

APROVECHAMIENTO DEL RESIDUO DE LA INDUSTRIA PAPELERA COMO VEHÍCULO DE MICROORGANISMOS EN TAREAS DE BIORREMEDIACIÓN

Anna ILYINÁ, Juan Antonio VILLARREAL-SÁNCHEZ y Jesús RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ

Departamento de Biotecnología y Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila, Blvd. V. Carranza e Ing. J. Cárdenas V., Col. República, Saltillo 25280 Coahuila. Tel. (8)-415-57-52; Fax. (8)-415-95-34; Correo electrónico: anna_ilina@hotmail.com; asesoriaii@yahoo.com

(Recibido noviembre 2000, aceptado enero 2002)

Palabras clave: deshechos celulolíticos, vehículo de microorganismos, inoculación de suelo

RESUMEN

Se demostró que un producto secundario de la industria papelera (BIODAC 12/20) puede ser aplicado como vehículo de microorganismos. Los gránulos BIODAC 12/20 mostraron mucha porosidad (65.19 %) y propiedades de amortiguador de pH tanto en rangos ácidos como alcalinos. Las características mencionadas son de importancia para incorporar a los microorganismos y mantenerlos en estado viable durante la conservación y la propagación en suelo. En este estudio se emplearon seis diferentes géneros microbianos modelo (bacterias y hongos) que fueron aislados a partir de suelos contaminados con hidrocarburos del sur del país. En pruebas con cultivos en medio líquido en presencia de BIODAC se lograron cuentas de UFC/mL de 10 a 1000 veces por encima de los testigos. En los ensayos en placas con agar que contenían gránulos a 10, 50 y 100 % de saturación de la superficie, no se observaron halos de inhibición. Es posible recuperar microorganismos viables después de 42 días de haber sido desecados en BIODAC. El número de microorganismos viables se mantuvo en un nivel bastante considerable, es decir fue mayor que mil millones de UFC/g. Utilizando una cantidad de gránulos (equivalente a 1 % de volumen de suelo) que saturaba la superficie de maceta, se realizaron pruebas para definir el efecto del BIODAC 12/20 sobre el crecimiento de las plantas, demostrándose que el producto no afectaba el tiempo de emergencia ni la producción de biomasa. Inoculando los microorganismos modelo en suelo contaminado artificialmente con 6 % de hidrocarburos, se demostró que después de 40 días en condiciones de intemperie las cuentas microbianas en presencia de BIODAC son hasta 1000 veces mayores que en su ausencia.

Key words: residue of cellulose, vehicle of microorganisms, soil inoculation

ABSTRACT

This research demonstrated the possibility to use a secondary product of paper industry (BIODAC 12/20) as carrier of microorganisms. The BIODAC granules showed high porosity (65.19 %) and buffer properties in acid and basic medium. The mentioned characteristics are important to incorporate the microorganisms and to keep them viable during storage and proliferation on soil. Six different genres of microorganisms (bacteria and fungus) were used as study models, isolated from petroleum hydrocarbon-contaminated soils from Southern Mexico. CFU/mL values 10 to 1000 times above those observed in control samples were obtained in culture tests in liquid with BIODAC. The inhibition of microbial growth was not observed in the assays on petri dishes with agars containing granules that occupied 10, 50 and 100 % of the surface. It is possible to recover live microorganisms after 42 days of storage on desiccating state in

BIODAC. The number of living microorganisms was maintained on a considerable level, above 10^9 (CFU/g). The experiments to define the effects of BIODAC 12/20 on plant growth were carried out using the granule quantity (equivalent to 1 % of soil volume) that saturated the surface of the container. It was demonstrated that the product did not inhibit the emergence time and biomass production. It was observed that after 40 days in the open air, previously inoculated model microorganisms on artificially soil (6 % hydrocarbons), the CFU with BIODAC was up to 100 % times greater than without BIODAC.

INTRODUCCIÓN

La generación y la acumulación de desechos sólidos ha creado la necesidad de buscar diversas soluciones para su manejo, recuperación y disposición (Diario Oficial de la Federación 1993).

Un problema importante se observa en el procesamiento de los residuos sólidos de la industria papelera (Thermo Fibergen Inc. 1999). En los últimos años, con el desarrollo de las tecnologías de reciclaje de papel se ha incrementado sustancialmente la cantidad de los residuos de pulpa en las grandes compañías papeleras. El residuo de pulpa acumulado procede de tratamientos como el despiñado, el filtrado y el blanqueo, entre los que se pierde aproximadamente el 25 % de la fibra de pulpa reciclada, que implica un costo sustancial. Se estima que en los años noventa las compañías papeleras de Estados Unidos tenían pérdidas de 9 mil toneladas de residuos celulóticos con costos de \$ 900 millones de dólares, mientras que el costo de la pulpa residual perdida en todo el mundo se aproxima a los \$2,500 millones de dólares.

