

Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina

A.J. Acuña¹, O.H. Pucci¹, G.N. Pucci¹

(1) Centro de Estudios e Investigación en Microbiología Aplicada. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Ciudad Universitaria. Comodoro Rivadavia. Chubut. Argentina.

➤ Recibido el 5 de octubre de 2007, revisado el 13 de noviembre, aceptado el 8 de enero de 2008.

Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de la Patagonia Argentina. La zona central de la Patagonia, Argentina, se encuentra sometida a explotación petrolera y sus suelos se caracterizan por ser deficientes en nitrógeno. Esto causaría un efecto negativo en los procesos de atenuación natural que se desarrollan en los suelos contaminados con hidrocarburos. El objeto de este estudio fue determinar cual es el efecto de la deficiencia de nitrógeno sobre la biodegradación de los hidrocarburos en un suelo de la Patagonia, Argentina. Se trabajó con tres microcosmos a los que se les realizó tratamientos diferentes. En uno se monitoreo la atenuación natural del sistema, en otro la fertilización con nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), y en el último la fertilización con P y K. Durante el seguimiento se determinaron mineralización y medición de hidrocarburos, y se realizaron recuentos bacterianos y determinación de nitrato, nitrito y amonio. Los resultados indican que es posible la biodegradación de hidrocarburos en el suelo deficiente de nitrógeno de la Patagonia estudiado en tiempos mas prolongados que en aquellos que se realiza una fertilización con nitrógeno. El nitrógeno necesario para el proceso sería obtenido por los microorganismos del suelo por fijación biológica.

Palabras Claves: remediación, bioestimulación, suelo, contaminación.

Characterization of a hydrocarbons biorremediation process in nitrogen deficit in a soil from Patagonia Argentina. Patagonia Argentina is subject to intense oil exploitation and the soils of this region are characterized by low nitrogen content. This would cause a negative effect in the natural attenuation processes occurring in soils polluted with hydrocarbons. The main objective of this study was to determine the effect of nitrogen deficiency on hydrocarbon bioremediation in contaminated soils in Patagonia, Argentina. We worked with three different microcosms receiving three different treatments. In one of them the natural attenuation of the system was monitored; the second one was subjected to fertilization with N, P and K; and the last one was subjected to fertilization with P and K. The follow-up was carried out by monitoring mineralization and hydrocarbon content, carrying out bacterial recounts and determining nutrient content. Hydrocarbon biodegradation is possible in the N-poor soils of Patagonia but the time taken is longer than in fertilized soils. Nitrogen supply could be provided by N-fixing microorganisms.

Key words: remediation, bioestimulation, soil, contamination.

Introducción

La Patagonia, Argentina, posee grandes regiones despobladas que se han ido ocupando con instalaciones de la industria petrolera. Esto lleva a que hay grandes zonas con potencial riesgo de contaminación y en muchos casos no serían tratados por la extensión, dificultad de acceso, etc. Diferentes son las tecnologías aplicables para recuperar suelos contaminados con hidrocarburos. Los métodos biológicos demostraron ser eficientes y adecuados (Johnsena *et al.*, 2005; Maila y Cloete, 2004) debido a que causan menor impacto en el sitio del problema. Las técnicas clásicas de biorremediación, término que define al proceso mediante el cual los microorganismos presentes en un sitio producen la eliminación de un contaminante, son bioaumento y bioestimulación, ambas con la posibilidad de ser aplicadas *in situ* o *ex situ*. Llamamos bioaumento a la incorporación de microorganismos especializados al sitio contaminado con el fin de mejorar el rendimiento del proceso de

biorremediación. La bioestimulación consiste en estimular a los microorganismos de un ambiente natural por medio del agregado de nutrientes, para así mejorar la eliminación de los contaminantes. Es común la incorporación de nitrógeno, fósforo, potasio y humedad en el suelo contaminado para adecuar la relación carbono:nitrógeno:fósforo (C:N:P) del mismo (Atlas, 1995).

