



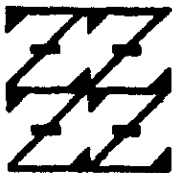
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

BIODEGRADACION DE LOS HIDROCARBUROS DEL PETROLEO PRESENTES EN UN SUELO CONTAMINADO MEDIANTE LA APLICACION DE UN AGENTE DE SUPERFICIE.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
NOE ALEJANDRO INCHAUSTEGUI ALDANA

U N A M
FEB
ZARAGOZA



LE ORDENAMOS QUE
DE NUESTRA OFICINA

DIRECTOR: M. EN C. BENJAMIN CHAVEZ GOMEZ.
ASESOR: BIOLOGA. MA. DE JESUS SANCHEZ COLIN.

MEXICO, D. F.

1998.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

259487



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado dentro de las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del Área de Normatividad y Sustentabilidad Ambiental, perteneciente a la Subdirección de Protección Ambiental del Instituto Mexicano del Petróleo.

AGRADECIMIENTOS.

A los coordinadores del Proyecto FIES: “Biorremediación de suelos contaminados con Hidrocarburos”, por el apoyo económico y académico brindado en la realización de este trabajo.

Al Instituto Mexicano del Petróleo, por todas las facilidades brindadas para el uso de sus instalaciones y equipo, así como a todas las personas que contribuyeron con la realización del mismo.

A todo el personal del Laboratorio de Remediación de suelos; del Laboratorio de Análisis Químicos y del Laboratorio de Espectrometrías del IMP, por la contribución realizada a este trabajo con las diversas determinaciones analíticas aquí incluidas.

Al M. en C. Benjamín Chávez Gómez con verdadera estimación por brindarme la oportunidad de incorporarme al área de Biotecnología, darme todo su apoyo para finalizar este trabajo e impulsarme para continuar mi desarrollo académico.

Al Dr. Isaías H. Salgado Ugarte por la valiosa asesoría en el análisis estadístico de los resultados de este trabajo.

A la Biól. Ma. de Jesús Sánchez Colín, por su permanente disposición a asesorar y enriquecer este trabajo con sus acertados comentarios e intervenciones.

Al M. en C. Miguel Castillo González, a la Q. Miki Otani Imura y al M. en C. Gerardo Cruz Flores, por sus comentarios y aportaciones a este trabajo.

DEDICATORIAS.

A mi Madre:

Ma. Isabel Aldana Ramírez, por darme no solo la vida, sino también el más grande ejemplo de entrega, tenacidad y carácter que he recibido. Te agradeceré sinceramente todos los días de mi vida.

A Fernanda:

Porque con su presencia pude acercarme a conocer la más bella y grande responsabilidad que puede existir: la de Padre. Siempre tendrás mi corazón.

A mis hermanos:

Mónica y Eduardo, que han compartido su vida conmigo y de quienes he aprendido cosas que nadie más podría enseñarme y por los cuales siento un profundo amor. Nunca nos separemos.

A mis abuelos:

Quienes han sido un apoyo invaluable para mi Madre y quienes han compartido conmigo todas las cosas que he logrado, considerándolas como triunfos.

A Maribel:

Por ser partícipe en este trabajo, por compartir una estrecha amistad, y también un sentimiento único que durará por siempre. Te amo.

A mis amigos:

Por compartir conmigo muchos gratos momentos, y regalarme parte de sus mejores sentimientos.

INDICE.

Resumen	1.
1. Introducción	3.
1.1. Degradación de contaminantes	4.
1.2. Microorganismos degradadores	7.
1.3. Composición de los desechos de perforación	8.
1.4. Composición del Petróleo	9.
1.5. Vías metabólicas de degradación de Hidrocarburos	10.
1.6. Disponibilidad de los Hidrocarburos	15.
1.7. Tipos de surfactantes	16.
1.8. Características de los Surfactantes	17.
2. Planteamiento del Problema	20.
3. Hipótesis	22.
4. Objetivos	23.
5. Desarrollo Experimental	24.
5.1. Toma de muestra, tratamiento y almacenamiento	24.
5.2. Caracterización del suelo contaminado	25.
5.3 Extracción y caracterización de los contaminantes presentes en el suelo	26.
5.4. Cinética de degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo	26.
5.5. Selección del agente de superficie	28.
5.6. Cinética de biodegradación del contaminante en presencia del surfactante	29.
5.7. Análisis Estadístico	30.
6. Resultados y análisis de resultados	32.
7. Conclusiones	51.
8. Sugerencias	52.
9. Bibliografía	53.
10. Apéndice	56.
10.1 Apéndice 1	56.
10.2. Apéndice 2	57.
10.3. Apéndice 3	58.

RESUMEN.

El presente trabajo consiste en determinar el mejor agente de superficie químico (surfactante), y su concentración, que provocan un aumento de la degradación microbiana (biodegradación) a través del proceso de bioestimulación de la flora autóctona, de los desechos de perforación presentes en muestras de suelo, derivados de los procesos de extracción del petróleo en el Estado de Tabasco.

Tabasco es uno de los Estados de la República Mexicana donde se realiza una intensa actividad petrolera, la que genera una enorme cantidad de desechos de perforación altamente contaminantes que en el pasado fueron vertidos en el ambiente, provocando el deterioro de los ecosistemas terrestres y acuáticos.

La elección del mejor surfactante fue realizada en función del resultado de las siguientes pruebas: Concentración Micelar Crítica (CMC), Lavado de Suelo, Actividad Emulsificante y Toxicidad del mismo para los microorganismos del suelo; siendo ensayados los siguientes agentes de carácter no-iónico: Biotrix (detergente comercial), Tergitol NP-10, Tritón X-100 y Tween 80.

Las muestras de suelo contaminadas con desechos de perforación fueron tratadas con diferentes concentraciones de Tergitol NP-10, considerado como el mejor agente de superficie, y las concentraciones ensayadas fueron: 0.1; 0.25; 0.5; 0.75 y 1.0% p/v, además de un testigo envenenado con azida de sodio y un testigo sin agente de superficie. El proceso de biodegradación fue analizado a través del registro de la concentración residual de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH's), mediante la técnica de Espectrofotometría de Infrarrojo.

Asimismo, se determinaron las características físicas y químicas del suelo, mediante diversos análisis, y la composición de las fracciones constituyentes de los desechos de perforación, mediante el método ASTM 4221.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el proceso de biodegradación a través del efecto de bioestimulación de la flora autóctona, es suficiente para lograr la degradación de los desechos de perforación presentes en la muestra de suelo contaminado.

Con base en las pruebas realizadas a los agentes de superficie, se considera al Tergitol NP-10 como el mejor agente de superficie, al poseer la mayor actividad emulsificante, provocar la mayor desorción del contaminante y además no provoca un efecto adverso sobre la flora autóctona del suelo.

Por último, los resultados del análisis de varianza realizado a los valores de TPH's residuales muestran que existe una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, y que la concentración de 0.5% (p/v) de Tergitol NP-10 tiene el mejor efecto estimulante sobre la biodegradación de los contaminantes, al incrementar el porcentaje de degradación de éstos desde aproximadamente 30% sin emplear un agente de superficie, hasta un 63.61% al emplear el mismo.

