

PROCESO BIOLOGICO DE ELIMINACIÓN DE HIDROCARBUROS EN ZONAS SEMI ÁRIDAS

O.H.Pucci, M.A.Bak, S.R.Peressutti

Ceima – Fcn – Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco - Republica Argentina

L. Wünsche, I.Klein, C. Härtig

Ufz – Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle Bmbh - Republica Federal de Alemania

RESUMEN

El presente trabajo se basa en una biorremediación "in situ", en condiciones optimizadas, en suelos semiáridos de la Patagonia Central con un alto grado de contaminación por hidrocarburos.

La experiencia de biorremediación se llevó a cabo en dos etapas caracterizadas por las siguientes condiciones:

Primera etapa: agosto de 1995/ diciembre de 1996, el suelo y el petróleo contaminante fueron mezclados por métodos agrícolas, humidificado dos veces en este período y agregado una pequeña cantidad de nutrientes una vez.

Segunda etapa: diciembre de 1996 – mayo de 1997, y continúa. El suelo fue arado y humedecido una vez al mes, y se trabajaron 4 diferentes sectores, con agregado de nutrientes, con agregado de cultivo starter (inoculado) con agregado de nutrientes y cultivo starter, y un sector control, sólo con biodegradación natural.

En la primera etapa de biorremediación se produjo una degradación de aproximadamente el 25% del total del hidrocarburo contenido. Mediante análisis por cromatografía en columna se encontró que durante este primer periodo se degradó mayoritariamente hidrocarburos alifáticos, junto con una pequeña cantidad de aromáticos.

Al final del segundo periodo de biodegradación se encontraron, en las diferentes variantes de tratamiento los siguientes porcentajes de degradación (relativos al residuo de hidrocarburos presentes al final del primer periodo):

- Suelo inoculado y fertilizado:	55%
- Suelo inoculado	30%
- Suelo fertilizado	16%
- Suelo sin inoculación y fertilización	13%

Durante los dos periodos, el 66% de la contaminación original de hidrocarburos se degradó bajo condiciones optimizadas. El resultado de la cromatografía en columna muestra claramente que todas las fracciones fueron degradadas. El contenido residual de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y asphalténicos, es aproximadamente el mismo debido a las diferentes tasas (velocidades) de degradación de cada una de las fracciones.

Durante los primeros cuatro meses de la segunda etapa del proceso de biorremediación, la composición de la bacteriocenosis autóctona cambia significativamente en todas las variantes de tratamiento, debido a la disponibilidad de diferentes hidrocarburos utilizables. La adición de nutrientes y la inoculación con el cultivo starter *Dietzia maris* CR-053 incrementa, sólo temporalmente la utilización de sustratos (no hidrocarburos) y estas diferencias se minimizan hasta igualarse casi completamente después de cuatro meses de biorremediación. Los resultados indican la alta similitud de la composición de la bacteriocenosis en el mismo tiempo de la marcha del proceso de biorremediación. El resultado de los análisis de la composición de por aislamiento e identificación de los principales integrantes apoyan esta conclusión.

La cepa inoculada, *D. maris*, fue posible distinguirla del resto de las cepas autóctonas encontradas, en base a su perfil de ácidos grasos. Dicha cepa no sólo permaneció durante los tres primeros meses sino que incrementó su número desde 800.000 ufc/g hasta 2.000.000 ufc/g, correspondiendo esto a un 10 % de la comunidad bacteriana cultivable.

MATERIALES Y METODOS

Area de estudio:

Se realizó un proceso de biorremediación sobre un área de explotación petrolera contaminada con crudo, que se encuentra ubicada en "Cerro Dragón" aproximadamente a 120 Km de la ciudad de Comodoro Rivadavia.

El estudio se desarrolló en 2 etapas:

Primera etapa (agosto 1995 - diciembre 1996): luego del acondicionamiento del área contaminada (mezclado del petróleo con la matriz del suelo) el tratamiento de biorremediación consistió sólo en el agregado nutrientes, agua y aireación mediante métodos mecánicos.

Segunda etapa (diciembre 1996 - mayo 1997): un sector del área contaminada tratada en la primera etapa fue dividida en cuatro subáreas de 16 m² cada una, las cuales recibieron diferentes tratamientos:

I. Fertilización.

II. Inoculación.

III. Fertilización e Inoculación.

IV. Control (sin fertilización ni inoculación).

Los cuatro sectores fueron periódicamente aireados en forma mecánica y humidificados artificialmente.

Fertilizantes:

Los suelos fueron fertilizados mediante el agregado de nutrientes inorgánicos tales como PO₄HNa₂, CINH₄ y NO₃K manteniendo una relación de C:P y C:N de 800:1 y 60:1, respectivamente (2).

Inóculo:

La cepa inoculada fue *Dietzia maris* CR 053 aislada de ambientes patagónicos, la cual se describe posteriormente.