El nitrógeno es un elemento fundamental en el metabolismo de los microorganismos debido a que es incorporado en las células bacterianas con el fin de producir aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos (Ferguson, 1998; Richardson y Watmough, 1999). Los suelos ricos en este nutriente tienen una marcada actividad metabólica y la capacidad de desarrollar biomasa (Bento *et al.*, 2005).

Los suelos de la Patagonia se caracterizan por ser deficientes de nitrógeno, lo que dificulta la biorremediación de los hidrocarburos derramados sin una adecuada bioestimulación. Sin embargo, hay autores que proponen que en deficiencia de nitrógeno es posible realizar este proceso con un rendimiento menor (Piehler *et al.*, 1999). En la bibliografía se encuentran citados diferentes géneros bacterianos como *Pseudomonas* (Eckford *et al.*, 2002) y *Agrobacterium* (Prantera *et al.*, 2002) con capacidad de utilizar los hidrocarburos en ambientes deficientes de nitrógeno. Este tipo de microorganismos es de mucha importancia en suelos deficientes de nitrógeno ya que tendrían un papel fundamental en los procesos de atenuación natural.

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia que tiene la deficiencia de nitrógeno en la mineralización, eliminación de los hidrocarburos y microorganismos fijadores de nitrógeno con capacidad de utilizar los derivados del petróleo como fuente de carbono y energía durante un proceso de biorremediación de hidrocarburos en un suelo de la Patagonia Argentina.

Materiales y métodos

Se estudió una muestra de suelo Patagónico proveniente de un *landfarming* que se tomó a una profundidad comprendida entre 10 y 30 cm. El hecho de que la muestra sea de un sistema de biorremediación, como lo es el *landfarming*, nos proporciona una alta probabilidad de encontrar elevada actividad metabólica frente a los hidrocarburos. La muestra se tomó a la profundidad indicada debido a que en ésta se encuentra la mayor actividad microbiológica (Atlas y Bartha, 2002).

Caracterización inicial de la muestra

Las determinaciones de nitrato, nitrito, amonio, urea, fosfato y pH fueron realizadas con un extracto que se obtuvo a partir de 40 g de muestra suspendida en 100 mL de agua destilada que fue homogeneizada a 180 r.p.m. durante 30 minutos, luego fue centrifugada a 3500 r.p.m. según técnicas publicadas en trabajos anteriores (Pucci, 2003, Peressutti, 2003). La determinación de pH fue realizada potenciométricamente con electrodo de vidrio, y el contenido de agua fue medido gravimétricamente mediante desecación a 105°C. La capacidad de retención de agua fue determinada según lo propuesto por García Trejo en 1981. El contenido de amonio y urea se determinó con azul de indofenol y el fosfato con azul de molibdeno. El nitrito se determinó colorimétricamente con ácido sulfanílico y 1-naftilamina y el nitrato con brucina en presencia de ácido sulfúrico. El nitrógeno total (Nt) fue determinado por el método de Kjeldahl (Bremmer y Sulvaney, 1982).

El contenido de hidrocarburos totales (HT) se determinó sobre 50 g de suelo mediante extracción con Soxhlet durante 24 h con tricloroetano como solvente de extracción. Los hidrocarburos extraídos fueron cuantificados gravimétricamente (Pucci 2003). Las fracciones alifática, aromática y polar de los HT obtenidos fueron separadas por cromatografía en columna de silicagel a partir de 0,3 g de residuo. Como solventes de elución se utilizaron 250 mL de hexano, 150 mL de benceno y 150 mL de cloroformo-metanol 1:1 para los hidrocarburos alifáticos, aromáticos y polares, respectivamente. Las fracciones obtenidas se cuantificaron gravimétricamente (Pucci 2003).