La compañía Thermo Fibergen Inc. (Bedford, Massachusetts) ha utilizado últimamente el residuo de la pulpa mediante una tecnología nueva que involucra procesos químicos, reacciones enzimáticas y transformaciones microbianas (Thermo Fibergen Inc. 1999). El desarrollo de nuevas tecnologías que representa la compañía Thermo Fibergen Inc. puede ser considerado como un ejemplo importante en el esfuerzo para el tratamiento de desechos sólidos, además de que demuestra la importancia económica de la recuperación de la materia y de los recursos invertidos. Como producto de esta tecnología surgió la producción de gránulos absorbentes bajo el nombre genérico de BIODAC. De este modo, el BIODAC es un subproducto generado por la industria papelera.

Además, en la actualidad se ha destacado la necesidad de buscar técnicas nuevas y mejorar las actuales para el rescate de áreas y zonas afectadas por múltiples procesos humanos e industriales tanto en México como en el mundo. La biorremediación es una de las opciones más socorridas que actualmente trata de responder a las necesidades cada vez más exigentes de la situación actual de nuestro hábitat, enfocándose a optimizar méto-

dos, medición de parámetros y testigos, así como desarrollar y buscar nuevos acarreadores, géneros y cepas de microorganismos, etc. (Autry y Ellis 1992, Saval 1998).

Los tipos de productos que actualmente se encuentran en el mercado de la biorremediación son muy variados, entre ellos están: concentrados bacterianos líquidos, concentrados bacterianos en polvo con harina de salvado como soporte, concentrados enzimáticos líquidos, concentrados líquidos de nutrientes, fertilizantes en polvo, surfactantes líquidos y mezclas de surfactantes y nutrientes (Saval 1998).

Algunos de los soportes comúnmente utilizados en el manejo de los microorganismos son harina de salvado y materiales inorgánicos porosos (Miller *et al.* 2000). El uso de éstos como vehículo de microorganismos aplicados para tareas de biorremediación está relacionado con su capacidad de adherir fácilmente las suspensiones bacterianas, sin que tengan efectos negativos sobre el crecimiento microbiano y la flora vegetal. Entre otras propiedades que tiene que cumplir un vehículo de microorganismos se puede destacar pH adecuado para el mantenimiento y el crecimiento de los microorganismos biodegradadores así como alta porosidad que no afecte fuertemente el requerimiento microbiano hacia el oxígeno, etcétera.

Este trabajo es una propuesta a la necesidad de la disposición de residuos sólidos (en este caso de la industria papelera) y a la demanda de investigación encaminada a la mejora y búsqueda de opciones y alternativas dentro de las tareas de biorremediación. La compañía Thermo Fibergen Inc. proporcionó las muestras del producto para el desarrollo del presente estudio donde se propuso demostrar la posibilidad de aplicar los gránulos de BIODAC como vehículo para la inoculación de suelos evaluando el efecto de la presencia de éste sobre los crecimientos microbiano y vegetal.

El principal objetivo de este estudio fue mostrar la posibilidad del uso de productos secundarios de la industria papelera como vehículos inoculantes de microorganismos, empleando el producto BIODAC 12/20 como modelo de productos a probar demostrándose que éste cumple con las características necesarias mencionadas anteriormente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se dividió en 4 etapas: 1) ensayos para definir algunas propiedades del producto como material; 2) ensayos para definir su efecto sobre el crecimiento microbiano; 3) ensayos para definir su efecto sobre el crecimiento vegetal y 4) simulacros de aplicación de microorganismos en suelo contaminado.

Determinación de algunas propiedades de BIODAC 12/20

Se realizó la determinación de pH en suspensión de 50 g del producto en 100 mL de agua destilada. Se llevó a cabo la titulación de suspensión de 1 g de BIODAC 12/20 en 20 mL de agua destilada utilizando para esto un total de 1.4 mL de HCl a 0.1 N y NaOH a 0.1 N.

Se determinó la superficie ocupada por una cantidad del preparado de peso conocido. Se llevó a cabo la determinación de la densidad aparente, definida como la cantidad de materia que ocupa 1 cm³ y la densidad real cuantificada por desplazamiento de agua, lo que permitió calcular posteriormente el porcentaje de espacio poroso (Sánchez Moreno 1995). Además se evaluó la capacidad de absorber agua y líquidos aceitosos (aceite vegetal comestible) presentada como la cantidad de líquido que se absorbe por 1 g de gránulos de BIODAC sin presentar exceso. Cabe mencionar que los parámetros como tamaño de partícula, composición química y otros, fueron proporcionados por la compañía Thermo Fibergen Inc.

Se realizó una estimación de la carga microbiana aplicando el método de diluciones seriadas en agua peptonada que se vaciaron en las cajas de Petri con agar nutritivo (Madigan *et al.* 1999).

Estudio del efecto de BIODAC sobre el crecimiento microbiano

Para el aislamiento de microorganismos nativos se emplearon 6 muestras de suelos que fueron facilitadas por la empresa COMIMSA las cuales fueron extraídas de sitios contaminados con hidrocarburos mediante el procedimiento establecido por la EPA (1992).