El inóculo fue cultivado en Medio Base Mineral (MBM) (g/l: ClNa,5; PO₄HK₂,1; PO₄H₂NH₄,1; SO₄(NH₄)₂,1; SO₄Mg, 0.2, NO₃K,3; pH: 7) suplementado con 0.025g/l de extracto de levadura y 0.5% de gas-oil. El medio de cultivo fue dispuesto en recipientes estériles de 4 litros de capacidad e incubado a temperatura ambiente hasta una concentración bacteriana de aproximadamente 10⁷ ufc/ml.

Seguimiento del proceso de biorremediación:

Muestreos y Preparación de la muestra: durante la primera etapa se recolectó muestras de suelo contaminado y no contaminado mientras que en la segunda etapa se analizaron muestras de las cuatro subáreas en estudio. Todas las muestras de suelo fueron recolectadas mediante un método aleatorio y sistemático, siendo luego homogeneizadas (10) en el laboratorio.

Análisis de hidrocarburos: Las muestras de suelo fueron periódicamente evaluadas, en cuanto al contenido de hidrocarburos, mediante el método de extracción con cloroformo y determinación gravimétrica del hidrocarburo extraído. La variación en la composición del contaminante fue determinada por cromatografía en columna de silica-gel (Kieselgel 60, 35-70 mesh, Merk) de los extractos obtenidos. Las fracciones alifática, aromática y asfáltica fueron eluidas sucesivamente con aproximadamente 300 ml de hexano, benceno y cloroformo-metanol (1:1 v/v), respectivamente. Las mismas fueron recogidas en volúmenes de 25 ml, obteniéndose un total de 33 fracciones cuyo peso fue determinado gravimétricamente previa evaporación del solvente (método de Dibble-Bartha (2) modificado).

Análisis físico-químico del suelo: Las áreas en estudio fueron caracterizadas en cuanto al contenido de materia orgánica e inorgánica, densidad aparente y real, porosidad, capacidad de retención de agua, pH (1,3), concentración de cationes y aniones (9). También se determinaron las variaciones producidas en el contenido de nutrientes: fosfatos (7), amonio (6), urea (6), nitratos (5) y nitritos (5), a lo largo del tratamiento.

Análisis microbiológico:

Enumeración de microorganismos: Se analizaron los cambios en el número de bacterias aerobias totales

y bacterias degradadoras de hidrocarburos utilizando el método de diseminación en superficie. Con tal fin se prepararon suspensiones de la muestra de suelo en solución fisiológica a partir de la cual se realizaron las diluciones apropiadas. Las bacterias aerobias totales fueron cuantificadas utilizando el medio R2A (g/l: extracto de levadura, 0.5; peptona, 0.5; casaminoácidos, 0.5; glucosa, 0.5; almidón, 0.5; piruvato de sodio 0.3; PO_4HK_2 , 0.3; SO_4Mg , 0.5; agar, 12. pH: 7.2). Para el recuento de las bacterias degradadoras se utilizó MBM sólido suplementado con 20ul de una mezcla petróleo-gas oil (1:1) que se disemina sobre la superficie del agar (método implementado por este grupo).

Obtención de cepas para el estudio de la biocenosis bacteriana: a partir de los recuentos en MBM y medio R2A se tomaron todas las colonias de las placas correspondientes a la dilución donde el número de las mismas fuese entre 30 y 300 UFC. Cada cepa fue caracterizada según la morfología de las colonias, coloración de Gram y pruebas bioquímicas mínimas (calatasa, reducción de nitratos, oxidasa, SIM, crecimiento en tioglicolato y O-F) (4).

Identificación bacteriana: Las bacterias aisladas fueron identificadas en la División de Microbiología Ambiental, Leipzig (Alemania) mediante: Sistema de Identificación Automatizado BIOLOG con base de datos para GN y GP (Biolog, Inc. Hayward, Calif, USA) y el sistema de identificación microbiana MIS/SHERLOCK, con base de datos para bacterias aeróbicas (TSBA standard library, version 3.9, 1995) y Actinomycetes (ACTINI standard library, version 3.8, 1993), Microbial II (Inc. Newark, Del, USA).

Capacidad de degradación de hidrocarburos: para determinar la capacidad de los microorganismos aislados de crecer a expensas de diferentes hidrocarburos, se efectuaron suspensiones de las cepas aisladas y se inocularon en MBM líquido suplementado con diversos hidrocarburos como: petróleo, nafta, gas-oil, kerosene, parafina, aceite mineral, pentano, hexano, heptano, octano, pentadecano, pristano, hexadecano, benceno, tolueno, xileno, naftaleno, antraceno, fenantreno, y asfaltenos. También se probaron otros sustratos como: benzoato, m-toluoato, ftalato, triptofano, salicilato y fenol (adaptación del método de recuento de bacterias degradadoras de hidrocarburos por N.M.P. (8)).