1. INTRODUCCION

La producción y subsecuente almacenamiento o transporte de materiales peligrosos es parte de nuestra economía. Consecuentemente, hay una enorme variedad de compuestos químicos orgánicos naturales y sintéticos (xenobióticos), los cuales entran al ambiente por vía de pérdidas o derrames de pipas y tanques, fugas en ductos y tuberías, depósito de emisiones atmosféricas, almacenamiento y disposición final de materiales no tratados y desechos o residuos no deseados (por ejemplo, lagunas de oxidación, áreas con lodos biológicos, etc.), uso de material contaminado, aplicación de lodos industriales al suelo, adición de pesticidas, entre otros. En muchas instancias, estos problemas involucran la contaminación de suelos y/o depósitos de agua subterránea y pueden además incluir también la contaminación de sedimentos dentro, o cercanos a cuerpos de agua (ríos, lagos, etc.) (Lees y Senior, 1995).

El exceso en todas estas actividades provoca que se sobrepase la capacidad de autodepuración natural de los ecosistemas, provocando la acumulación de contaminantes, y en algunas ocasiones alcanzando niveles críticos. La fórmula para minimizar el impacto sobre el ambiente, reside en el control de las entradas de contaminantes; así como en acelerar la degradación de los contaminantes ya presentes (Lui y Sulfitá, 1993).

Una de las actividades a nivel mundial que actualmente posee un gran auge y que se realiza a gran escala, es la extracción y obtención de petróleo crudo para la utilización de los productos resultantes de su refinamiento. Sin embargo, las operaciones de extracción, almacenamiento y transporte del petróleo crudo causan un impacto negativo sobre los ecosistemas al ser vertidos a éstos, grandes cantidades de hidrocarburos que provocan alteraciones tanto al medio biótico como al abiótico.

Los grandes derrames accidentales de petróleo (durante la guerra del Golfo Pérsico en 1991; del buque-tanque Exxon Valdez en Prince William Sound, Alaska; así como derrames en Texas, Rhode Island y Delaware Bay, U.S.A. en 1989) han provocado que la

atención de la comunidad científica mundial haya sido dramáticamente enfocada hacia los problemas de la contaminación por petróleo (Bouwer *et al.*, 1992).

El petróleo crudo es una complicada mezcla de componentes químicos, formada por hidrocarburos unidos a compuestos orgánicos de nitrógeno, azufre y oxígeno. El contenido de hidrocarburos puede variar desde 95-98% hasta valores bajos de 50% para petróleos crudos pesados. Los hidrocarburos constituyentes del petróleo pueden ser divididos en cuatro clases: saturados, aromáticos, asfaltenos, y resinas (Kokub *et al.*, 1990).

Los procesos de extracción del petróleo han producido históricamente grandes cantidades de lodos de hidrocarburos y fluidos de perforación como productos de desecho; se estima que en promedio un pozo genera más de 1,000 toneladas de cortes de perforación (León *et al.*, 1993).

Como una práctica común del pasado, los desechos de perforación fueron almacenados en fosos o depósitos abiertos. Estos sitios de desecho y los ecosistemas donde éstos se encuentran, requieren ahora de recuperación para hacer frente a las regulaciones ambientales actuales.

1.1. DEGRADACION DE CONTAMINANTES.

Una variedad de técnicas de remediación son posibles en el tratamiento de los desechos del petróleo. Los tratamientos son considerados como: físicos, químicos, térmicos y biológicos (Cartwright, 1991). Los métodos físicos tales como extracción, simplemente transfieren los desechos de un medio a otro, sin ofrecer una solución permanente al problema. El tratamiento químico está generalmente basado en explotar las diferentes propiedades químicas del suelo y del contaminante, tales como la acidez y el potencial de precipitación. Estos métodos pueden dejar subproductos tóxicos o peligrosos. La estabilización química incrementa el volumen del material tóxico, al diluirlo en un material inerte, pero los contaminantes no son eliminados sino simplemente atrapados e inmovilizados dentro de una matriz. Las técnicas de tratamiento como incineración, son

efectivas pero usualmente costosas. Finalmente, los tratamientos biológicos parecen promisorios, pero presentan problemas únicos de ellos mismos y no están aún bien establecidos (Cartwright, 1991).

La biodegradación es definida como el rompimiento de compuestos orgánicos por los microorganismos. El grado de alteración varía y es típicamente definido como mineralización o biotransformación. La mineralización es el rompimiento completo de las moléculas orgánicas en sustancias inorgánicas tales como el dióxido de carbono y residuales como el agua. La biotransformación es la degradación parcial de un compuesto inicial a uno derivado, por intervención de algún organismo. El compuesto derivado puede ser más o menos tóxico que el material original (Prince y Sambasivam, 1993).

El tratamiento biológico es por tanto una tecnología viable y económica para tratar los desechos del petróleo, sus posibles beneficios y ventajas son extensas e incluyen ahorros potenciales de tiempo y recursos económicos debido a diversos factores. Provee además, la habilidad de tratar *in situ* los contaminantes, reduciendo los costos por manipulación o transporte que pudieran necesitarse con otros tratamientos.

La biodegradación de los desechos también disfruta de una aceptación pública y puede ser acoplada con otras técnicas de tratamiento para resolver problemas ambientales.

Un proceso de tratamiento biológico efectivo, depende de una gama de condiciones ambientales. Los microorganismos apropiados capaces de degradar el compuesto deseado deben ser adicionados o estar presentes. Mientras que los microorganismos que existen naturalmente han sido predominantemente usados en investigaciones recientes, también ha sido reportado el uso de microorganismos manipulados genéticamente. Los microorganismos con capacidades naturales, sin embargo, son preferidos para la biorremediación debido a las dificultades regulatorias en materia de legislación ambiental para introducir al ambiente organismos manipulados genéticamente (Lees, 1995).

Deben estar presentes las condiciones necesarias para el crecimiento microbiano, como: una fuente de energía, nutrimentos apropiados, pH y temperatura. Los requerimientos nutricionales de los microorganismos son uno de los principales factores que afectan a la biodegradación. Muchos de los constituyentes de los desechos petroleros son biodegradables si se proveen las condiciones apropiadas, y ésta adición de nutrientes al medio es considerada como una Bioestimulación de las poblaciones de microorganismos existentes. Los desechos de perforación, sin embargo, han probado ser resistentes bajo condiciones naturales de campo, y su bajo porcentaje de biodegradación es debida principalmente a los bajos niveles de nutrimentos (Leahy, 1990).

Se requiere frecuentemente la presencia de macronutrimentos (N, P, S, K, Mg y Ca), micronutrimentos y nutrientes traza (K, Mg, Ca, Fe, Na, Co, Zn, Mo, Cu y Mn) (Prince y Sambasivam, 1993).

Las sustancias orgánicas en los desechos, generalmente suplen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento microbiano, pero en algunos casos, fuentes adicionales de carbono son agregadas como co-metabolitos.

El co-metabolismo se refiere a la degradación de un compuesto sólo en presencia de otro material orgánico, el cual no funciona como la fuente principal de energía. Esto acarrea ciertas implicaciones para el tratamiento biológico y la aplicabilidad de los estudios de degradación desarrollados usando una fuente de carbono sencilla y cultivos microbianos puros. Debido al potencial para el efecto co-metabólico o sinérgico de los cultivos mixtos, los estudios de este tipo pueden seriamente subestimar la viabilidad potencial de la biorremediación (Prince, 1993).

Una amplia diversidad de otros factores ambientales también influyen en la degradación biológica, donde el oxígeno es el factor metabólico más crítico. Incrementando la oxigenación del sistema, se incrementa significativamente el crecimiento de microorganismos y la degradación de los hidrocarburos. Como resultado, una parte importante del tratamiento biológico de suelos contaminados es el suministro de oxígeno. La biorremediación puede ser inhibida si el residuo es de naturaleza tóxica. Así, altas

concentraciones de metales pesados, compuestos inorgánicos tóxicos y/o sales inorgánicas pueden inhibir el crecimiento microbiano. El tratamiento óptimo usualmente ocurre a pH neutro y a temperaturas entre 20 y 28 °C. Mientras que la mayoría de los estudios han sido realizados en ambientes aeróbicos, también han sido reportados los estudios de biodegradación en condiciones anaerobias (Cabridenc, 1985).