La caracterización microbiológica se realizó por recuento en placa. Para bacterias heterótrofas se utilizó el medio R2A (Reasoner y Geldicich, 1985), y para las fijadoras de nitrógeno (BFN) el medio DM (Acuña y Pucci, 2005). Para bacterias que utilizan hidrocarburos como fuente de carbono y energía (BDH) se utilizó un medio mineral, MM-PGO, con 0,1 % de petróleo y gasoil 1:1 (Acuña y Pucci, 2005) y para las BDH fijadoras de nitrógeno se preparó un medio mineral sin nitrógeno, MM2-PGO, con 0,1% de petróleo y gasoil 1:1 (Acuña y Pucci, 2005). Los recuentos bacterianos se incubaron 15 días a 28°C.

Ensayos en microcosmos

Se diseñaron tres microcosmos por triplicado en botellas de vidrio de un litro con 100 g de suelo. A dos se les incorporó agua destilada estéril en una cantidad igual al 50% de la CRA y 0,06 g de K_2HPO_3 , uno de estos fue fertilizado con 0,5 g de $(NH_4)_2SO_4$. El tercer microcosmo se dejó sólo con el suelo, para estudiar la atenuación natural en la muestra. Los tres tratamientos aplicados fueron fertilización con N, P y K (BCN), fertilización con P y K (BSN) y atenuación natural (AN). Esto permite evaluar el efecto que produce la falta de nitrógeno, comparando los microcosmos BCN y BSN, en el proceso de biorremediación, y comparar el mismo con el proceso de atenuación natural. Las relaciones C:N:P expresadas en $mg\ kg^{-1}$ de

suelo fueron de 100:0,003:0,003 para AN, 100:0,003:0,02 para BSN y 100:2:0,02 para BCN. Todos los microcosmos se incubaron 111 días a 28°C. El día 33 del ensayo se realizó una nueva fertilización con nitrógeno con 0,5 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en el microcosmo BCN.

Se midió dos veces por semana la mineralización determinando el dióxido de carbono (CO_2) producido en los microcosmos. El CO_2 liberado se fijó en un recipiente dentro del sistema con 3 mL de NaOH y el carbonato formado se tituló con ácido clorhídrico 0,1 N. Estos datos fueron utilizados para calcular la velocidad de mineralización en cada período del estudio mediante la ecuación:

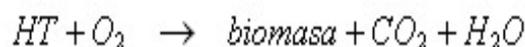
$$\mu = \frac{\Delta \text{CO}_2}{\Delta t}$$

donde μ es la velocidad de mineralización expresado en $\text{mg CO}_2 \text{ kg}^{-1}$ de suelo por día, ΔCO_2 es el CO_2 producido en el microcosmo en un período de tiempo determinado y Δt el tiempo en días del período estudiado. Al comenzar y finalizar la experiencia se determinó HT en Soxhlet y el residuo obtenido se fraccionó por cromatografía en columna de silica gel según Pucci y Pucci (2003). Se midió humedad cada 15 días, por método gravimétrico, y se corrigió a un porcentaje igual al 50 % de la CRA según Bartha (1986). Semanalmente, los microcosmos, fueron agitados para su aireación.

El seguimiento de nitrato, nitrito y amonio se realizó semanalmente (Pucci y Pucci, 2003). A tiempo inicial y final se midió nitrógeno total (Nt) por el método de Kjeldahl (Bremmer y Sulvaney, 1982) y por diferencia se calculó en Nt fijado al suelo.

El seguimiento microbiológico se realizó a tiempo cero y final por recuento en placa. Para bacterias heterótrofas se utilizó el medio R2A (Reasoner y Geldicich, 1985), para microorganismos diazotrofos el medio DM (Acuña y Pucci, 2005). Para microorganismos que utilizan hidrocarburos como fuente de carbono y energía (BDH) se utilizó un medio mineral, MM-PGO, con 0,1% de petróleo y gasoil 1:1 (Acuña y Pucci, 2005) y para contar los BDH diazotrofos se preparó un medio mineral sin nitrógeno, MM2-PGO, con 0,1 % de petróleo y gasoil 1:1 (Acuña y Pucci, 2005). Los recuentos bacterianos se incubaron 15 días a 28°C.

