

1. DATOS GENERALES DEL PROYECTO

<b>Código:</b>	CIVABI-010713
<b>Centro de Investigación:</b>	Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad
<b>Programa:</b>	TRATAMIENTO DE RESIDUOS Y CONTAMINANTES AMBIENTALE
<b>Título del Proyecto:</b>	EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL SUELO DURANTE Y DESPUES DE UN PROCESO DE BIOREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS HAPs
<b>Grupo de Investigación:</b>	Biodiversidad y Recursos Genéticos
<b>Area de Conocimiento:</b>	Ciencias de la Vida
<b>Línea de Investigación:</b>	Biodiversidad y Recursos Genéticos
<b>Tipo de Investigación:</b>	Desarrollo
<b>Campo :</b>	Tecnologías
<b>Investigador Principal :</b>	MANUEL ERNESTO DELGADO FERNANDEZ
<b>Proyectos Vinculados :</b>	SELECCIÓN Y VALORACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS EN LA BIORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS HAPs
<b>Duración del Proyecto :</b>	12 Meses
<b>Localización del Proyecto :</b>	LABORATORIOS CIENCIAS DE LA VIDA-CUENCA
<b>Fecha de ingreso :</b>	02/10/2013 15:30

## 2. ANTECEDENTES

En el Ecuador las actividades que se desarrollan enmarcadas en el sistema productivo y en la explotación petrolífera, provoca serios daños al medio ambiente, el suelo representa el ecosistema más vulnerable, el mismo puede ser afectado por hidrocarburos.

El suelo es un nicho ecológico en donde podemos encontrar un sinnúmero de microorganismos que actúan en favor de la fertilidad del mismo, a través de los ciclos tróficos, el suelo y los microorganismos mantienen los sistemas ecológicos mediante el aporte de componentes químicos y minerales resultado de la biodegradación. Desde este punto de vista es necesario estudiar las características particulares del suelo para determinar su grado de contaminación.

La evaluación o determinación de las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de un suelo contaminado contribuye al seguimiento del proceso de Biorremediación.

## 3. JUSTIFICACIÓN

Es importante investigar sobre el tema, por lo que representa el suelo en el ecosistema, y la importancia de este en los sistemas productivos, además mediante la valoración de un suelo es posible determinar la eficacia de los procesos de biorremediación. Podemos definir la toxicidad de un suelo como el efecto adverso de una matriz contaminante que puede tomar varias formas, y modificaciones en la calidad y producción del suelo. Es posible evaluar los niveles de toxicidad mediante bioensayos, que consisten en exponer organismos vivos a sustancias tóxicas a diferentes concentraciones y registrar los efectos sobre los mismos, en cada ensayo, se determina la concentración y el número de organismos afectados, de esta forma se pueden establecer varios parámetros:

CL50 (Concentración letal media). Concentración de tóxico que mata 50% de los organismos ensayados. CE50 (concentración efectiva media). Concentración de tóxico que produce 50% del efecto tomado como indicador de toxicidad. Concentración inhibitoria. Concentración de tóxico que inhibe un proceso biológico, tal como la reproducción en un determinado porcentaje.

La calidad y la salud de los suelos se miden a través de distintos indicadores que evalúan su funcionamiento (Doran et al., 1999)

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

**EVALUAR LA TOXICIDAD DEL SUELO DURANTE Y DESPUES DE UN PROCESO DE BIOREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS EN BASE A LA NORMATIVA VIGENTE EN ECUADOR, (DECRETO 1215- 2001) QUE ESTABLECE LA CONCENTRACIÓN DE HIDROCARBUROS EN EL SUELO**

### 4.2 Objetivos Especificos

- 1 ¿ Valorar la actividad enzimática en el suelo, para establecer el estado de las poblaciones microbianas y su relación con la biología del suelo, la producción de biomasa y la biodegradación de los contaminantes (Doran, 2002; Gianfreda y Riggiero, 2006)
- 2 ¿ Determinar la magnitud de la actividad de diferentes enzimas involucradas en los procesos
- 3 ¿ Evaluar el comportamiento enzimático de un suelo contaminado y bioremediado
- 4 ¿ Evaluar la toxicidad del suelo a través de bioensayos empleando semillas de vegetales
- 5 ¿ Determinar la eficacia de los procesos como los ciclos de nutrientes y los flujos de energía

## 5. ESTADO DEL ARTE

Este tipo de tecnologías están encaminadas a cumplir con criterios de limpieza o exigencias de la normativa ambiental en el país donde se generan, trabajos relacionados se reportan en diferentes países en base a decretos establecidos en cada uno de ellos.