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados obtenidos en el seguimiento de la biorremediación se presentan en el gráfico N° 1. En el mismo pueden observarse las variaciones ocurridas en los recuentos bacterianos, tanto de bacterias totales como degradadoras, y en el contenido de hidrocarburos, en ambas etapas del estudio realizado.

1. PRIMERA ETAPA

En el primer período, desde agosto de 1995 a diciembre de 1996, se efectuó una biorremediación en la que sólo se mezcló el suelo con el residuo y se adicionó nutrientes y agua en dos oportunidades durante todo el período. Este agregado se realizó a partir del mes de noviembre, por lo que pasaron 6 meses desde el derrame ocurrido en Mayo de 1995, lo que permitió la volatilización de los compuestos livianos del contaminante. El resultado que se obtuvo fue una degradación del 25% de los hidrocarburos presentes, que puede considerarse baja en relación al tiempo transcurrido. En este período la mayor disminución se produjo en los hidrocarburos alifáticos, seguido en orden decreciente por la degradación de aromáticos y de los hidrocarburos polares o asfaltenos.

Las bacterias aeróbicas y degradadoras de hidrocarburos se incrementaron en 1 y 2 logaritmos respectivamente.

2. SEGUNDA ETAPA

Se realizó a partir de diciembre de 1996 y continúa, habiéndose interrumpido los trabajos por razones climáticas, durante el período invernal. El desarrollo de esta etapa, en el sitio fertilizado e inoculado se puede observar en el gráfico N° 2, donde se muestran las variaciones en los recuentos bacterianos y en el contenido de hidrocarburos. En esta segunda etapa el aumento del número de bacterias fue de un logaritmo tanto para bacterias aeróbicas como para bacterias degradadoras de hidrocarburos. Pese a este modesto aumento la degradación de hidrocarburos se incrementó sustancialmente, llegándose a degradar un 55 % de los hidrocarburos que se encontraban presentes al inicio de la segunda etapa, en un período de 6 meses. Es importante destacar que las tres fracciones de hidrocarburos decrecieron hasta obtenerse porcentajes muy similares entre sí (ver Gráfico N° 4).

Los porcentajes de biodegradación obtenidos en el resto de los sitios tratados fueron:

SUELO SIN FERTILIZACIÓN NI INOCULACIÓN	13 %
SUELO CON FERTILIZACIÓN	16 %
SUELO INOCULADO	30 %

Como puede observarse estos valores fueron significativamente menores a los alcanzados en el suelo inoculado y fertilizado. (ver Gráfico N° 3)

ANÁLISIS DE LA EVOLUCIÓN DE LAS FRACCIONES DE HIDROCARBUROS EN EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN EN SUELOS INOCULADO Y FERTILIZADO

En el gráfico N° 4 se presenta la variación en la composición de los hidrocarburos durante la biodegradación ocurrida en el sitio inoculado y fertilizado. Se muestran en el mismo los resultados de las cromatografía en columna fraccionada en cinco tiempos diferentes de control, desde el hidrocarburo sin que sufriera la acción de los microorganismos (agosto 1995) hasta mayo de 1997. Como puede apreciarse el petróleo derramado contiene predominantemente hidrocarburos alifáticos y podemos observar a través del tiempo la facilidad de biodegradación de las tres fracciones estudiadas, siendo los hidrocarburos alifáticos la fracción más rápidamente degradable seguida por los aromáticos y por último los hidrocarburos polares o asfaltenos.

ESTRUCTURA Y DINÁMICA DE LA BACTERIOCEENOSIS AUTÓCTONA DURANTE EL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

La dinámica de la composición de la bacterioceenosis autóctona fue estimada evaluando los perfiles de utilización de diferentes sustratos (método BIOLOG modificado).

Durante los primeros cuatro meses del proceso de biorremediación, desde diciembre de 1996 hasta abril de 1997, el número de sustratos del BIOLOG utilizados por la biocenosis total se incrementó continuamente en todas las variantes de biorremediación inclusive en el sitio no inoculado ni fertilizado (gráfico N° 5). Esto indica cambios significativos de la composición de la biocenosis en todas las variantes. El aumento de la diversidad taxonómica fue debido al surgimiento de algunas especies con otros patrones de utilización de sustratos significativamente diferentes de los iniciales. Estas variaciones son causadas por la disponibilidad de hidrocarburos utilizables en todas las variantes experimentales.

Luego de 4 o 5 meses el número de sustratos utilizados no se incrementó. En este punto el 80-90% de los sustratos probados fueron utilizados por la biocenosis y cambios adicionales sólo pueden ser posibles dentro del 10 al 20% residual. Este hecho enmascara un posible cambio: la composición de la biocenosis no continúa cambiando por que no hay nuevos sustratos disponibles en el ecosistema (zona contaminada del campo).