1.2. MICROORGANISMOS DEGRADADORES.

La biorremediación o biorestauración es el proceso mediante el cual se utilizan microorganismos naturales, aclimatados o manipulados genéticamente, para aumentar la calidad ambiental, aprovechando su habilidad para degradar o atacar compuestos (incluyendo tóxicos) en los sitios contaminados (Lees y Senior, 1995).

Los microorganismos son considerados como los mejores agentes para destruir compuestos orgánicos presentes en petróleos crudos (Atlas, 1981), debido a que el intervalo de compuestos tratables por biorremediación es inmenso. Además de los desechos municipales y residuos del proceso del tratamiento de aguas, los microorganismos pueden degradar pesticidas, compuestos químicos industriales, combustibles para aeronaves, gasolina, diesel y muchos otros componentes y derivados del petróleo. Algunos compuestos que en el pasado fueron considerados como no biodegradables, tales como disolventes clorados, bifenilos policlorados (PCB's), clorofluorocarbonos y otros disolventes orgánicos sintéticos estables, están siendo degradados en el laboratorio por cepas selectas o asociaciones de microorganismos. Parece ser que ahora, dadas las condiciones existentes, la mayoría de los compuestos, naturales o sintetizados por el hombre, pueden ser catabolizados por microorganismos, a través de la utilización directa o por co-oxidación (Lees y Senior, 1995).

Los hidrocarburos en el ambiente son degradados principalmente por bacterias y hongos. Aunque desapercibidos en los ecosistemas terrestres y acuáticos, la fracción total de la comunidad heterotrófica representada por bacterias y hongos que utilizan hidrocarburos es altamente variable, con variaciones reportadas de 6 a 82% para hongos del suelo; 0.13 a

50% para bacterias del suelo, y 0.003 al 100% para bacterias marinas. Los organismos individuales pueden metabolizar sólo un intervalo limitado de hidrocarburos, así que conjunciones o poblaciones mixtas (consorcios microbianos) con amplias capacidades enzimáticas son usualmente necesarias para degradar mezclas complejas de hidrocarburos tales como petróleo crudo en suelos y ambientes acuáticos (Leahy, 1990). El uso y adición de consorcios microbianos no existentes naturalmente en estos sitios contaminados (alóctonos), es considerado como una Bioaugmentación de la microbiota ya existente.

La capacidad para degradar y/o utilizar hidrocarburos como sustratos es exhibida por una amplia variedad de géneros de bacterias y hongos. Basados en el número de reportes publicados, las bacterias degradadoras de hidrocarburos más importantes en los ambientes marinos y en suelos son: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* y *Pseudomonas* spp (Leahy, 1990).

En suelos, los microorganismos constituyen microcolonias con agregados fabricados de materia mineral (cuarzo, arena, etc.) y materia orgánica (ácidos húmicos), y son siempre abundantes, pero su actividad puede variar considerablemente con las condiciones ambientales, particularmente con la temperatura, humedad y cantidad de oxígeno disponible (Cabridenc, 1985).

1.3. COMPOSICION DE LOS DESECHOS DE PERFORACION.

Los fluidos de perforación son productos que se utilizan durante la perforación de un pozo petrolero, sus principales funciones son la de proporcionar estabilidad térmica al barreno, lubricar y arrastrar a la superficie el material resultante de la excavación. Este material resultante, junto con los fluidos de perforación, conforman los desechos de perforación, los cuales incluyen dispersantes construidos a base de diesel, asfalto, metales pesados, arenas, y petróleo crudo principalmente. La composición química incluye una variedad de compuestos tales como aromáticos, poliaromáticos e hidrocarburos ramificados. Además, existe un gran número de compuestos inorgánicos y metales presentes (Prince y Sambasivam, 1993; León *et al.*, 1993).

1.4. COMPOSICION DEL PETROLEO.

El petróleo es una mezcla extremadamente compleja de hidrocarburos. De los cientos de componentes individuales, pueden ser reconocidas diversas clases basadas en la afinidad de estructuras. La mezcla de petróleo puede ser fraccionada por cromatografía en sílica gel, y Leahy (1990) reconoce cuatro clases: una fracción saturada o alifática, una fracción aromática, una fracción asfáltica o polar (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres, y porfirinas), y una fracción resinosa (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos y amidas).

Huesemann (1994) separa al petróleo en dos componentes principales: una fracción hidrocarbonada y una fracción polar. La fracción polar o NSO consiste en compuestos que contienen en su estructura molecular nitrógeno (N), azufre (S), u oxígeno (O) en adición al carbono (C) e hidrógeno (H). Los compuestos polares son clasificados en grandes categorías como asfaltenos, resinas, etc., dependiendo de los procedimientos analíticos utilizados para su separación. La fracción hidrocarbonada (HC) consiste de compuestos saturados y aromáticos. Los compuestos aromáticos contienen uno o mas anillos en su estructura y pueden ser clasificados como monoaromáticos, y aromáticos polinucleares (APN's) o poliaromáticos (Vo-Dinh, 1989). Los compuestos saturados consisten de alcanos (parafinas) o estructuras cíclicas saturadas (naftenos) con variación en el número de los anillos saturados y cadenas laterales que poseen. Los alcanos pueden poseer cadenas lineales de cadenas ramificadas. Las moléculas de aromáticos con frecuencia contienen subestructuras parafínicas o nafténicas, y estos productos refinados también pueden contener moléculas insaturadas (alquenos) (ver FIGURA 1).

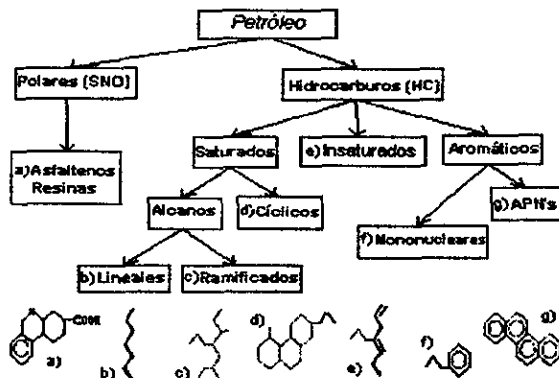


FIGURA 1. Compuestos constituyentes del petróleo.

1.5. VIAS METABOLICAS DE DEGRADACION DE LOS HIDROCARBUROS DEL PETROLEO.

Los hidrocarburos difieren en su susceptibilidad al ataque microbiano, y en el pasado, han sido arreglados en el siguiente orden de decreciente susceptibilidad: *n*-alcanos > alcanos ramificados > compuestos aromáticos de bajo peso molecular > cicloalcanos. Las velocidades de degradación han mostrado ser mayores para los saturados, seguidas de los aromáticos ligeros, aromáticos de alto peso molecular, y por último los compuestos polares que exhiben velocidades de degradación extremadamente bajas (Leahy 1990).