Utilizando las muestras de suelo y agua peptonada se realizaron diluciones decimales consecutivas hasta llegar a 1×10^{-4} g/mL (Madigan *et al.* 1999). El aislamiento se realizó aplicando agar-agar con 3 % de petróleo como única fuente de carbono. El procedimiento se realizó por triplicado. Dos series de cultivos se incubaron, una a 37 °C y la otra a 25 °C. En la selección de cepas modelo se usó el criterio de recuperación de aquellas que fueran más significativas por su número.

La identificación del género de las bacterias se llevó a cabo aplicando agares selectivos y diferenciales (agar sulfito de bismuto, agar SS, agar McConkey y agar azul de metileno), pruebas bioquímicas (fermentación de glu-

cosa, sacarosa, lactosa, consumo de citrato, producción de indol, ácido sulfhídrico, ureasa y dióxido de carbono, descarboxilación de ornitina y lisina, desaminación de lisina y movilidad).

La identificación de hongos se realizó mediante el uso de la técnica del microcultivo (Madigan *et al.* 1999). Se prepararon las cajas de Petri con un portaobjetos sobre una varilla de vidrio doblado que se esterilizaron previamente. Después un pequeño cuadrado de agar-dextrosa Sabouraud sólido se colocó en el portaobjetos. Con la ayuda de una aguja de asa, el cuadrado de agar se inoculó con una muestra del hongo tapándolo posteriormente con el cubreobjetos. La humedad se mantuvo agregando 3 mL de agua. Finalmente los microcultivos se mantuvieron a temperatura ambiente de 2 a 5 días hasta alcanzar el crecimiento necesario. Después a la caja se agregaron 5 mL de formaldehído por 24 horas. Se realizó una observación e identificación microscópica de los microcultivos según su morfología, retirando el agar y pasando los hongos localizados en cubreobjetos a un nuevo portaobjetos. Al portaobjetos que se mantuvo con agar se le puso un nuevo cubreobjetos. Antes de tapar los portaobjetos se agregó 1 gota de AMAN (azul de algodón y lactofenol).

La determinación del efecto de BIODAC sobre los microorganismos modelo en medio líquido (caldo nutritivo) se efectuó realizando un conteo de UFC/mL (Madigan *et al.* 1999) después de una incubación de 48 h a 37 °C de las muestras problema (en presencia de 2.5 % de BIODAC peso/volumen) y testigo (preparaciones iguales pero que carecen del producto de interés) aplicando la técnica de diluciones seriadas vaciadas en los agares correspondientes (agar nutritivo para bacterias y mezcla de microorganismos modelo, agar-dextrosa Sabouraud para hongos). En el ensayo se utilizaron tubos de 50 mL con 25 mL de medio de cultivo (con y sin BIODAC) que se esterilizaron previamente con calor húmedo a 121 °C por 15 minutos y a 15 libras de presión. Posteriormente a estos tubos se les agregó 1 mL de la suspensión de cada una de las cepas aisladas o la mezcla de éstas (en proporciones iguales). La suspensión se preparó diluyendo diez veces los cultivos modelo que por su turbiedad correspondían al tubo tres del nefelómetro de McFarland (Diario Oficial de Federación 1995). El ensayo se realizó con cinco repeticiones.

Los gránulos separados de las muestras problema en los frascos estériles con tapones de gasa se desecaron a 39 ± 1 °C por un periodo de 24 horas en un termostato al cual se conectó una bomba de vacío. Una vez secos los gránulos, se procedió al conteo de los microorganismos viables (UFC/g). Posteriormente los frascos con gránulos se conservaron a temperatura ambiente durante 42 días en condiciones de laboratorio. Al transcurrir este tiempo se procedió nuevamente al conteo de cada uno de los microorganismos así como de la mezcla de éstos

utilizando la técnica de diluciones seriadas vaciadas en los agarres adecuados correspondientes.

La determinación del efecto de BIODAC sobre los microorganismos modelo en fase sólida se realizó con cada uno de los microorganismos modelo y con la mezcla de éstos basándose en las observaciones de la presencia o ausencia de halos de inhibición (Madigan *et al.* 1999). En este ensayo se utilizaron diferentes cantidades de BIODAC correspondientes a diferente grado de saturación de superficie de caja con el producto de interés: 0.5, 2.5 y 5 g de BIODAC por cada caja de Petri, correspondiente a 10, 50 y 100 % de saturación de superficie. Las cajas con BIODAC se sometieron a esterilización previa bajo las condiciones arriba mencionadas. A las cajas se les agregaron 15 mL de agar correspondiente al tipo de cultivo y posteriormente 1 mL de suspensión de las células preparada de la manera anteriormente descrita distribuyéndola sobre toda la superficie del agar. Todos los cultivos en fase sólida se incubaron a 37 °C por 24 h en el caso de las bacterias y 96 h en el caso de los hongos y de la mezcla microbiana. Transcurrido este tiempo se realizaron las observaciones para definir la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de las partículas de BIODAC (que en este caso funcionan de manera similar a los sensidiscos de la prueba de Kirby-Bauer). En el testigo se realizó un procedimiento igual pero en ausencia de BIODAC. El ensayo efectuado no es cuantitativo ya que se trata de un compuesto sólido insoluble pero permite evaluar la posibilidad de inhibición de crecimiento microbiano en presencia del producto en cuestión.