La adición de nutrientes inorgánicos y /o la inoculación de la cepa seleccionada (*D. maris* CR 053), muestra sólo temporariamente (en los 3 primeros meses) una leve diferencia en el patrón de utilización de sustratos si se compara con la biorremediación en el sitio no inoculado ni fertilizado (S_j :0,813 y 0,860). Este hallazgo indica que la composición de la bacterioceenosis de suelos tratados y no tratados son relativamente similares en este periodo (ver tabla 1).

TABLA 1

Comparación (S_j) de la utilización de sustratos entre la biocenosis de los sitios inoculado y/o fertilizado y la biocenosis del suelo no inoculado ni fertilizado.

rcf1Periodo de biorremediación	Suelo fertilizado	Suelo inoculado	Suelo inoculado -fertilizado
2 (febrero de 1997)	0,813	0,817	0,829
3 (marzo de 1997)	0,845	0,842	0,860
4 (abril de 1997)	0,968	0,937	0,936
5 (mayo de 1997)	0,960	0,976	0,976

En los últimos 4 meses luego del comienzo del proceso de biorremediación esas pequeñas diferencias entre los patrones de utilización del sustrato observados en las variantes tratadas y la biorremediación natural se iguala casi completamente (S_j entre 0,936 y 0,976)(ver tabla 1), indicando que la biocenosis de todas las variantes son muy similares en cuanto a su composición en este periodo.

2.- ANÁLISIS TAXONÓMICO DE LA BIOCENOSIS POR AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE SUS INTEGRANTES PRINCIPALES

Los resultados obtenidos con respecto a los patrones de utilización de sustratos de la biocenosis completa son sustentados por los resultados de los análisis taxonómicos. Estos análisis fueron llevados a cabo por aislamiento de colonias morfológicamente distinguibles de los principales integrantes de la comunidad bacteriana (concentración entre 10^5 a 10^6 UFC/gr de suelo) y la siguiente identificación de los cultivos puros en base al aspecto morfológico, las características quimiotaxonómicas y la aplicación de sistemas de identificación automáticos (BIOLOG y MIS). De esta forma la composición de la biocenosis del suelo fertilizado e inoculado en comparación con la del suelo no inoculado ni fertilizado, fue analizada al iniciar la experiencia y después de 2 meses de biorremediación (febrero de 1997).

La composición de la biocenosis en el sitio no inoculado ni fertilizado y de la variante inoculada y fertilizada al comienzo de la biorremediación no muestra diferencia significativa: las especies gram positivas predominaron claramente y la biocenosis prácticamente consistió de diferentes géneros de los actinomicetales (*Gordonia*, *Dietzia*, *Rhodococcus*). Debería mencionarse, al respecto que las cepas de *Dietzia maris* encontradas en el área no inoculada es claramente diferente del cultivo starter. Aproximadamente el 10% de los aislamientos de las bacterias gram positivas no pudieron ser identificados con seguridad.

Como único representante de los gram negativos y presentes en ambos sitios estudiados, se encontró *Alcaligenes xylosoxidans*.

Luego de 2 meses de experiencia (febrero de 1997) se encontraron cambios significativos, marcados por la aparición de bacterias gram negativas como: *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas mendocina* en el suelo no inoculado ni fertilizado, y *Pseudomonas stutzeri* (en relativamente alto porcentaje) y *Pseudomonas fluorescens* en el suelo inoculado y fertilizado. Además de los géneros de actinomicetes *Gordonia*, *Dietzia*, *Rhodococcus*, especialmente *fascians* y *erhitropolis*, presentes también en las muestras de suelo de diciembre de 1996, se encontraron taxas de gram positivos como *Arthobacter*, en ambas variantes, *Microbacterium* (sin tratamiento) y *Bacillus* (en suelo tratado).

3.- DESTINO DEL CULTIVO STARTER DE *Dietzia maris* CR-053 EN EL ECOSISTEMA.

En suelos de la Patagonia está presente, como población autóctona, *Dietzia maris* y se la encuentra tanto en zonas que han sufrido contaminación con hidrocarburos como en áreas no contaminadas. La cepa CR-053 fue identificada como *Dietzia maris* y fue seleccionada para ser utilizada como starter en el presente trabajo. En los seguimientos periódicos que se efectuaron a la 4 áreas de biorremediación se halló este género tanto en la zona no inoculada como en la zona inoculada y fertilizada. Para discriminar entre la cepa inoculada, de amplio rango de biodegradación de hidrocarburos, y las cepas no inoculadas se efectuó un perfil de los ácidos grasos de membrana celular y sólo se encontró coincidencia entre los perfiles de la cepa CR-053 con las bacterias encontrada en la zona inoculada en el muestreo de febrero de 1997. Las cepas aisladas en el mes de diciembre de 1996 en el sector inoculado y fertilizado así como las obtenidas de los muestreos de diciembre de 1996 y febrero de 1997, presentan distinto perfil de ácidos grasos por lo que se consideran cepas diferentes a *D. maris* CR-053. El hecho de no haber encontrado dicha cepa en la zona inoculada después de la siembra podría deberse a que la densidad de bacterias inoculadas correspondió a 10^5 ufc/g y los recuentos de bacterias debieron efectuarse a partir de concentraciones de 10^6 ufc/g.