En los bioensayos de toxicidad, se evalúan los efectos adversos de los contaminantes en el proceso de germinación y en el desarrollo de las plántulas, para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos, es importante destacar la influencia de compuestos tóxicos en el suelo, la toxicidad de hidrocarburos nos permite definir el criterio de limpieza o remediación de un suelo (McMillen et al 2001; Infante et al., 2010; Morales, 2010

Existen diferentes ensayos de toxicidad, los cuales emplean diferentes organismos de la cadena trófica que

van desde bacterias hasta plantas superiores (Bowers et al., 1997; Cheung et al., 1989 Dutka, 1989 en suelos contaminados por derrames de hidrocarburos, en los bioensayos se emplean semillas de diferente tipo. La toxicidad de un hidrocarburo es el resultado de una interacción compleja y variable entre las características propias de un crudo y del suelo (Tarache, 2011)

## 6. METODOLOGÍA

1. Establecer un sistema en microcosmos de 10kg. de suelo en cajas de madera de 30 x 40 y 25 CM. sujeto a un proceso de biorremediación de HAPs, mediante el uso de consorcios microbianos valorados en el proyecto anterior.

2. Establecer un sistema de bioensayos para valorar la toxicidad con semillas los efectos adversos de los contaminantes, se busca determinar la inhibición en la germinación y de la elongación de la radícula y del hipocotilo

3. Los bioensayos consisten en una serie de pruebas, con exposición a 14 días, en la que se expondrán semillas a varias diluciones de extractos del suelo problema, y posteriormente se mide la inhibición de la germinación y crecimiento temprano de plántulas, y la producción de biomasa a través de las concentraciones medias efectivas (CE50), estas representan las concentraciones de los extractos de suelo que ocasionan una inhibición del 50 % en cada una de estas respuestas, comparadas con la respuesta máxima observada en el control negativo. Estos análisis se desarrollan en una cámara de cultivo. Para el desarrollo de estas pruebas se considera el empleo de dos especies vegetales: trigo (*Triticum aestivum*) y lechuga *Lactuca sativa*. Los procedimientos de prueba se basan en el protocolo 208 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo.

4. Determinación de la actividad enzimática ureasa.- Fundamento del método, la ureasa es una exoenzima que cataliza la reacción de hidrólisis de la urea, el principal producto celular nitrogenado de la degradación de las proteínas y los ácidos nucleicos, el cual es más fácil de eliminar que otras formas de nitrógeno (como el amoníaco) porque es soluble en agua y menos tóxico (Science in School, 2008).

Los estudios realizados por Trasar-Cepeda et al. (2000) indican que existe sensibilidad a la contaminación por hidrocarburos y efluentes, así como la biomasa microbiana y el contenido de nitrógeno total. Esta técnica es útil para evaluar suelos contaminados con hidrocarburos, para suelos biorremediados, y también para medir la actividad enzimática en el ciclo del nitrógeno en suelos agrícolas y naturales

5. Determinación de la actividad enzimática de la lipasa.- Fundamento del método, son una subclase de esterasas que interviene en el catabolismo de las grasas y aceites, al romper y modificar los enlaces éster de los lípidos y sus derivados. Su reacción principal es la hidrólisis de acilglicéridos, es decir, la ruptura del triacilglicerol a diacilglicerol y a monoacilglicerol, ácidos grasos y glicerol. participan en reacciones de síntesis y transesterificación de acilglicéridos y fosfoglicéridos. Estas enzimas pueden tener actividad intracelular o extracelular. Su actividad óptima se encuentra a temperaturas cercanas a los 30 °C, pH neutro y en presencia de aireación (Sánchez-Ferrer, 1998). Además de la digestión de grasas, las lipasas en los microorganismos que se encargan de la reconstitución celular y del metabolismo lipoprotéico, funciones esenciales para su supervivencia y para el mantenimiento de su función ecológica como organismos descomponedores en los ciclos biogeoquímicos naturales. Sin embargo, estas enzimas también han mostrado su utilidad en procesos industriales y en la biorremediación de suelos contaminados. La medición de la actividad de la lipasa ha resultado útil para monitorear la biorremediación de suelos contraminados con hidrocarburos de petróleo, en particular con diésel (Margesin et al., 1999; Margesin et al., 2000b). El método que se utilizará en esta parte es el colorimétrico desarrollado por Margesin et al. (2002).