Con los datos de mineralización y cantidad de hidrocarburos eliminados se procedió a realizar cálculos para conocer la biomasa teórica producida en los diferentes microcosmos y la cantidad de nitrógeno incluida en la misma. Para esto se utilizó la siguiente reacción:



Para los cálculos se tuvo en cuenta un 80% (Speight, 1991) de carbono en la composición del hidrocarburo y un 46,5 y 10% (Ertola *et al.*, 1994) de carbono y nitrógeno, respectivamente, en la composición de la biomasa.

Análisis de datos

Los valores obtenidos fueron analizados utilizando análisis de la varianza (ANOVA) de un factor fijo (presencia de N), con 3 niveles, y 3 réplicas por nivel, mediante el programa BIOM (Applied Biostatistics Inc., 3 Heritage, Setauket, NY 11711 USA). Los resultados mostrados en gráficos y tablas fueron corregidos por gramo de suelo seco, y se expresa el valor promedio de los triplicados.

Resultados y discusión

El pH del suelo es acorde con la actividad bacteriana (**Tabla 1**). Para los procesos de biorremediación, la cantidad de N y P encontrada son escasas, principalmente el nitrato, nitrito, amonio, urea y fosfato que son los elementos biodisponibles y rápidamente asimilables.

Tabla 1. Características principales de la muestra estudiada. Los valores se encuentran expresados en peso seco.

pH	Humedad (%)	CRA (%)	NO ₃ (mg.kg ⁻¹)	NO ₂ (mg.kg ⁻¹)	NH ₄ (mg.kg ⁻¹)	Urea (mg.kg ⁻¹)	PO ₄ (mg.kg ⁻¹)	Nt (%)
7,1	7,3	38	2,2	0,9	0,4	0,6	5,4	0,11

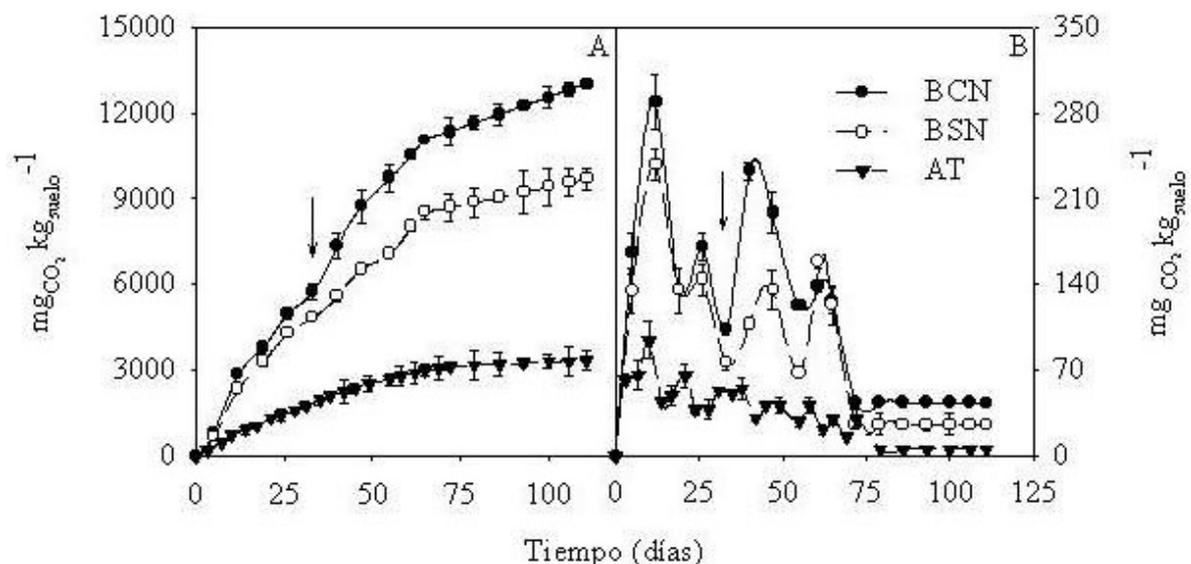
Nt: nitrógeno total.