Debido a que la energía liberada de la respiración aeróbica es mayor que la respiración anaeróbica la cual utiliza sulfatos, nitratos, etc. como aceptor de electrones para el proceso oxidativo, y mayor que la fermentación anaeróbica que utiliza compuestos orgánicos como aceptor de electrones, en el proceso de respiración aeróbica se observa la mayor velocidad de degradación de los hidrocarburos del petróleo. La respiración aeróbica utiliza oxígeno molecular para oxidar finalmente al carbono orgánico, que es degradado aeróbicamente por un mecanismo oxidativo que sucede de la siguiente manera. La oxidación es mediada por enzimas, que son catalizadores biológicos que facilitan las reacciones de oxidación, al disminuir la energía de activación requerida para la reacción química,

provocando con ello un incremento en la velocidad de reacción. La oxidación de estos compuestos puede ocurrir espontáneamente en la ausencia de enzimas. Sin embargo, sin su presencia, la reacción puede tomar meses o años para realizarse (Atlas, 1991).

El proceso oxidativo es provechoso para las bacterias aeróbicas desde dos puntos de vista: utilización del carbono y obtención de energía. El carbono derivado de la oxidación puede ser usado para el anabolismo o catabolismo. El anabolismo se refiere al proceso mediante el cual el carbono orgánico es usado para propósitos biosintéticos (como C estructural). El catabolismo se refiere a la posterior oxidación del carbono orgánico a CO_2 y agua, durante lo cual se genera energía. Debe resaltarse que este es un proceso dinámico más que estático, y ambos están operando en cualquier tiempo dado. La fracción relativa de carbono que se emplea en cada proceso dependerá de los requerimientos de energía en el momento, pero generalmente el 50% del carbón metabolizado es convertido a biomasa (C estructural) mientras que el otro 50% es convertido a CO_2 . La suma de todos los procesos celulares oxidativos para el carbono orgánico son referidos como respiración celular. La energía derivada de la respiración es usada para dirigir el anabolismo y para el mantenimiento de energía. La gran cantidad de energía (como ATP) derivada de la respiración aeróbica impulsa la reacción, manipulando las concentraciones de compuestos intermediarios (manteniéndolos en concentraciones extremadamente bajas), y de esta forma facilita la degradación rápida del carbono orgánico (Bartha y Atlas, 1987).

Como ya antes se dijo, los hidrocarburos dentro de la fracción saturada incluyen los *n*-alcanos, alcanos ramificados y cicloalcanos, y debido que los *n*-alcanos están considerados como los componentes más fácilmente degradables en una mezcla de petróleo, su biodegradación normalmente procede como una oxidación por una enzima oxigenasa, la cual inserta un oxígeno molecular en la cadena carbonada (ver FIGURA 2). Esto es considerado como una oxidación monoterminal, e involucra la oxidación del alcano para formar un alcohol primario. Este alcohol es entonces oxidado formando un aldehído por una alcoholdehidrogenasa, y este aldehído es posteriormente oxidado a un ácido carboxílico (graso) por una enzima aldehíodeshidrogenasa. El ácido graso formado puede así incorporarse como biomasa celular, o ser degradado posteriormente a través de una β -

oxidación con la subsecuente formación de ácidos grasos de unidades cortas de dos carbonos y acetil coenzima A, con la eventual liberación de CO_2 (Bartha y Atlas, 1987). Los ácidos grasos, los que algunos son tóxicos, se ha encontrado que se acumulan durante la degradación de estos hidrocarburos. La oxidación subterminal ocurre con frecuencia, con la formación de un alcohol secundario y una cetona subsecuente, pero esto no parece ser la vía metabólica primaria utilizada por los microorganismos que utilizan *n*-alcanos (Atlas, 1981).

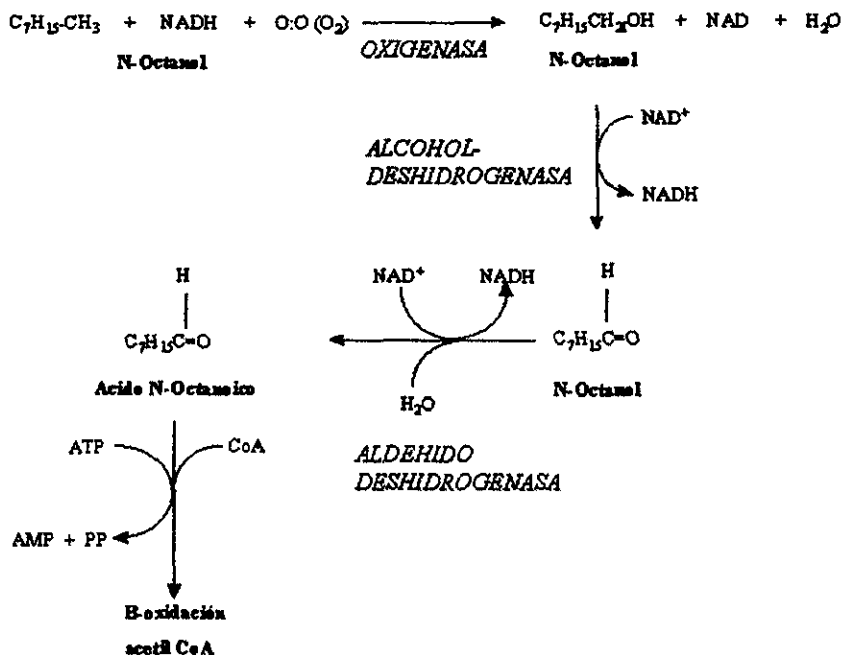


FIGURA 2. Etapas en la oxidación de un hidrocarburo alifático catalizada por una monooxigenasa.

Los alcanos isoprenoides altamente ramificados, como pristano, se ha encontrado que tienen oxidación omega (ω), con la formación de ácidos dicarboxílicos como la vía

degradativa principal. Los metilos ramificados generalmente incrementan la resistencia de los hidrocarburos al ataque microbiano, sobre todo en la posición beta donde bloquean la β -oxidación, requiriendo una estrategia adicional, como la α -oxidación, la ω -oxidación o la remoción del grupo β -alquilo (Atlas, 1981).

Los cicloalcanos son particularmente resistentes al ataque microbiano. Los compuestos alicíclicos complejos, tales como los hofanos (compuestos tripentacíclicos), están entre los componentes más persistentes de los derrames de petróleo en el ambiente. Existen diversos reportes de oxidación directa y degradación co-oxidativa de cicloalcanos sustituidos y no sustituidos. Se ha reportado que varios cicloalcanos no sustituidos, incluyendo cicloalcanos condensados, son substratos para la co-oxidación con formación de una cetona o un alcohol. Una vez oxigenados, la degradación de estos compuestos puede proseguir con la división de anillos. La degradación de cicloalcanos sustituidos al parecer ocurre con más facilidad que la degradación de las formas no sustituidas, particularmente si existe un sustituyente *n*-alcano con longitud de cadena adecuada. En tales casos, el ataque microbiano normalmente ocurre primero en la porción sustituida, liberando un producto intermedio de ácido carboxílico ciclohexano, que es un compuesto relacionado. Una vía novedosa para la degradación de ácidos carboxílicos ciclohexanos involucra la formación de un compuesto aromático intermediario, seguido del rompimiento del anillo de la estructura aromática (Atlas, 1981).

La degradación bacteriana de compuestos aromáticos normalmente involucra la formación de un diol seguido por rompimiento y formación de un diácido como el ácido *cis,cis*-Mucónico. Estos compuestos aromáticos pueden ser divididos en dos clases para los propósitos de degradación: aquellos que son degradados a catecol como intermediario metabólico clave, y aquellos que son degradados a protocatecuato como intermediario clave. Los compuestos aromáticos altamente sustituidos pertenecen a ésta última categoría. El catecol es eventualmente metabolizado a acetaldehído y piruvato vía *meta*, o a succinato y Acetil CoA por vía *orto*. El protocatecuato es metabolizado a piruvato y succinato/Acetil CoA por las vías metabólicas *meta* y *orto* respectivamente. En cualquier caso, todos estos

compuestos son intermediarios metabólicos celulares, y son rápidamente convertidos a biomasa celular y CO₂ (Bartha y Atlas, 1987) (ver FIGURA 3).