Estudio del efecto de BIODAC sobre el desarrollo vegetal en distintos tipos de suelos

Estos ensayos se realizaron utilizando tres distintos tipos de suelo (ácido, básico y neutro, proporcionados por el Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro) por separado en macetas de plástico de 9 cm de diámetro con 85 cm³ de suelo colocando en éstas 2.5 g de semillas del frijol ó 5 g de semillas para el caso del alpiste en presencia de una monocapa de BIODAC (5 g) en las muestras problema y en ausencia de éste en las muestras testigo.

Las muestras problema y testigo se conservaron en condiciones ambientales (humedad, temperatura de 25 °C, presión barométrica, etc.), manteniéndose bajo techo y exponiéndose 3 h diarias al sol. El riego se realizó suministrando 30 mL de agua al inicio del experimento y posteriormente 30 mL cada 48 h en cada uno de los recipientes. Se tomó el tiempo necesario para la emergencia de la planta. Después de 11 días desde el inicio del experimento se midió la altura máxima, es decir, de la(s) planta(s) que alcanzaron un mayor crecimiento, reportándola en cm. Además, se determinó la cantidad de biomasa fresca cortando el cuerpo vegetal justo por en-

cima del nivel del suelo y pesando la cantidad de biomasa recuperada en cada caso y reportándola en gramos.

Evaluación del crecimiento microbiano en el suelo contaminado con hidrocarburos usando la mezcla de microorganismos modelo en presencia y ausencia de BIODAC

Matraces de 500 mL que contenían 12 g de BIODAC y 108 mL de caldo nutritivo (previamente esterilizados en el mismo matraz) y matraces con 120 mL de caldo sin presencia de BIODAC, se inocularon con 4 mL de suspensión de la mezcla microbiana obtenida de la manera descrita anteriormente. La incubación se llevó a cabo en agitación constante a 120 rpm por 96 h a temperatura ambiente. Después de separar y desecar la muestra con BIODAC se obtuvieron los siguientes preparados microbianos: 1) BIODAC más microorganismos y 2) suspensión de mezcla de microorganismos. Se realizó la evaluación de la carga microbiana presente en cada inóculo obtenido.

La inoculación de suelo contaminado con petróleo diáfano (equivalente a un 6 % volumen/masa) se llevó a cabo igualando los números de UFC totales inoculadas (a 1.44E+11 UFC por 1.8 kg de suelo) en tres muestras problema (con BIODAC 22 g resuspendidos en 60 mL de agua en 1.8 kg de suelo) y en tres muestras testigo positivo (60 mL de suspensión celular sin BIODAC). Como testigo negativo se emplearon tres muestras sin inoculación (para evaluar el crecimiento de microorganismos nativos) aplicándole 60 mL de agua. Los tratamientos aplicados se revolvieron con suelo de la manera más homogénea posible.

Al experimento se le dieron condiciones ambientales dejándose las muestras a la intemperie por 50 días y realizando la determinación de UFC/g de suelo cada décimo día.

Para determinar si existen diferencias significativas entre las medias, se aplicó el análisis de varianza según el procedimiento recomendado por Duncan (1955).

RESULTADOS

Determinación de algunas propiedades de BIODAC 12/20

En busca de nuevas opciones de manejo de microorganismos en tareas de biorremediación y a raíz de un examen preliminar de algunas características de un producto secundario de la industria papelería (BIODAC 12/20) presentadas en la **Tabla I**, se planteó el posible uso de este producto como vehículo inoculante. Los gránulos de malla 12 a 20 del producto BIODAC 12/20 con contenido de humedad de 4 a 5 % son de color gris y más densos que el agua (Thermo Fibergen Inc. 1999). Basándose en los datos de la **Tabla I** se puede

TABLA I. ALGUNAS PROPIEDADES DE BIODAC COMO MATERIAL

Densidad real	1.93 g/cm ³
Densidad aparente	0.63 g/cm ³
Espacio poroso	65.19 %
pH (en solución)	7.8
Relación área/peso	0.082 g/cm ²
Capacidad de absorción de aceite	1.00 mL de aceite/g de BIODAC
Capacidad de absorción de agua	1.15 mL de agua/g de BIODAC

calcular que un gramo del preparado ocupa un volumen de 1.6 cm³ y una área de 12.2 cm². El producto demostró la capacidad de absorber el agua y líquidos aceitosos. Así, 1 g de los gránulos absorbe 1.15 mL del agua ó 1 mL de aceite comestible. Esto se debe a la presencia de celulosa cuyo contenido en BIODAC se encuentra dentro de un rango de 47 a 53 % (Thermo Fibergen Inc. 1999). Se reporta que de 28 a 34 % del material en cuestión corresponde a caolin y de 14 a 20 % a carbonato de calcio (Thermo Fibergen Inc. 1999).

La suspensión de los gránulos de BIODAC en agua tiene un pH ligeramente básico (Tabla I). Además, se observó que la suspensión de 1 g de preparado en 20 mL de agua demuestra capacidad de mantener el pH a 7.07 después de su titulación con 1.4 mL de solución de HCl a 0.1 N y que mantiene el pH a 8.46 después de adicionarle la misma cantidad de NaOH a 0.1N. Se conoce que ambos procedimientos provocan un drástico cambio de pH en la muestra de agua.