6. Determinación de la actividad enzimática de la deshidrogenasa.- Fundamento del método, Las enzimas deshidrogenasas pertenecen al grupo de las oxidoreductasas, es decir, a las enzimas que remueven electrones (oxidan) o añaden electrones (reducen) a varios sustratos (Ríos-Velázquez et al., 2008; Rodríguez-Zavala, 2006).

La principal actividad de las deshidrogenasas es eliminar átomos de hidrógeno de la molécula del sustrato y transferirlos a un cofactor o coenzima (como algunas vitaminas o los nucleótidos NAD, NADP, FAD y FMN) que es reducido al recibir dichos átomos. De esta manera el sustrato queda oxidado y normalmente aparece con un doble enlace entre el oxígeno y el carbono, en las posiciones en las que antes estaba presente un grupo hidroxilo (OH) (Ríos-Velázquez et al., 2008). La actividad de la deshidrogenasa ha sido utilizada como un indicador de la actividad microbiana del suelo (Barajas-Aceves, 2008) la actividad de la deshidrogenasa es mayor en suelos anaeróbicos o en inundados en comparación a los suelos incubados en condiciones aerobias (Makoi y Ndakidemi, 2008; Subhani et al., 2001). La medición de esta actividad comprende distintos sistemas de enzimas, las cuales intervienen en procesos de deshidrogenación, representados por la siguiente reacción (Paolini, 2003 La actividad de la deshidrogenasa es utilizada para monitorear los suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, y durante los procesos para su biorremediación.

7. Determinación de la actividad enzimática de la catalasa.- Fundamento del método.- durante los procesos biológicos (metabolismo) se generan especies químicas conocidas como radicales libres, los cuales se caracterizan por presentar un electrón desapareado y por ser muy reactivas. Entre estos radicales, las especies reactivas derivadas del oxígeno (EROS) resultan de gran interés debido a su estructura birradical y al gran número de procesos que las generan. La catalasa se relaciona con la actividad microbiana del suelo por ser una enzima intracelular presente en microorganismos aerobios y en la mayoría de los anaerobios facultativos.

Se han empleado muchos métodos para determinar la actividad de la catalasa, el método que se utilizará en el presente proyecto es el de Johnson y Temple (1964) descrito por García et al., (2003), que mide el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> residual, para lo cual se adiciona una cantidad determinada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al suelo incubando a 20 °C durante un tiempo determinado en el que actúa la enzima. Este ensayo es aplicable a suelo contaminado con hidrocarburos y suelo bioremediado.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ¿Adam, G., Duncan, H. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*. 120, 363-370.
- ¿Alef, K., Nannipieri, P. 1998. Enzyme activities: Catalase activity. En: Alef, K., Nannipieri, P. (editores). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*, Academic Press. Gran Bretaña.
- ¿Barajas-Aceves, M. 2008. Ensayos de metabolismo microbiano en suelo: actividad deshidrogenasa y tasa de mineralización de nitrógeno. En: Ramírez-Romero, P., Mendoza
- ¿Burns, R.G. 1982. Enzyme activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*. 14, 423-427.
- ¿Cantu, A. Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- ¿Casida, L.E. 1977. Microbial metabolic activity in soil as measured by dehydrogenase determinations. *Applied and Environmental Microbiology*. 34, 630-636.
- ¿Casida, L.E., Klein, D.A., Santoro, T. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*. 98, 371-376.
- ¿Ceron, R.L., Melgarejo, M.L. 2005. Enzimas del Suelo: Indicadores de Calidad y Salud. *Acta Biológica Colombiana*. 1, 5-18.
- ¿Cooper, A.B., Morgan, H.W. 1981. Improved fluorimetric method to assay for soil lipase activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 13, 307-331.
- ¿Díaz-Baez, M.C., Bulus-Rossini, G.D., Pica-Granados, Y. 2004. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. En: Castillo, G. (editora). *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. México.
- ¿Del Valle, G.C., 2008. Calidad fisiológica y efecto de la presencia de semillas verdes de soja (*Glycine max L*) en lotes destinados a siembra. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Córdoba. Argentina.
- ¿Doran, J.W., Jones, A.J., Arshad, M.A., Gilley, J.E. 1999. Determinants of soil quality and health. En: Rattan, L. (editor). *Soil quality and soil erosion*. CRC Press, Florida, EUA.
- ¿Doran, J.W. 2002. Soil health and global sustainability, translating science into practice. *Agriculture Ecosystems and Environment*. 88, 119-127.
- ¿Douglas, L.A., Bremner, J.M. 1970. Extraction and colorimetric determination of urea in soils. *Soil Science Society of American Proceedings*. 34, 859-862.
- ¿Fernández-Linares, L.C., Rojas-Avelizapa, N.G., Roldán-Carrillo, T.G., Ramírez-Islas, M.E., Zegarra-Martínez, H.G., Uribe-Hernández, R., Reyes-Ávila, R.J., Flores-Hernández, D., Arce-Ortega, J.M. 2006.
- ¿Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- ¿Moore, R.P. 1985. *Handbook on Tetrazolium Testing*. International Seed Testing Association.