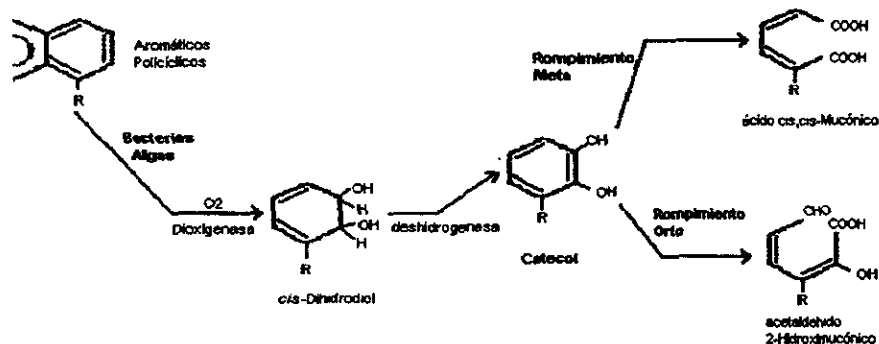


FIGURA 3. Mecanismo de transformación de las moléculas de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

Debe hacerse notar que estas vías de degradación de los hidrocarburos aromáticos, al igual que aquellas para hidrocarburos alifáticos, se realizan con una rápida velocidad. Frecuentemente, en sistemas sólidos los únicos compuestos presentes en cantidades suficientes para poder ser medidas son los productos iniciales y finales. Los compuestos intermediarios son metabolizados demasiado rápido para ser medidos (Bartha y Atlas, 1987).

Los hidrocarburos aromáticos ligeros están sujetos a evaporación y al ataque microbiano en el estado disuelto. El ataque enzimático inicial puede ser en el sustituyente alquilo o, alternativamente, directamente en el anillo. Las estructuras aromáticas condensadas están sujetas a la degradación microbiana por una vía metabólica similar a las estructuras monocíclicas; pero los hidrocarburos de anillos aromáticos condensados, sin embargo, son relativamente resistentes al ataque enzimático. Las estructuras con cuatro o más anillos condensados han mostrado ser atacadas en algunos casos, por co-oxidación o como resultado de comensalismo (Atlas, 1981).

Las vías metabólicas para la degradación de componentes asfálticos del petróleo son probablemente las menos comprendidas, debido a que los asfaltenos tienen estructuras complejas difíciles de analizar con metodología química corriente. La degradación de varios componentes que contienen sulfuros ha sido examinada, pero no ha logrado establecerse ninguna vía degradativa, comparable a las vías metabólicas establecidas para hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Los avances en la determinación de estas vías degradativas es dependiente de la innovación de la metodología analítica. La elucidación del destino bioquímico de los componentes asfálticos del petróleo es uno de los principales retos para la futura investigación de la biodegradación del petróleo (Atlas, 1981).

1.6. DISPONIBILIDAD DE LOS HIDROCARBUROS.

Los contaminantes usualmente sólo son degradados cuando están disueltos en una solución acuosa o por lo menos en contacto directo con el agua. La accesibilidad es de particular interés al referirse a los hidrocarburos del petróleo, que tienen bajas solubilidades acuosas. Debido al medio físico del suelo, éstos tienden a adsorberse o fraccionarse en la matriz de suelo para formar fases orgánicas separadas en los espacios de los poros. Debido a la persistencia y adsorción de muchos aromáticos y del hecho de que los compuestos no adsorbidos son con frecuencia fácilmente biodegradados, es plausible que la adsorción resulte en una protección de aquellos químicos al ataque microbiano (Aronstein *et al.*, 1991).

Por tanto, para incrementar la biodegradación de estos compuestos, es necesario acelerar su velocidad de desorción y/o solubilización. Tai y Maier (1992) encontraron que la desorción o solubilización puede ser acelerada con la adición de surfactantes. Ellos notaron el potencial para incrementar la solubilización de un compuesto escasamente soluble a través de la adición de un surfactante, al observar que la adición de éste aumentaba la velocidad de degradación de hidrocarburos del petróleo. Dichos autores realizaron sus experimentos de biodegradación usando un aparato para medir Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), y encontraron un incremento en la utilización de oxígeno así como un incremento de la velocidad de degradación de los hidrocarburos del petróleo al adicionar el surfactante.

Como la solubilización es una función del área de superficie disponible y del coeficiente de transferencia de masas, la adición de un surfactante resulta en el incremento de ambos factores (Sundaram *et al.*, 1994).

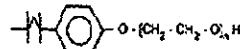
El uso de surfactantes en los esfuerzos para mejorar la biorremediación de ambientes contaminados ha logrado un considerable interés en años recientes. Las investigaciones actuales han reportado mejoramientos al igual que inhibiciones en la biodegradación de compuestos orgánicos en presencia de surfactantes. Muchas bacterias bajo condiciones adecuadas, pueden producir biosurfactantes y bioemulsificantes para ayudarse en su ataque a compuestos específicos. Los surfactantes comerciales pueden también servir para incrementar el transporte de hidrocarburos inmiscibles dentro de una solución, pero en ciertas ocasiones provocan efectos inhibitorios para los microorganismos. Los mecanismos que provocan un aumento de la degradación debida a surfactantes y al mismo tiempo una inhibición microbiana, no son bien comprendidos todavía.

Algunas explicaciones han sido ideadas o sugeridas para explicar los efectos inhibitorios del surfactante en los procesos biológicos, e incluyen su toxicidad para los organismos probados, la preferencia del surfactante como un sustrato para crecer, la prevención del ataque celular en una fase orgánica líquida y el secuestro del soluto dentro de las micelas (Mihelic *et al.*, 1995).

1.7. TIPOS DE SURFACTANTES.

Los surfactantes son moléculas anfifáticas que consisten de un grupo hidrofílico polar que actúa como “cabeza”, y un grupo hidrofóbico no polar que actúa como “cola” (grupo terminal) (ver FIGURA 4). La palabra surfactante es una contracción de “SURface ACTIVE AgeNT” y, como el término sugiere, el surfactante tiende a migrar y concentrarse en la superficie e interfase y reduce los niveles de tensión superficial e interfacial. Los surfactantes pueden ser clasificados por su carga iónica asociada a su fracción polar en: no-iónicos, aniónicos, catiónicos y anfotéricos (Aboul-Kasim y Simoneit, 1993).

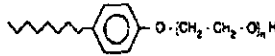
Eteres Alquilfenoxisiloxanos

(i) $C_{18}PE_{10}$ (Triton X-100) $n = 9.5$

625

0.24

140

(ii) $C_{12}PE_{10}$ (Tergitol NP-10) $n = 10.5$

582

0.054-0.16

-100

FIGURA 4. Estructura química de los surfactantes no-iónicos Tergitol NP-10 y Tritón X-100.

Los estudios con surfactantes sintéticos generalmente utilizan surfactantes no-iónicos debido a que se sabe que las bacterias gram negativas son mucho más resistentes a éstos, comparados con los surfactantes iónicos. Esto es resultado de la carga neta exhibida por las bacterias gram positivas y gram negativas (Mihelcic *et al.*, 1995). Además, los surfactantes no-iónicos interactúan menos con el suelo (Augure *et al.*, 1995).