El valor de pH determinado en suspensión de BIODAC, la capacidad de mantenerlo a nivel casi neutro durante la acidificación y la porosidad elevada del producto de interés, pueden ser útiles como vehículo acarreador de las células microbianas.

BIODAC tiene gran cantidad de microorganismos nativos (>250,000 UFC/g), lo que condujo a la necesidad de dar un tratamiento previo de esterilización térmica a los gránulos, antes de emplearlos como vehículo de inoculación microbiana.

Estudio del efecto de BIODAC sobre el crecimiento microbiano

En los ensayos con microorganismos se utilizaron las cepas *Serratia sp.*, *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Mucor sp.* y *Enterobacter sp.* seleccionadas de una gran variedad de microorganismos aislados a partir de seis muestras de suelos contaminados con hidrocarburos por estar representadas por mayor número de UFC. Las cepas mencionadas y la mezcla de éstas se emplearon como modelo para el estudio del efecto de BIODAC sobre el crecimiento microbiano en medios líquido, sólido y en un simulacro de aplicación en suelo contaminado con hidrocarburos.

En la Tabla II se muestran las cuentas de UFC/mL

determinadas en los ensayos en medio líquido en presencia (problema) y ausencia (testigo) del preparado, propagando los microorganismos durante 48 h.

TABLA II. COMPARACIÓN DE LAS CUENTAS DE UFC/mL (± DE) EN MEDIO LÍQUIDO DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN DE CULTIVOS POR 48 h EN PRESENCIA (PROBLEMA) Y AUSENCIA (TESTIGO) DE BIODAC (n=5)

Microorganismos	Problema	Testigo
<i>Enterobacter sp.</i>	8.50 ± 1.68 x 10 ¹³	2.11 ± 0.42 x 10 ¹¹
<i>Serratia sp.</i>	2.33 ± 0.46 x 10 ¹³	9.70 ± 1.94 x 10 ¹⁰
<i>Bacillus sp.</i>	8.20 ± 1.63 x 10 ¹³	7.43 ± 1.45 x 10 ¹²
<i>Streptococcus sp.</i>	1.22 ± 0.23 x 10 ¹⁴	8.60 ± 1.72 x 10 ¹³
<i>Mucor sp.</i>	> 1 x 10 ¹¹	> 1 x 10 ¹¹
<i>Aspergillus sp.</i>	> 1 x 10 ¹²	> 1 x 10 ¹¹
Mezcla de los microorganismos	1.87 ± 0.35 x 10 ¹⁴	2.31 ± 0.46 x 10 ¹²

Como se puede apreciar (Tabla II), en presencia de BIODAC las cuentas realizadas con los cultivos bacterianos (*Serratia sp.*, *Bacillus sp.*, *Streptococcus sp.* y *Enterobacter sp.*) y con la mezcla de diferentes microorganismos son mayores que en su ausencia. Para las especies de hongos (*Aspergillus sp.* y *Mucor sp.*) el método microbiológico de conteo de UFC/mL estima la cantidad total de microorganismos y sus esporas. En este caso el resultado se basa en la consideración del rango probable de la UFC/mL. Los resultados de la Tabla II indican que en el cultivo de *Aspergillus sp.*, el rango de UFC/mL en presencia de BIODAC fue mayor que en ausencia del producto en cuestión, mientras que en el caso de *Mucor sp.* no se observó diferencia significativa.

Se realizaron ensayos en los que se probó el crecimiento microbiano en presencia del preparado en medio sólido, saturando la superficie de la caja a 10, 50 y 100 %. En presencia de todas concentraciones del producto en cuestión, se confirmó el hecho de que BIODAC 12/20 no tiene repercusiones negativas sobre la proliferación microbiana. Las colonias de microorganismos modelo crecieron tanto en agar adecuado como en agar con gránulos sin mostrar halos de inhibición. En la Tabla III se resume lo observado en los cultivos de medio sólido. Se destaca que los cultivos de hongos y de *Serratia sp.* mostraron incrementos en la densidad de colonias en las zonas con BIODAC lo que puede ser considerado como estimulación del crecimiento.

Utilizando preparados con BIODAC con cada una de las cepas y la mezcla de éstas se demostró la posibilidad de recuperar microorganismos viables después de 42 días de haber sido desecados en BIODAC. Los resultados se presentan en la Tabla IV. Se puede apreciar que el porcentaje de recuperación variaba para diferen-

TABLA III. DESCRIPCIÓN DE LA RESPUESTA PRESENTADA POR LOS MICROORGANISMOS MODELO EN MEDIO SÓLIDO EN PRESENCIA DE BIODAC 12/20 APLICADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES CORRESPONDIENTES A DISTINTAS SATURACIONES DE LA SUPERFICIE