Los recuentos de bacterias heterótrofas están en el orden de 10⁵ y los demás grupos bacterianos se encuentran un orden de magnitud por debajo de éstas (**Tabla 2**). Existen en el suelo un número similar de microorganismos con capacidad de utilizar los hidrocarburos con o sin nitrógeno en el medio de crecimiento.

Tabla 2. Caracterización inicial de los hidrocarburos y microorganismos presentes en la muestra de suelo estudiada. Los valores se encuentran expresados en peso seco.

Hidrocarburos (mg kg ⁻¹)				Microorganismos (UFC g ⁻¹ 10 ⁵)			
Totales	Alifáticos	Aromáticos	Polares	R2A	DM	MM-PGO	MM2-PGO
58715	18722	16828	23214	38	4,5	2,7	3,7

Observamos una diferencia significativa entre los microcosmos respecto a la mineralización (**Fig. 1A**). La bioestimulación con N y P logró una tasa de mineralización significativamente superior a la atenuación natural ($F_{2,5} = 543$, $p = 0,00002$), lo que se reflejó en un aumento de un 74% al comparar los microcosmos BCN con AN. El sistema BSN logró una tasa de mineralización inferior a AN ($F_{2,5} = 150$, $p = 0,0002$) reflejándose en una disminución de un 26% (**Tabla 3**).

**Figura 1.** Mineralización y velocidad instantánea de mineralización de los microcosmos estudiados. La figura 1A muestra la mineralización de hidrocarburos luego de la aplicación de los diferentes tratamientos. En la figura 1B se grafica la velocidad instantánea de mineralización calculada para cada microcosmo.

El parámetro μ para cada microcosmo indica que la mayor producción de CO_2 se produjo en los primeros 20 días (**Fig. 1B**). En BCN el pico observado fue muy importante, demostrando que en el suelo existen BDH altamente adaptadas. En BSN el pico observado el día 20 fue significativamente inferior al observado en BCN ($F_{2,5} = 37$, $p = 0,0004$), pero la presencia de μ pequeñas indica que hay microorganismos presentes en el suelo que degradan HT en deficiencia de nitrógeno con una cierta dificultad. El nitrógeno actuaría como estimulante de la utilización de HT (Dibble y Bartha, 1979), pero si no está biodisponible, hay una porción de la comunidad bacteriana del suelo que aún puede utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía.

En la **Tabla 3** se observan los HT, y sus diferentes fracciones, eliminados de los microcosmos estudiados. Los microorganismos presentes en el suelo biodegradan intrínsecamente (AN) un 9% de HT, con tendencia a eliminar igual cantidad de alifáticos y aromáticos, siendo los polares, los menos utilizados.

Tabla 3. Parámetros determinados sobre los microcosmos durante el proceso de biorremediación.

Microcosmo	Tasa de Mineralización ¹	% Biodegradación de Hidrocarburos				Índice Aro/Alif
		Totales	Alifáticos	Aromáticos	Polares	
AN	30,1	8,9	13,3	12,3	2,5	0,84
BSN	87,2	32,7	47,2	43,9	9,3	0,71
BCN	117,6	54,1	89,5	58,2	14,5	0,48

¹ Expresado en $\text{mg CO}_2 \text{ kg suelo}^{-1} \text{ día}^{-1}$. Aro: Hidrocarburos aromáticos, Alif: hidrocarburos alifáticos.