El análisis por DGGE muestra la presencia del género en estudio tanto en suelo no inoculado como en suelo fertilizado e inoculado. Esta técnica permite detectar tanto bacterias cultivables como no cultivables a nivel de género pero no a nivel de cepas.

El cultivo starter crece hasta representar el 10% de la población total después de dos meses de inoculada. Se debe considerar la presencia de depredadores y la competencia bacteriana.

CONCLUSIONES

La biorremediación in situ de suelos semiáridos de la Patagonia central se aplicó con éxito bajo condiciones optimizadas. La inoculación con un cultivo starter seleccionado, en combinación con la adición de nutrientes inorgánicos, aceleró significativamente la biorremediación.

Bajo condiciones optimizadas el 66% de los hidrocarburos totales contenido en el suelo fueron degradados. Las diferentes tasas de biodegradación de las fracciones alifáticas, aromáticas y asfálticas dieron como resultado concentraciones finales semejantes y cambios significativos en la composición de los hidrocarburos residuales.

La composición de la biocenosis autóctona cambió continuamente durante el proceso de biorremediación, sin embargo diferencias significativas entre las comunidades de los cuatro sitios estudiados podrían no ser detectados por los métodos utilizados.

El cultivo starter de *Dietzia maris* CR-053 pudo ser diferenciado de otras cepas presentes naturalmente en estos suelos, en base a su perfil de ácidos grasos. Esta bacteria se inoculó en concentraciones de 800000 UFC/g y aumentó considerablemente en tres meses hasta una densidad de 2000000 UFC/g.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Allison L.E. et al. 1993. Diagnóstico y Rehabilitación de suelos salinos y sódicos. Ed. L.A. Richards, Editorial Limusa, México.
- 2- Dibble J.T., Bartha R. 1979. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of oil sludge. Appl. Env. Microbiol. 37: 729 - 739.
- 3- García Trejo A. 1981. Experimentos en Microbiología del suelo. Ed. Compañía Editorial Continental, S.A. México.
- 4- Mac Faddin, J.F., MS, MT(ASCP), SM(AAM), SFC, USA Retired. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 2th. Ed., Williams and Wilkins, Baltimore-London.
- 5- Métodos para el Examen de las Aguas y de los Líquidos Cloacales. Administración General de Obras Sanitarias de La Nación.
- 6- Método colorimétrico para la determinación de amonio como azul de indofenol (Según equipo Uremia de WIENER)
- 7- Método colorimétrico para la determinación de fósforo inorgánico como azul de molibdeno (Según equipo de Fosfatemia de WIENER)
- 8- Mills, A.L., C.Breuil and R.R. Colwell. 1978. Enumeration of Petroleum-Degrading Marine and Estuarine Microorganisms by the Most Probable Number Method. Can. J. Microbiol. 24:552-557.
- 9- Standard Methods for Examination of Water and Wastewater. 1992. 18th Ed. Webster R. and M.A. Oliver. 1990. Sampling and Estimation. In: Spatial Information Systems. Ed. Oxford University Press. p. 27-56.

GRAFICO N° 1: VARIACIÓN DE HIDROCARBUROS Y RECuentos BACTERIANOS EN LA BIODEGRADACIÓN A CAMPO

En este gráfico se pueden observar las dos etapas de la biorremediación, la primera abarca desde el inicio hasta diciembre de 1996 y se caracteriza por un incremento de bacterias aeróbicas y degradadoras de hidrocarburos, siendo mayor el de estas últimas. La disminución de hidrocarburos y de sus fracciones fue relativamente bajo, en el orden de un 25% (para hidrocarburos totales). La segunda etapa comienza en el mes de diciembre de 1996 y se caracteriza por un aumento más moderado en el número de bacterias cultivables, y con un marcado descenso de los hidrocarburos totales y sus fracciones..