1.8. CARACTERISTICAS DE LOS SURFACTANTES.

La característica principal de los surfactantes es su capacidad para formar agregados llamados micelas (ver FIGURA 5).

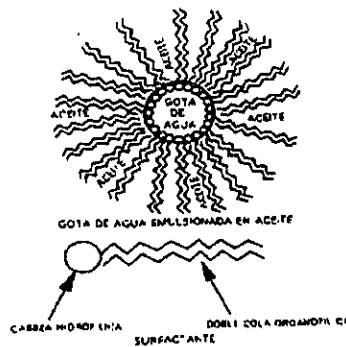


FIGURA 5. Micela. El aceite forma la fase continua y el agua la fase dispersa, distribuida en finísimas gotas rodadas de aceite, de tal manera que la mezcla permanece estable.

Cuando se adiciona al agua, una molécula de surfactante puede disolverse como un monómero, adsorberse en una interfase con su extremo terminal hidrofóbico lejos del agua, o agregarse con otras moléculas de surfactante (Sundaram *et al.*, 1994). La formación de estos agregados o micelas, ocurre cuando la Concentración Micelar Crítica (CMC) es excedida. Las micelas tienen un arreglo de típicamente 10 a 200 moléculas del surfactante (Volkering *et al.*, 1995), con diámetros de 2-4 μm (Bury y Miller, 1993) y que están formadas por los grupos terminales hidrofóbicos unidos entre sí para crear una pseudofase de hidrocarburos termodinámicamente favorable, que posee un exterior hidrofílico. Por debajo de la CMC, los surfactantes en solución existen sólo como moléculas individuales o monómeros. Por encima de la CMC una concentración constante de monómeros se mantiene en equilibrio con las micelas (West y Harwall, 1992). La formación de micelas permite el fraccionamiento de los hidrocarburos dentro de la pseudofase hidrofóbica del centro de la micela. Este fenómeno puede aumentar grandemente la concentración total de un compuesto en solución por encima de su límite de solubilidad y esto es referido como solubilización. Las micelas actúan entonces como transportadores de los contaminantes orgánicos, dentro de la fase acuosa (Allred y Brown, 1994). La naturaleza anfipática de los surfactantes también le otorga la propiedad de acumularse en la superficie del agua o en la interfase (p.e. agua:aceite) lo que resulta en una reducción de las tensiones superficial e interfacial (West y Harwall, 1992).

La CMC es comúnmente determinada por la interpretación de un gráfico de tensión superficial contra el logaritmo de la concentración del surfactante. Con un incremento en la concentración del surfactante, se logra una reducción de la tensión superficial mientras la CMC es sobrepasada, después de lo cual, sólo se observan cambios relativamente pequeños en la tensión superficial. La precisión de los valores de la CMC puede estar limitada por variaciones en la composición del surfactante (variaciones de longitud de los grupos terminales HC); esto es, los isómeros de surfactantes más hidrofóbicos pueden formar micelas a concentraciones muy por debajo que los otros componentes en la mezcla. Además, el valor de la CMC puede cambiar significativamente con cambios en la temperatura o con la adición de otros compuestos químicos como electrolitos e hidrocarburos (Mukerjee y Mysels, 1971).

Otra característica común de los surfactantes es su capacidad, bajo ciertas condiciones, de aumentar la formación de emulsiones (suspensiones de finas gotas de un líquido en otro) entre dos líquidos inmiscibles (West y Harwall, 1992). En algunos casos, un surfactante puede causar una situación extrema en la tensión superficial que resulta en una emulsificación espontánea (West y Harwall, 1992). Aunque los surfactantes actúan frecuentemente como emulsificantes, no todos los emulsificantes son surfactantes.

El efecto de un surfactante en la disponibilidad de compuestos orgánicos puede ser explicado por tres mecanismos: (i) dispersión de los HC líquidos en la fase no acuosa, logrando un incremento en el área de contacto, causada por una reducción de la tensión interfacial entre la fase acuosa y la fase no acuosa; (ii) incrementando la solubilidad, causado por la presencia de micelas que pueden contener altas concentraciones de compuestos orgánicos hidrofóbicos; y (iii) “facilitando el transporte” del compuesto orgánico desde la fase sólida a la fase acuosa, lo cual puede ser causado por diversos fenómenos, tales como la disminución de la tensión superficial de los poros de agua en las partículas del suelo, la interacción del surfactante con la interfase sólida y la interacción del contaminante con las micelas del surfactante (Watts y Dilly, 1996) (ver FIGURA 6).

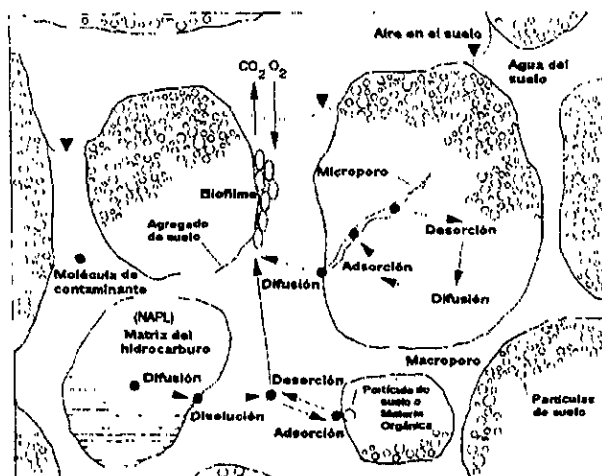


FIGURA 6. Esquema de los procesos que afectan a la biodisponibilidad en los suelos húmedos (Huesemann, 1994).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Los fluidos de perforación han sido formulados con altas concentraciones de metales pesados, dispersantes cromados, aceite diesel, asfalto, etc. Recientemente la composición de estos fluidos ha sido modificada debido principalmente a la creciente sensibilidad ambiental por parte de la industria petrolera y de las autoridades gubernamentales, que utilizan actualmente productos mas inocuos al ambiente; sin embargo, las zonas aledañas a los pozos petroleros han sido ya gravemente impactadas, debido a la forma de disposición de estos desechos, ya que son vertidos directamente al suelo permaneciendo a la intemperie por mucho tiempo.

Hoy en día las actividades de perforación en México se encuentran localizadas en su mayoría en el sureste del País, siendo principalmente los yacimientos marinos de la sonda de Campeche y sus extensiones en la franja continental -comprendiendo los Estados de Tabasco y Chiapas- los de mayor auge.

Es pues, de gran importancia el problema de la contaminación en estos estados por los desechos de perforación, si consideramos que solamente en Tabasco existen cerca de 4,000 pozos, y que un pozo genera en promedio 1,000 toneladas de cortes de perforación, mismas que contienen 15% de aceite; esto significa que 150 toneladas de aceite son introducidas al ambiente por cada pozo, contaminando así el suelo y mantos freáticos, que en este Estado son vastos y superficiales. Cabe mencionar que esta contaminación genera además del daño inmediato al ecosistema donde se vierten los fluidos, otros problemas de importancia como son el arrastre del contaminante -por los mantos freáticos impactados- a los cuerpos de agua superficiales y posteriormente al Golfo de México, provocando un fuerte impacto en la producción pesquera (solamente el Golfo representa el 30% de la producción pesquera nacional) (León *et al.*, 1993).

Es por ello que se hace indispensable la búsqueda de formas de liberar y degradar los hidrocarburos en el suelo, aprovechando las propiedades físicas y químicas que posee un surfactante, con la finalidad de provocar la solubilización del contaminante y de esta forma

hacerlo disponible a los microorganismos, con el fin último de acelerar el proceso de biodegradación de los desechos de perforación. Esto promueve el desarrollo y aplicación de nuevas tecnologías en suelos con problemas de contaminación que se encuentran dentro del territorio Nacional, y en especial en los Estados del sureste donde la actividad petrolera se realiza en mayor escala; tecnologías que demuestran ser la mejor solución al problema de la contaminación por hidrocarburos.