La biorremediación de hidrocarburos muestra mejores resultados con relaciones C:N entre 100:10 – 100:1 (Van Hamme *et al.*, 2003), nuestro trabajo confirma esto para el suelo Patagónico estudiado. Chaîneau *et al.* (2005) experimentaron con un suelo contaminado con hidrocarburos probando diferentes concentraciones de nutrientes. Encontraron que relaciones C:N deficientes logran valores de eliminación de HT de 47%, algo menor a la relación C:N de 100:13 que logró 62%. En nuestro trabajo, se encontró un 54% de biodegradación en BCN y un 33% en BSN, observándose que la deficiencia de nitrógeno provocó una disminución significativa de este parámetro ($F_{2,5} = 165$, $p = 0,0002$). Esto se reflejó en una disminución de un 21% de la biodegradación de los HT. Toccalino *et al.* (1993) demostraron cómo el nitrógeno resulta limitante en la biodegradación de butano y propano, observando que cuando el nitrógeno disminuía en el suelo, la biodegradación disminuía sin ser completamente nula, condición que supone la fijación de nitrógeno para obtener dicho nutriente para las BDH. En nuestro trabajo, la deficiencia de nitrógeno produjo una disminución de aproximadamente 42, 14 y 5% en la eliminación de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y polares, respectivamente. En todos los tratamientos, los hidrocarburos más degradados fueron los alifáticos. Sin embargo, el índice Aro/Alif de la **Tabla 3** se hace más cercano a 1 a medida que el nitrógeno es más deficiente en el suelo. Esto indica que la fracción alifática del hidrocarburo fue eliminada con menor eficiencia en deficiencia de nitrógeno, apoyando lo expuesto por otros autores (Chaîneau *et al.*, 2005).

En todos los tratamientos se observó que el nitrito se mantiene constante, o varía dentro de un rango de concentraciones reducido. En AN y BSN la concentración de amonio no cambió en el suelo. El amonio disminuyó significativamente en BCN en los primeros 10 días ($F_{2,5} = 769$, $p = 0,00001$), ocurriendo algo similar luego de la segunda fertilización con nitrógeno el día 33 (**Fig. 2**). El nitrato aumentó aproximadamente 3, 18 y 19 mg kg^{-1} de suelo en AN, BCN y BSN, respectivamente.

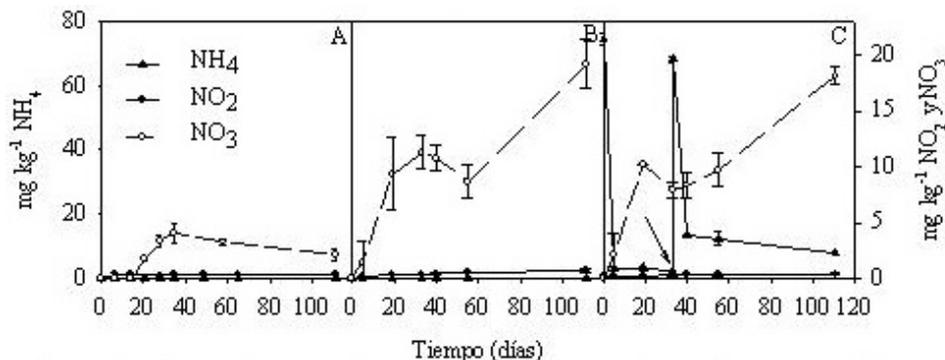


Figura 2. Seguimiento de compuestos nitrogenados en los microcosmos diseñados. Se puede observar el marcado aumento de nitrato en los sistemas sometidos a bioestimulación. La figura A corresponde al tratamiento AN y las figuras B y C a los tratamientos BSN y BCN respectivamente.

Deni y Penninckx (1999) observaron que los suelos con larga historia de contaminación son pobres en nitrógeno y esto selecciona una comunidad nitrificante con alta afinidad por el amonio. Nosotros podemos atribuir el importante aumento de nitrato a este tipo de microorganismos o a la presencia de un gran número de microorganismos fijadores de nitrógeno. Estos utilizarían los hidrocarburos como fuente de carbono y energía a expensas del nitrógeno que fijan (Piehler *et al.*, 1999), el que también puede beneficiar a los microorganismos nitrificantes altamente adaptados y así aumentar los nitratos en el suelo. Esto hace suponer que el amonio necesario para la nitrificación en AN y BSN puede ser obtenido por fijación de nitrógeno por aquellos microorganismos presentes en el suelo que desarrollaron en medios de cultivo libres de nitrógeno. Eckford *et al.* (2002) aislaron 5 cepas bacterianas de un suelo contaminado con hidrocarburos capaces de fijar nitrógeno; dos de las cuales eran pertenecientes al género *Pseudomonas* que poseen la capacidad de biodegradar hidrocarburos. En nuestro estudio, la presencia de hidrocarburos con una relación C:N:P de 100:0,003:0,2 produce un enriquecimiento significativo, sistema BSN, de bacterias diazotrofas ($F_{2,5} = 55$, $p = 0,001$) con la capacidad de utilizar los HT como fuente de carbono y energía (**Tabla 4**).