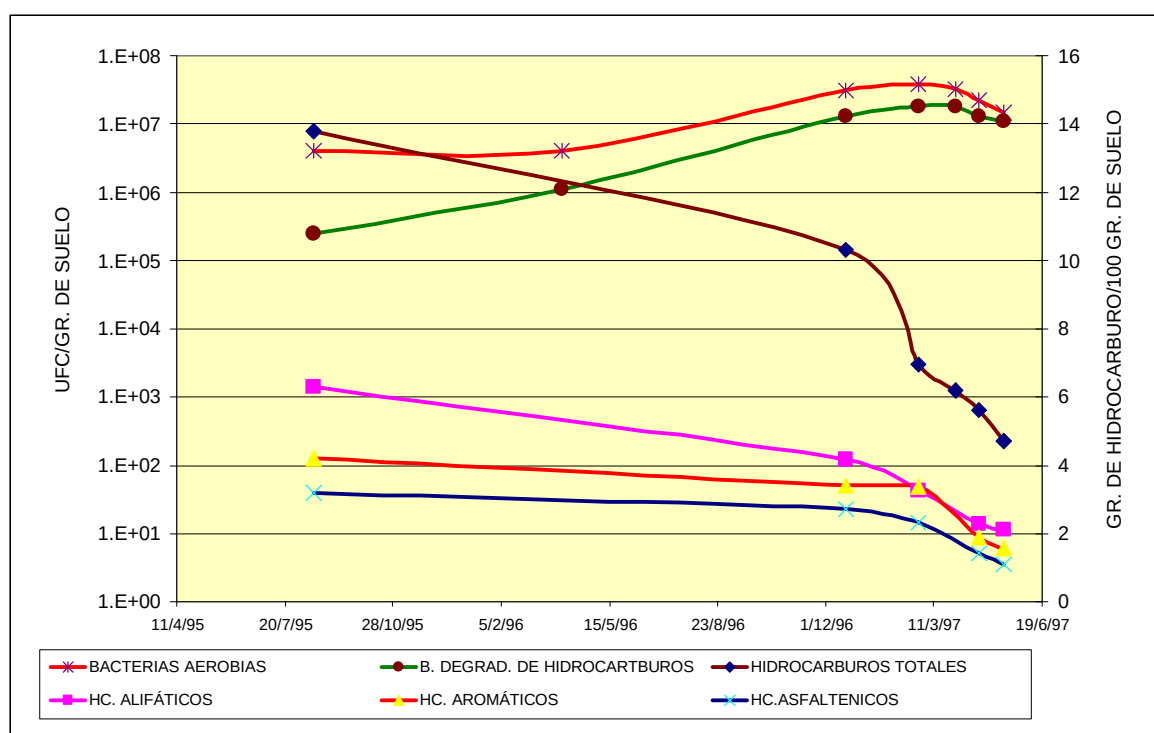


GRAFICO N° 2: VARIACIÓN DE HIDROCARBUROS Y RECuentOS BACTERIANOS EN LA VARIANTE INOCULADA Y FERTILIZADA. Segunda etapa

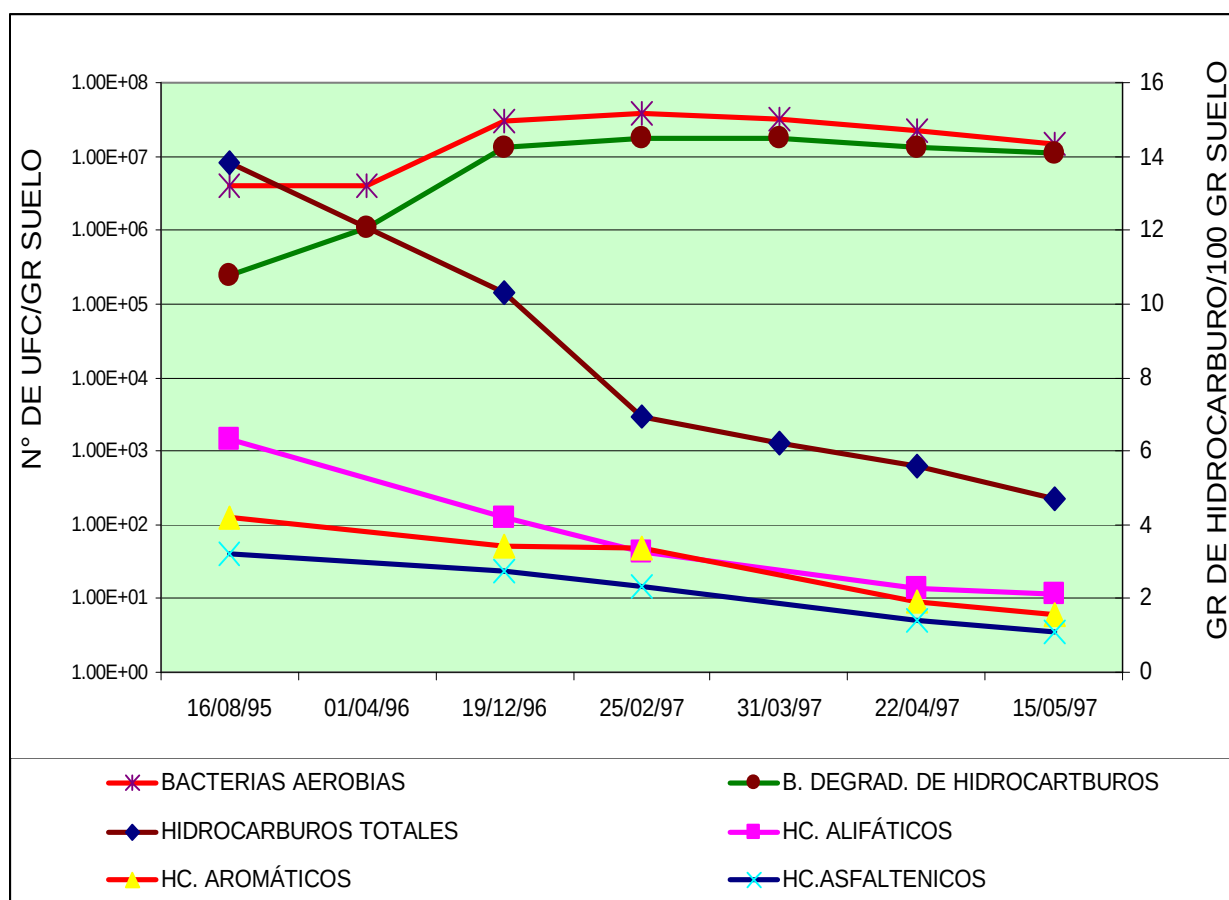


GRAFICO N° 3: DISMINUCIÓN DEL CONTENIDO DE HIDROCARBUROS TOTALES (EXTRACTABLES CON CLOROFORMO) DE SUELOS EN LAS CUATRO VARIANTES DE BIODEGRADACIÓN ENSAYADAS.