Microorganismo	Observaciones
<i>Enterobacter sp.</i>	- No mostró halo de inhibición
<i>Aspergillus sp.</i>	- No mostró halo de inhibición
	- Mostró incremento en la densidad de colonias en las zonas con BIODAC
<i>Bacillus sp.</i>	- No mostró halo de inhibición
<i>Streptococcus sp.</i>	- No mostró halo de inhibición
<i>Mucor sp.</i>	- No mostró halo de inhibición
	- Mostró incremento en la densidad de colonias en las zonas con BIODAC
<i>Serratia sp.</i>	- No mostró halo de inhibición
	- Mostró incremento en la densidad de colonias en las zonas con BIODAC
Mezcla de los microorganismos	- No mostró halo de inhibición

tes microorganismos modelo desde 7 a 36 %. Sin embargo, el número de microorganismos viables se mantuvo en un nivel bastante considerable, es decir fue mayor a mil millones ($>10^9$) de UFC/g.

TABLA IV. COMPARACIÓN DE LAS CUENTAS DE UFC/g DE BIODAC DESPUÉS DE LA DESECACIÓN Y DESPUÉS DE 42 DÍAS DE SU ALMACENAMIENTO A TEMPERATURA AMBIENTE (n=5)

Microorganismos	UFC/g $\pm$ DE después de desecación	UFC/g $\pm$ DE después de almacenamiento
<i>Enterobacter sp.</i>	$6.85 \pm 1.36 \times 10^{10}$	$8.05 \pm 1.61 \times 10^9$
<i>Serratia sp.</i>	$7.45 \pm 0.78 \times 10^{10}$	$6.54 \pm 1.28 \times 10^9$
<i>Bacillus sp.</i>	$2.29 \pm 0.33 \times 10^{10}$	$8.35 \pm 1.53 \times 10^9$
<i>Streptococcus sp.</i>	$8.30 \pm 1.53 \times 10^{11}$	$5.76 \pm 1.13 \times 10^{10}$
<i>Mucor sp.</i>	$> 1 \times 10^{10}$	$> 1 \times 10^9$
<i>Aspergillus sp.</i>	$> 1 \times 10^{11}$	$> 1 \times 10^{10}$
Mezcla de los microorganismos	$8.50 \pm 0.5 \times 10^{10}$	$6.54 \pm 1.25 \times 10^9$

Estudio del efecto de BIODAC sobre el desarrollo vegetal en distintos tipos de suelos

El soporte que se aplica en el tratamiento de suelo no debe alterar el crecimiento vegetal. En el presente trabajo mediante ensayos agrícolas a microescala usando suelos ácido, neutro y básico, se logró demostrar que el empleo de BIODAC en la cantidad que satura la superficie de la maceta, no inhibe el crecimiento de las plantas (frijol y alpiste), siendo evaluados los parámetros: tiempo de emergencia, altura máxima y cantidad de biomasa des-

pués de 11 días de crecimiento. En el presente estudio la concentración del soporte fue alrededor de 1 % (volumen/volumen).

En la **Tabla V** se presentan los tiempos de emergencia, en la **Tabla VI** las alturas y en la **Tabla VII** el peso de biomasa fresca determinadas en el experimento. Los resultados representan los promedios en cada caso, *s* es la desviación estándar de las 4 repeticiones efectuadas. Los resultados no demuestran la presencia de inhibición estadísticamente comprobada.

TABLA V. TIEMPO DE EMERGENCIA (EN HORAS) DE SEMILLAS DE LAS PLANTAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE BIODAC SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETAL

Suelo ácido	Tipo de muestras			
	Problema	<i>s</i> (n=4)	Testigo	<i>s</i> (n=4)
Frijol	84	17	132	17
Alpiste	84	17	108	17
Suelo básico	Problema	<i>s</i> (n=4)	Testigo	<i>s</i> (n=4)
Frijol	48	6	60	17
Alpiste	132	17	120	8
Suelo neutro	Problema	<i>s</i> (n=4)	Testigo	<i>s</i> (n=4)
Frijol	109	86	96	68
Alpiste	96	8	146	37

Evaluación del crecimiento microbiano en el suelo contaminado con hidrocarburos usando el consorcio de microorganismos en presencia y ausencia de BIODAC

Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla VIII**. Como se menciona anteriormente, para cada 1.8 kg de suelo se utilizaron 1.44×10^{11} UFC de cada inóculo que significa 8×10^7 UFC/g de suelo. La concentración de los microorganismos aplicados fue considerablemente menor que la de los nativos presentes en el suelo por lo que en la **Tabla VIII** no se aprecia la diferencia en cuentas realizadas en las tres muestras después de 10 días del ensayo. Después de 20 y 30 días de mantener las muestras a la intemperie se observó que las cuentas de UFC/g en las muestras problema (el suelo inoculado mediante el uso de BIODAC) se mantuvieron comparables con las cuentas de las muestras del testigo positivo (con la aplicación de la suspensión), observándose después de cuarenta días el incremento muy considerable de UFC/g en las muestras problema y posteriormente la disminución de la carga microbiana hasta niveles similares a los determinados en muestras testigo positivo. Después de 20 días de experimento la cuenta de microorganismos en muestras testigo negativo se mantuvo por debajo de