Tabla 4. Recuentos bacterianos e índices calculados luego de 111 días de biorremediación en los diferentes microcosmos.

Microcosmo	Recuentos Bacterianos ($\text{UFC g}^{-1} 10^6$)				Índices Calculados	
	R2A	DM	MM-PGO	MM2-PGO	DM/R2A	MM2-PGO/MM-PGO
AN	6	2	0,6	0,8	0,33	1,33
BSN	210	160	38	120	0,76	3,16
BCN	650	450	90	77	0,69	0,86

En los estudios de ecología bacteriana, las características de los ambientes naturales son responsables de la selección de los microorganismos que los habitan. En nuestros sistemas esto se reflejó en los recuentos bacterianos ya que en BSN el número de microorganismos que desarrollan sin nitrógeno incrementó ($F_{2,5} = 764$, $p = 0,00001$) y los BDH aumentaron en mayor medida en los medios de cultivo libres de nitrógeno ($F_{2,5} = 429$, $p = 0,00003$). En BCN las comunidades bacterianas que más se enriquecieron fueron las que desarrollaron en los medios con nitrógeno (**Tabla 4**). En el suelo de los microcosmos existen microorganismos que poseen la capacidad de utilizar los hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno y lograr la biorremediación de los mismos con una cinética más lenta.

En la **Tabla 5** se observa la biomasa teórica calculada en función al CO_2 producido y al hidrocarburo biodegradado. La deficiencia de nitrógeno (comparación de BSN con BCN) en el suelo produjo una disminución significativa en la producción de biomasa ($F_{2,5} = 118$, $p = 0,0004$).

Tabla 5. Parámetros microbiológicos medidos en los microcosmos luego de la aplicación de los diferentes tratamientos.

Microcosmo	Biomasa (mg kg^{-1})	N-Biomasa (mg kg^{-1})	Nt (mg kg^{-1})	N-fijado (mg kg^{-1})
AN	698	70	120	10
BSN	3214	321	170	60
BCN	5446	545	454	124

En AN la cantidad de nitrógeno encontrada en la biomasa calculada corresponde al 67% del nitrógeno total (**Tabla 5**). En BSN y BCN se encontró que el nitrógeno incorporado a la biomasa fue mayor al Nt en suelo.

En AN sólo se fijaron 10 mg de nitrógeno. De los 120 mg de Nt encontrados, 70 mg corresponden a la biomasa en el sistema, con lo que sobran 50 mg. Esto puede deberse a que el nitrógeno no esté biodisponible para los microorganismos o que la fijación del mismo es tan baja porque sus requerimientos se cubren en el suelo.

En BCN y BSN se encontró que se fijaron 124 y 60 mg de nitrógeno, respectivamente. Se observó que el nitrógeno incluido en la biomasa fue mayor al Nt medido. En BCN faltaron aproximadamente 100 mg y en BSN 150 mg. La fijación de nitrógeno es un proceso que requiere de gran cantidad de energía para su realización. El nitrógeno fijado es utilizado en la formación de biomasa en los sistemas naturales y la energía necesaria para el proceso se obtiene generalmente de la oxidación de los compuestos carbonados (Chen *et al.*, 2003). Esto hace suponer que los microorganismos estarían utilizando la energía obtenida de la mineralización de los hidrocarburos para mantener la actividad metabólica mas que para formación de biomasa (Bento *et al.*, 2005), marcándose en mayor medida en BSN.

