800 & 1780 - 1740	Anhídridos
C = O	1815 - 1760	Sin asignar
C = O	1750 - 1715	Esteres
C = O	1740 - 1680	Aldehídos
C = O	1725 - 1665	Quetonas
C = O	1720 - 1670	Ácidos carboxílicos
C = O	1690 - 1630	Amidas
C = C	1675 - 1600	Sin asignar
C = N	1690 - 1630	Sin asignar
N = O	1560 - 1510 & 1370 - 1330	Compuestos nitrogenados

Enlaces triples		
Enlace	Lectura Espectro IR/cm.⁻¹	Grupos de interés
C ≡ C	2260 - 2120	Alquinos
C ≡ N	2260 - 2220	Nitritos

FUENTE: COATES, 2000.

ANEXO 16 Componentes del petróleo crudo y clasificación de los hidrocarburos.

Petróleo crudo	Heteroátomos	Compuestos que contienen moléculas con átomos de carbono e hidrógeno con heteroátomos tales como azufre, nitrógeno, o oxígeno.
	Hidrocarburos	<p><u>Hidrocarburos Saturados (enlaces simple C-C):</u> - <i>Alifáticos</i> : lineales o ramificados, con la fórmula general: C_nH_{2n+2} Nombre común: Alcanos e isoalcanos Nombre Industrial: Parafinas e Isoparafinas - <i>Alicíclicos</i>: compuestos de tipo cíclicos con la formula general: C_nH_{2n} Nombre común: Cicloalcanos Nombre Industrial: Naftalenos o Cicloparafinas</p>
		<p><u>Hidrocarburos Insaturados (Al menos dos átomos de carbono en la molécula unidos por un enlace doble o triple):</u> - <i>Alquenos /Olefinas</i>: estos compuestos pueden ser cadenas lineales, ramificados o compuestos cíclicos. La fórmula general es: C_nH_{2n} - <i>Alquinos /Acetilenos</i>: estos compuestos se presentan en cadenas lineales y estructuras ramificadas. La fórmula general es: C_nH_{2n-2}</p>
		<p><u>Hidrocarburos Aromáticos (La estructura de estos compuestos se basa en la estructura del anillo del Benceno el cual contiene 6 carbonos):</u> - <i>Benceno</i>: este es un anillo aromático simple con la fórmula general: C_nH_n - <i>Alquilbenceno</i>: estos compuestos tienen la base del anillo aromático unido a un radical alquilo. - <i>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs)</i>: estos compuestos están formados por dos o mas anillos aromáticos unidos entre si.</p>
		<p><u>Asfaltenos</u> : Compuestos Sólidos</p>
Metales	Bajas concentraciones de constituyentes metálicos.	

FUENTE: BRISSIO, 2005.