TABLA VI. ALTURAS MÁXIMAS (EN CENTÍMETROS) DE LAS PLANTAS EMPLEADAS EN EL ESTUDIO DEL EFECTO DE BIODAC SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETAL

Suelo Ácido		Tipo de muestras			
	Problema	s (n=4)	Testigo	s (n=4)	
Frijol	22.2	0.2	16.9	3.5	
Alpiste	16.6	2.0	11.8	0.4	
Suelo Básico					
	Problema	s (n=4)	Testigo	s (n=4)	
Frijol	19.2	4.5	24.0	0.6	
Alpiste	15.9	2.8	15.3	1.8	
Suelo Neutro					
	Problema	s (n=4)	Testigo	s (n=4)	
Frijol	25.3	2.5	19.3	1.3	
Alpiste	19.3	2.8	20.2	5.4	

las obtenidas en muestras inoculadas mostrando, sin embargo, las mismas tendencias en comportamiento en función de tiempo de ensayo.

DISCUSIÓN

La biorremediación es un proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para un aumento de la velocidad o la extensión de la destrucción de contaminantes (Autry y Ellis 1992, Liu y Suflita 1993). La efectividad de la biorremediación muchas veces está en función de la extensión con que la población microbiana o su consorcio puede enriquecerse y mantenerse en el medio. Cuando los microorganismos degradadores no están presentes en el área contaminada o cuando prácticamente no hay suficiente tiempo para el enriquecimiento natural de la población útil, la inoculación puede ser la opción apropiada. La inoculación algunas veces permite disminuir el periodo de aclimatación anterior al comienzo de la biodegradación.

En el presente trabajo se propuso que la efectividad

de la inoculación puede ser incrementada mediante el uso de gránulos de BIODAC 12/20 como acarreadores de microorganismos. El hecho de que BIODAC contuvo números elevados de microorganismos ($> 250,000$ UFC/g), que fue determinado previamente, se consideró como una señal de que este soporte no es tóxico para ciertos tipos de microorganismos. Posteriormente, utilizando los microorganismos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos, se demostró también que el producto no inhibe y en algunos casos promueve el crecimiento microbiano en cultivos en medio líquido y en cultivos de medio sólido (**Tablas II y III**) lo que comprobó la hipótesis inicial. La característica principal de los microorganismos modelo es su capacidad de crecer en presencia de hidrocarburos como fuente única de carbono, lo que se utilizó para su asilamiento en agar-petróleo. La estimación de la capacidad metabólica de las cepas aisladas no se consideraba dentro de los objetivos del trabajo enfocado principalmente a la evaluación de la posibilidad de aplicar el producto en cuestión como vehículo de microorganismos en tareas relacionadas con la inoculación de suelos.

Se demostró que después de la desecación el producto permite conservar un número considerable de microorganismos, lo que se observó al recuperar los viables después de tiempos mayores a 1 mes de conservación (**Tabla IV**). Es conocido que en condiciones en que la actividad de agua es baja, la viabilidad de los microorganismos es afectada. Los microorganismos formadores de endosporas (por ejemplo, de género *Bacillus sp.*) y los hongos son más resistentes a ambientes de este tipo. Los resultados obtenidos indicaron que el uso de BIODAC también permitió la conservación de microorganismos que no poseen estas propiedades.

Al definir algunas características de BIODAC 12/20, se observó la capacidad de absorber agua y líquidos aceitosos, su porosidad elevada (**Tabla I**) y las propiedades de amortiguador de pH tanto en rangos ácidos como alcalinos. Las características mencionadas son de importancia para incorporar los microorganismos y tener la posibilidad de mantenerlos en estado viable en condiciones de conservación y durante su propagación en suelo.

TABLA VIII. CUENTAS DE UFC/g EN EL ENSAYO DE INOCULACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS EN PRESENCIA DE BIODAC (PROBLEMA), SUSPENSIÓN DE MICROORGANISMOS (TESTIGO POSITIVO) Y SIN INOCULACIÓN (TESTIGO NEGATIVO). SE PRESENTAN LOS PROMEDIOS DE TRES REPETICIONES $\pm$ DE

Muestra (n=3)	10 días	20 días	30 días	40 días	50 días
Testigo negativo	2.23 $\pm$ 0.43E+10	2.64 $\pm$ 0.52E+10	3.79 $\pm$ 0.76E+10	1.03 $\pm$ 0.20E+11	6.10 $\pm$ 1.22E+10
Testigo positivo	2.43 $\pm$ 0.44E+10	5.89 $\pm$ 1.12E+10	2.99 $\pm$ 0.56E+12	1.52 $\pm$ 0.30E+10	2.18 $\pm$ 0.42E+11
Problema	2.24 $\pm$ 0.40E+10	4.48 $\pm$ 0.88E+10	1.92 $\pm$ 0.37E+12	1.70 $\pm$ 0.34E+13	2.85 $\pm$ 0.47E+11

La mayor parte éstas se deben a la presencia de celulosa y carbonato de calcio (componentes principales del producto en cuestión).