Los resultados encontrados en el presente estudio demuestran que los procesos de biorremediación de hidrocarburos en el suelo de la Patagonia Argentina estudiado son posibles y comparables a los resultados obtenidos por otros autores. Este suelo se caracterizó por ser deficiente en nitrógeno y la contaminación de hidrocarburos en estas condiciones selecciona una comunidad bacteriana diazotrofa degradadora de hidrocarburos. La deficiencia de nitrógeno en el suelo produce una biorremediación menos eficaz con una disminución en la tasa de mineralización, en la producción de biomasa y en la eliminación de hidrocarburos, especialmente los del tipo alifático. La fijación de nitrógeno observada en los microcosmos puede ser el proceso responsable de suministrar este nutriente a los microorganismos del suelo. Es necesario continuar con los trabajos en esta dirección y realizar un estudio mas profundo sobre los microorganismos fijadores de nitrógeno con capacidad de degradar hidrocarburos ya que estos serían de gran utilidad en futuros procesos de biorremediación en estas condiciones.

Referencias

- Acuña, A. y Pucci, O. 2005. Biodegradación de hidrocarburos en suelos deficientes de nitrógeno. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*. 81: 89-95.
- Atlas, R. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 1: 317-327.
- Atlas, R y Bartha, R. 2002. Los microorganismos en sus hábitat naturales: microbiología del aire, del agua y del suelo. En *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. (Ed. Pearson Educación SA). pp. 329-380, Madrid. España.
- Bartha, R. 1986. Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12: 155-172.
- Bento, F., Camargo, F., Okeke, B. y Frankenberger W. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 96: 1049-1055.
- Bremmer, J. y Sulvaney, C. 1982. Total nitrogen. En *Methods of Soil Analysis, part 2*. Agron. Mongr. 9. 2nd ed. ASA and SSSA, Madison, WI . p.595-624.
- Chaîneau, C., Rougeux, G., Yéprémian, C. y Oudot J. 2005. Effects of nutrient on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1490-1497.
- Chen, G., Zhu, H. y Zhang, Y. 2003. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Res. Microbiol.* 154: 393-398.
- Deni, J. y Penninckx, M. 1999. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4008-4013.
- Dibble, J. y Batha, R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 729-739.
- Eckford, R., Cook, F., Saul, D., Aislabie, J y Foght, J. 2002. Free-living heterotrophic nitrogen-fixing bacteria isolated from fuel-contaminated antarctic soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 :5181-5185.
- Ertola, R., Yantorno, O. Y Mignone, C. 1994. Crecimiento microbiano. En *Microbiología Industrial*. (ed. OEA. Prog. Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico), pp. 43-54, Washington, DC, USA.
- Ferguson , S. 1998. Nitrogen cycle enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2: 82-193.
- Johnsena, A., Wick, L. y Harmsb, H. 2005. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ. Pollut.* 133: 71-84.
- Maila, M. Y Cloete, T. 2004. Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Rev. Environ. Scien. Biotechnol.* 3: 349-360.
- Piehler, M., Swistak, J., Pinckney, J. y Paerl, H. 1999. Stimulation of diesel fuel biodegradation by indigenous nitrogen fixing bacterial consortia. *FEMS Microbiol. Ecol.* 38: 69-78.
- Prantera, M., Drozdowicz, A., Leite, S. y Rosado, A. 2002. Degradation of gasoline aromatic hydrocarbons by two N₂-fixing soil bacteria. *Biotechnol. Lett.* 24: 85-89.
- Pucci, G. y Pucci, O. 2003. Biodegradabilidad de componentes de mezclas naturales de hidrocarburos previamente sometidas a landfarming. *Rev. Microbiol.* 35: 62-68.
- Reasoner, D. y Geldreich, E. 1985. A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1-7.

Richardson , D. y Watmough, N. 1999. Inorganic nitrogen metabolism in bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3: 207-219.

Speight, J. 1991. Composition. En *The chemistry and technology of petroleum*. (Ed. Marcel Dekker), pp. 209-253, New York, .

Toccalino, P., Jonson, R., y Boone, D. 1993. Nitrogen limitation and nitrogen fixation during alkane biodegradation in sandy soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2977-2983.

Van Hamme, J., Singh, A. y Ward, O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 503-549.