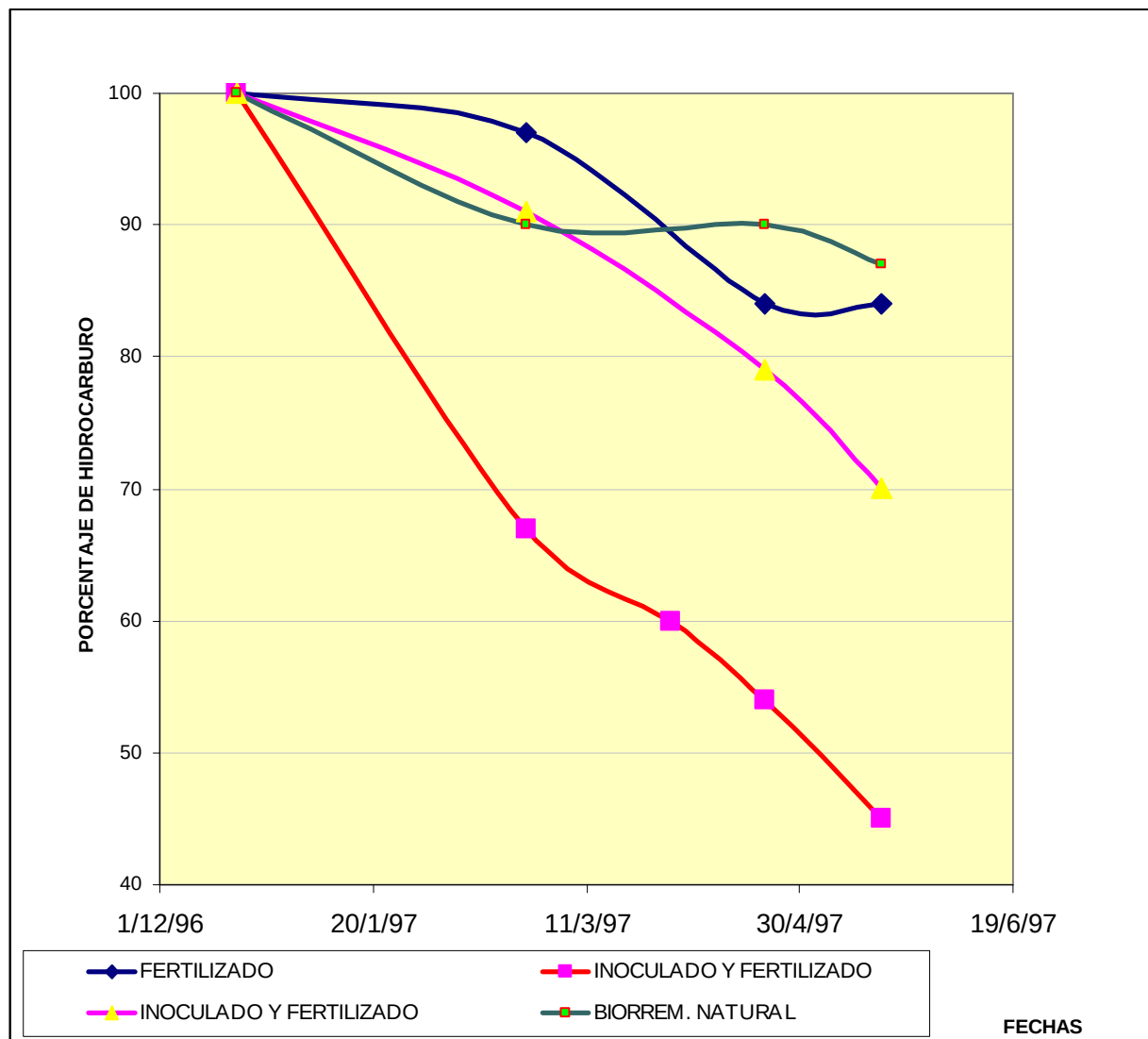


GRAFICO N° 4: VARIACIÓN DE LAS DIFERENTES FRACCIONES DE HIDROCARBUROS EN EL PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DE EN EL SITIO INOCULADO Y FERTILIZADO

En este gráfico podemos observar las variaciones a través del tiempo en el sitio fertilizado e inoculado de las tres fracciones estudiadas de petróleo. Los fracciones 1 a 11 corresponden a hidrocarburos alifáticos, las de 12 a 21 corresponden a hidrocarburos aromáticos y las de 22 a 31 corresponden a hidrocarburos polares (asfaltenos). La