Además, en el presente trabajo se obtuvieron evidencias de que el empleo controlado del preparado (que en este caso fue aplicado a una concentración de 1 % en suelos ácido, neutro y básico) no inhibe el crecimiento de las plantas (**Tablas V a VII**), demostrándose de este modo que su uso no presenta ningún inconveniente para su introducción al suelo ya que no altera el crecimiento vegetal. La cantidad de BIODAC aplicada saturaba la superficie del suelo y fue escogida con base en el conocimiento de las técnicas de biorremediación (Autry y Ellis 1992, Liu y Suflita 1993) donde se lleva a cabo, como regla, previa activación del preparado microbiano que excluye la necesidad de utilizar concentraciones elevadas de soporte.

Los resultados mostrados en la **Tabla VIII** destacan que al inocular los microorganismos modelo en el suelo contaminado artificialmente con hidrocarburos, durante los primeros 30 días no se observó diferencia significativa en la proliferación de los microorganismos de la muestra problema y de la muestra testigo positivo. Sin embargo, después de 40 días de ensayo se observó un incremento muy considerable de UFC en la muestra problema (el suelo en que la inoculación se realizó mediante el uso de BIODAC) en comparación con las cuentas de la muestra testigo positivo (con la aplicación del consorcio en suspensión). El efecto fue comprobado estadísticamente realizando el ensayo por triplicado, así como mediante las observaciones de las cuentas en todas las diluciones seriadas que se realizaron para estimación de UFC/g. Cabe remarcar que dicho ensayo se realizó en condiciones de intemperie y el suelo utilizado en el experimento no fue especialmente acondicionado mediante la agregación de fuentes de nitrógeno, fósforo y microelementos, indispensables para la propagación intensa y prolongada de los microorganismos (que se lleva a cabo normalmente en la práctica de biorremediación). Esto puede ser la causa por la cual después de transcurrir los 50 días del experimento en todas las muestras (testigo positivo, problema y testigo negativo que no fue inoculado) se detectó un decremento en la población microbiana. Durante todo el ensayo los microorganismos nativos (muestra testigo negativo) no mostraron un crecimiento avanzado en presencia de hidrocarburos (**Tabla VIII**), mientras que los microorganismos inoculados se propagaron en este hábitat gracias a su capacidad metabólica para aprovechar los recursos que éste les proporcionó. Se conoce que son muchos los factores que pueden ser considerados como importantes para un proceso de inoculación exitoso. Entre estos se encuentran los factores tales como pH, temperatura, potencial redox, disponibilidad de nutrientes y actividad de agua (Álvarez y Vogel 1991a, Álvarez y Vogel 1991b, Olguín 1996). Es probable que las ventajas que proporcionó el BIODAC 12/20 para el

crecimiento microbiano se deban a su influencia sobre algún factor de los antes mencionados.

Así, los resultados arrojados en el presente trabajo demuestran todas las ventajas que proporciona la aplicación de BIODAC 12/20 (producto secundario de la industria papelera) como vehículo inoculante de microorganismos que puede ser de gran utilidad para la realización de tareas que implican almacenamiento, transporte y aplicación de flora microbiana.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece los apoyos brindados por la Corporación Mexicana de Investigación en Materiales S.A. de C.V. y por el Departamento de Suelos de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro para la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- Álvarez P.J.J. y Vogel T.M. (1991a). Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure culture and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 2981-2985.
- Álvarez P.J.J. y Vogel T.M. (1991b). Kinetics of biodegradation of benzene and toluene in sandy aquifer material. *Biodegradation* 2, 43-51.
- Autry A.R. y Ellis G.M. (1992). Bioremediation: an effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environ. Progress.* 11, 318-323.
- Diario Oficial de la Federación (1993). NOM-CCA-033/1993. Octubre 18, México, D.F.
- Diario Oficial de Federación. (1995). NOM-127-SSA1-1994. Noviembre 30, México, D.F.
- Duncan D.B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11, 1-42.
- EPA US (1992). Preparation of soil sampling protocols: sampling techniques and strategies. EPA/600/R-92/128. EPA, Washington D.C.
- Liu S. y Suflita J. M. (1993). Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Bioremediation* 11, 8-10.
- Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. (1999). *Brock: Biología de los microorganismos*. Prentice Hall, Iberia, Madrid, 986 p.
- Miller J.G., Bates R.H., Boyer T.A. y Durham D.R. (2000). Porous, non-macroporous, inorganic oxide carrier body for immobilizing microorganisms for bioremediation. United States Patent 6, 107-067.
- Olguín E.J. (1996). Opportunities for environmental biotechnology within the current context of the Mexican agroindustry. En: *Fronteras en biotecnología y bioingeniería* (E. Galindo, Ed.) México: SMBB, pp. 309-317.
- Sánchez Moreno J.J. (1995). *Técnicas fisicoquímicas I. Ma-*

nual de prácticas. Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, 73 p.

Saval S. (1998). Situación actual y perspectivas de la

biorremediación de suelos y acuíferos en México. *Biotechnología* 3, 71-76.

Thermo Fibergen Inc. (1999). <http://www.tfibergwn.com/biodac>