## 8. RESULTADOS ESPERADOS

Se espera evaluar los niveles de toxicidad del suelo durante y después de un proceso de biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos mediante consorcios microbianos establecidos. Establecer los parámetros que intervienen en la biodegradabilidad, y en base a los resultados comparar con la normativa vigente en Ecuador, (decreto 1215- 2001) que establece la concentración de hidrocarburos en el suelo, en definitiva se espera hacer un análisis global de un proceso de biorremediación establecido en la primera parte de este proyecto: SELECCIÓN Y VALORACIÓN DE CONSORCIOS MICROBIANOS EN LA BIOREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS HAPs

## 9. TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA Y/O SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS DE INVESTIGACIÓN

**PREGRADO.**- La transferencia del conocimiento y tecnología es transferida, a los estudiantes de Biotecnología de las carreras Biotecnología de los Recursos naturales e Ingeniería Ambiental, se vincula directamente a un señor estudiante para el desarrollo de su trabajo de grado.

**SOCIEDAD.**- Se difundirá este tipo de tecnología mediante charlas dirigidas a estudiantes y personas vinculadas con la actividad minera y la explotación de recursos naturales. Este proyecto servirá como base para establecer un plan de contingencia Ambiental en la Central Termoeléctrica El Descanso ¿ Azuay Cuenca Ecuador

## 10. IMPACTOS DEL PROYECTO

**CIENTÍFICO.-** El proyecto contribuye al desarrollo y progreso de la biotecnología, y servirá como sustento de planes de mitigación ambiental y procesos de biorremediación de hidrocarburos. Contribuye al conocimiento preciso de los procesos que se llevan a cabo en tecnologías de este tipo.

**ECOLÓGICO.-** Se pretende establecer y diseñar procesos encaminados al buen manejo de desechos de petróleo en la Central termoeléctrica El Descanso, y se divulga el uso de tecnologías alternativas, para mantener un plan de contingencia.

La investigación está orientada a atenuar el riesgo ecológico, mejorar y controlar aspectos ambientales negativos y mejorar los procesos de biorremediación.

**EDUCATIVO.-** El proyecto beneficiará al proceso enseñanza-aprendizaje de los estudiantes de las Carreras Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales e Ingeniería Ambiental.

**TECNOLÓGICO.-** Se presenta una alternativa de control y biorremediación de matrices contaminantes, y su análisis con proyección a su mejoramiento tecnológico y aplicación.

Plan de valorización socio-económica de resultados (incluyendo las necesidades de protección)

En este sentido se contempla los resultados de índole tecnológica, de utilidad para empresas de explotación de recursos naturales, y los de interés social.

Desde el punto de vista social.- El proyecto incide directamente en la explotación de recursos naturales de forma racional con referencia al medio ambiente, contribuye a mejorar la calidad del ambiente en sectores de explotación (comunidades aledañas)

Contribuirá al mejoramiento de las condiciones técnicas en la explotación de recursos naturales en el Ecuador.

Punto de vista empresarial.- Las formulaciones de consorcios producto de esta investigación, son de utilidad empresarial y de aplicabilidad directa en empresas que se dedican a esta actividad

## 11. INFORMACIÓN DE COFINANCIADORES (en caso de que existieran)