3. HIPOTESIS.

Será incrementado el porcentaje de degradación de los hidrocarburos del petróleo presentes en el suelo, al aplicar a éste, un surfactante o agente de superficie que libere al contaminante de la matriz del suelo, provocando su solubilización y susceptibilidad al ataque microbiano. Esto podrá permitir a su vez, el desarrollo de una posible metodología o tren de tratamiento, que permita la recuperación del suelo contaminado.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Mejorar el proceso de degradación a nivel de matraz agitado, de los hidrocarburos del petróleo presentes en muestras de suelos contaminados con desechos de perforación, mediante la adición de un surfactante o agente de superficie.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ↳ Caracterizar químicamente los contaminantes presentes en las muestras de suelos contaminados del Estado de Tabasco.
- ↳ Determinar el efecto del consorcio microbiano IMP y de la flora autóctona sobre la degradación de los hidrocarburos del petróleo presentes en el suelo contaminado.
- ↳ Seleccionar el surfactante o agente de superficie y la concentración del mismo, que mejoren el proceso de biodegradación de los hidrocarburos del petróleo presentes en la muestra de suelo contaminado.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

5.1. TOMA DE MUESTRA, TRATAMIENTO Y ALMACENAMIENTO.

Las muestras de suelo sujetas al proceso de biodegradación, proceden de áreas cercanas a los pozos petroleros del Estado de Tabasco.

Para este fin se consultó al personal del Instituto Mexicano del Petróleo que labora desde hace tiempo en estos lugares, y el cual sugirió algunos de los lugares contaminados con residuos generados por las actividades de Pemex Exploración y Producción. Estos residuos representan el principal problema de contaminación en esta área.

Se visitaron diferentes lugares contaminados en el área de pozos petroleros de Tabasco, seleccionándose varios sitios para realizar el muestreo correspondiente. Los muestreos fueron realizados al azar, debido a la homogeneidad de cada lugar, y se construyó una muestra compuesta con el suelo obtenido. Al mismo tiempo, se recolectaron muestras (en estos mismos sitios) de suelos que no presentaban problemas de contaminación por hidrocarburos, con la finalidad de considerarlas como un suelo testigo en la determinación de las propiedades físicas y químicas del suelo.

Debido a las políticas manejadas por Pemex, la información sobre la localización exacta de la zona de pozos petroleros muestreados no es del dominio público, y por tanto no puede ser incluida en este documento, pero puede ser solicitada en el caso de que se requiriese.

Las muestras obtenidas fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología del IMP, donde se secaron a temperatura ambiente dentro de un área cerrada y techada, durante un tiempo de 10 días. Al finalizar este tiempo, el suelo seco se tamizó haciéndolo pasar a través de una malla del No.10 (2 mm de abertura) y posteriormente se colocó dentro de recipientes de vidrio para conservarse a una temperatura constante de 4 °C para su posterior análisis.

5.2. CARACTERIZACION DEL SUELO CONTAMINADO.

Se determinaron los siguientes parámetros físicos y químicos del suelo contaminado con desechos de perforación y del suelo testigo:

PARAMETRO	METODO UTILIZADO
Textura (% de limos, arcillas y arenas)	Método del hidrómetro (Bouyoucus, 1962).
Capacidad de Intercambio Catiónico Total	Método Volumétrico del Versenato (Schollenberg y Simon, 1945)
pH	Potenciómetro.
Densidad Aparente (g/cm ³)	Método Volumétrico (Beaver, 1956)
Densidad Real (g/cm ³)	Método del Picnómetro (Aguilera, 1980).
Nitrógeno Total (%)	Digestión ácida Kejhda.
Materia Orgánica	Oxidación con ácido crómico y ácido sulfúrico (Walkley y Black, 1934)
Carbonatos (meq/100 g)	Método volumétrico (Magistad, 1945).
Bicarbonatos (meq/100 g)	Método volumétrico (Magistad, 1945).
Calcio (%)	Método Volumétrico del Versenato (Cheng y Bray, 1951)
Magnesio (%)	Método Volumétrico del Versenato (Cheng y Bray, 1951)
Metales Pesados	Absorción Atómica y Emisión de Plasma.

Estos análisis fueron realizados por el personal del Laboratorio de Remediación del Instituto Mexicano del Petróleo.

5.3. EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE LOS CONTAMINANTES PRESENTES EN EL SUELO.

Al suelo contaminado con los desechos de perforación se le extrajeron los contaminantes, utilizando para ello el método de extracción soxhlet descrito en el método EPA 3540 (18).

Una vez extraído, el contaminante se analizó para conocer la composición de las fracciones del petróleo presentes en éste, para lo cual se realizó el fraccionamiento de la muestra en una columna empacada con sílica gel y arcilla, y eluida con n-Pentano y posteriormente con una mezcla de tolueno-acetona 50-50 v/v, tal como lo describe el método ASTM 4221 (6).

Ambas determinaciones fueron realizadas por el personal del Laboratorio de Análisis Químicos del Instituto Mexicano del Petróleo.

Adicionalmente, se realizó el análisis del contenido de metales pesados presentes en la muestra de suelo contaminado, por el personal y mediante el método IMP-QA-026 del Laboratorio de Absorción Atómica para el As, Hg y Se; y por el método IMP-QA-404 del Laboratorio de Emisión de Plasma para los elementos Ba, Cd, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, V y Zn. Ambos laboratorios pertenecen al mismo Instituto.

5.4. CINETICA DE DEGRADACION DE LOS HIDROCARBUROS PRESENTES EN LA MUESTRA DE SUELO.

La determinación de la cinética de biodegradación se realizó a nivel de matraz agitado. Se compararon los procesos de bioestimulación y bioaumentación a través de dos series experimentales simultáneas, adicionando un medio de cultivo propicio para el crecimiento de la flora autóctona del suelo en una primera serie, y en la segunda adicionando al sistema el consorcio microbiano IMP que se caracteriza por degradar hidrocarburos. Se determinó la concentración residual del contaminante a diferentes tiempos, medida como

Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH's) en ppm utilizando el método de Espectrofotometría de Infrarrojo, además del pH del medio con un potenciómetro, y el crecimiento de los microorganismos como Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/mL) utilizando como medio de siembra el Agar Cuenta Estándar.

↳ *Flora autóctona.* La que contiene la muestra de suelo contaminado con desechos de perforación, obtenido de una profundidad aproximada de 20 cm. La obtención de la misma se realizó con un "kit" muestreador de suelo, obteniendo una cantidad aproximada de 1Kg de suelo por muestreo. El suelo fue colocado en bolsas de polietileno, las cuales se cerraron y transportaron en condiciones de refrigeración a una temperatura aproximada de 4 °C.

↳ *Consortio Microbiano IMP.* El consorcio IMP se obtuvo a partir del proceso de enriquecimiento de diversas cepas microbianas realizado en el Laboratorio de Biotecnología del Instituto Mexicano del Petróleo. Este proceso fue diseñado con el fin de seleccionar y obtener microorganismos capaces de degradar hidrocarburos y/o producir metabolitos con actividad emulsificante. El proceso de enriquecimiento opera desde hace poco más de un año, en un sistema continuo dentro de una columna empacada con tezontle y las cepas aclimatadas sobre petróleo crudo Maya como única fuente de carbono.