primera fracción en disminuir es la fracción alifática y también es la que disminuye en mayor proporción, le sigue la aromática y por último la de compuestos polares.

V

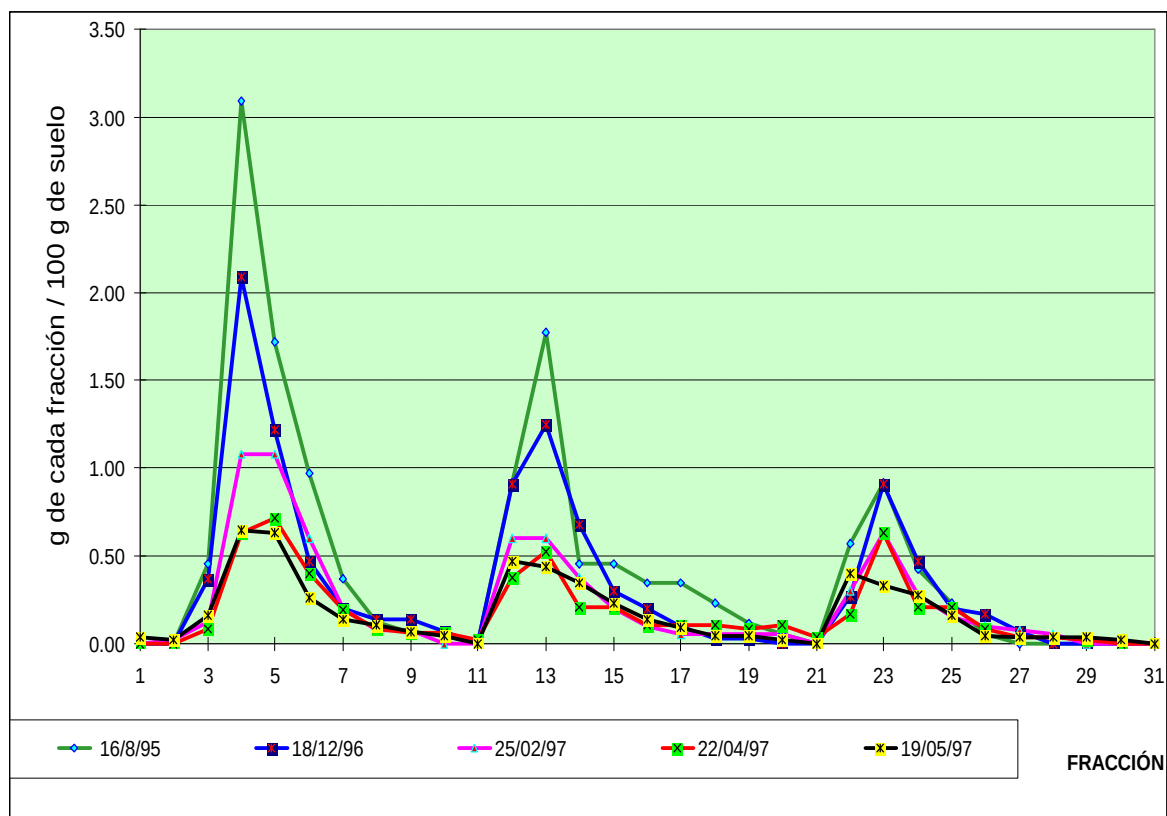


GRAFICO N° 5: UTILIZACIÓN DE SUSTRATOS BIOLOG POR LAS COMUNIDADES BACTERIANAS EN LAS CUATRO VARIANTES ESTUDIADAS.

La ensayos de utilización de los sustratos que integran el sistema BIOLOG muestran un incremento a través del tiempo en que transcurre la biorremediación para llegar a casi la totalidad de los mismos en el mes de mayo de 1997.