↳ *Medio de Cultivo.* El medio de cultivo empleado en los sistemas de matraz agitado fue medio mineral Lebac, conformado de la siguiente manera: 7 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 5.0 g/L de KH_2PO_4 ; 2.0 g/L de K_2HPO_4 ; 2.0 g/L de MgSO_4 ; 0.005 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0.0025 g/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 0.5 g/L de Extracto de Levadura. Todo el medio mineral usado en las cinéticas fue esterilizado a 120 °C y 150 libras de presión durante un tiempo de 15 minutos.

↳ *Condiciones de Crecimiento.* Todos los cultivos se llevaron al cabo en matraces bañados Erlenmeyer de 250 ml aproximadamente y por duplicado, a los cuales se les adicionaron 50 ml de medio de cultivo Lebac esteril y 5.0 g de la muestra de suelo contaminado. Estos se incubaron a temperatura y agitación constantes de 28 °C y 150 r.p.m. respectivamente. Cada 7 días se tomaron matraces por duplicado de cada una de las

series para medir el crecimiento microbiano, el pH del medio y el contenido de hidrocarburos residuales.

↳ *Determinación de Hidrocarburos Residuales.* Para ello se empleó el método EPA 418.1 modificado por Cirrus (17), en el que se extrajeron los Hidrocarburos Totales del Petróleo mediante la agitación mecánica de la muestra de suelo por un lapso de tiempo de 30 minutos, en presencia de sílica gel, sulfato de sodio y tetracloruro de carbono. El extracto obtenido se hizo pasar a través de papel filtro (Wattman No. 40) y se aforó a 100 mL. La concentración de TPH's presentes fue calculada a través del análisis espectrofotométrico de infrarrojo realizado al extracto.

5.5. SELECCION DEL AGENTE DE SUPERFICIE

Se probaron cuatro surfactantes químicos, considerados como no-iónicos: Biotrix, dos alquifenoletoxilados: Tergitol NP-10 (nonilfeniletoxilado, $C_9PE_{10.5}$), Tritón X-100 (octilfeniletoxilado, $C_8PE_{9.5}$), y un sorbitoetoxilado: Tween 80 (monooleato sorbico). Todos ellos fueron adquiridos a través del proveedor que los comercializa (Sigma Chemical Co., St. Louis).

La elección del mejor surfactante se realizó en función de los resultados experimentales de cuatro propiedades: Concentración Micelar Crítica (CMC), Actividad Emulsificante, Lavado del Suelo y Toxicidad para los microorganismos.

↳ *Concentración Micelar Crítica.* Para la evaluación de esta propiedad se prepararon diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-10} (p/v) con cada uno de los surfactantes, a las cuales se les midió la tensión superficial utilizando para ello un tensiómetro Du Nouy de anillo (CSC Scientific Company, Inc). Dicha medición fue realizada por el Laboratorio de Química Analítica del Instituto Mexicano del Petróleo. Con estos valores, se construyó un gráfico de concentración del agente de superficie contra tensión superficial, y se extrapoló el valor de la CMC al hacerse intersectar las pendientes de cada curva.

↳ *Actividad Emulsificante.* De cada una de las diluciones preparadas con cada surfactante, se tomaron 4 ml y se adicionaron a 6 ml de queroseno dentro de un tubo de ensaye. Este se agitó por dos minutos en un "Vortex" y se dejó reposar durante 24 hrs. Posteriormente, se midió la columna de emulsión formada dentro del tubo para cada una de las diluciones del agente de superficie. Con estos datos se construye un gráfico de concentración contra porcentaje de emulsificación.

↳ *Lavado de suelo.* Se prepararon soluciones de 0.5% (p/v) de cada uno de los agentes de superficie. Se tomaron 100 ml de esta solución y se adicionaron a 5 g del suelo contaminado. Se agitó durante 24 hrs y posteriormente se decantó el líquido. Nuevamente se enjuagó el suelo con la solución del agente de superficie, y después de decantar nuevamente, se enjuagó con agua destilada. La muestra de suelo se filtró y dejó secar a temperatura ambiente, para posteriormente extraer los TPH's. La cantidad de hidrocarburos residuales se determinó en forma gravimétrica.

↳ *Toxicidad para los microorganismos del suelo.* La toxicidad para los microorganismos del suelo se comprobó al hacerlos crecer en el medio de cultivo Lebac, al que se le adicionó el surfactante en una concentración del 1% (p/v). A dicho medio se le adicionó el suelo contaminado en una concentración del 5% (p/v), y simultáneamente se probó también con el consorcio microbiano IMP (10% p/v). Ambas series se incubaron a temperatura y agitación constantes, y cada 7 días fue evaluado el crecimiento por medio de Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) para los microorganismos del suelo y por medio de Densidad Óptica (660 nm) para el consorcio IMP.

5.6. CINÉTICA DE BIODEGRADACION DEL CONTAMINANTE EN PRESENCIA DEL SURFACTANTE.

La cinética de biodegradación en presencia del agente de superficie también se realizó a nivel de matraz agitado. Se ensayaron cuatro concentraciones diferentes del surfactante Tergitol NP-10 ya seleccionado de las pruebas anteriores, además de un testigo envenenado con azida de sodio y un testigo sin surfactante, para determinar la concentración

de éste que mejore el proceso de desorción del contaminante en el suelo. El sistema empleado para realizar la biodegradación involucra el proceso de bioestimulación ya antes ensayado.

↳ *Medio de Cultivo.* El medio de cultivo empleado fue medio mineral Lebac previamente esterilizado a 120 °C y 150 libras de presión.

↳ *Agente de superficie.* El agente de superficie utilizado fue el Tergitol NP-10, en concentraciones de: 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0% p/v. Además se incluyó un testigo envenenado con azida de sodio y un testigo sin surfactante. Estas concentraciones fueron ensayadas por duplicado.

↳ *Condiciones de Cultivo.* El experimento fue realizado en matraces Erlenmeyer bañados de 250 mL con 20 mL de medio Lebac, a los que se les adicionó el suelo contaminado y el agente de superficie en cada una de las concentraciones antes mencionadas. Cada una de las series se incubó a una temperatura (28 °C) y agitación (150 r.p.m.) constantes durante 30 días. Cada 5 días se tomó un par de matraces de cada una de las series para realizar los análisis correspondientes.

↳ *Análisis.* Los análisis que se practicaron a las muestras fueron los siguientes: pH del medio, crecimiento medido por Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) e Hidrocarburos residuales por Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH's en ppm).

5.7. ANALISIS ESTADISTICO.

Análisis de varianza.

A los valores de degradación de TPH's obtenidos se les realizó un análisis de varianza, empleando para ello el paquete de cómputo *STATA*; éste análisis permite determinar si existe diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos, al calcular el grado de variación que presentan los valores de cada tratamiento entre sí y con respecto a la distribución del conjunto de datos. Se aplicó también la prueba de Bonferroni para realizar comparaciones múltiples entre los datos en un nivel de confianza del 0.05.

Prueba de Bonferroni.

Este es una prueba de comparación múltiple o procedimiento posterior, el cual es muy utilizado por su facilidad de aplicación, ya que solo requiere el uso de distribuciones t . Este procedimiento pretende controlar la posibilidad de error global para el experimento, reduciendo el nivel de significancia de F . La prueba de Bonferroni se puede usar también en pruebas de hipótesis sobre diferencias entre pares de medias poblacionales o para construir intervalos de confianza para las diferencias entre medias poblacionales.

6. RESULTADOS y ANALISIS DE RESULTADOS.

Para poder considerar el uso de técnicas de biorremediación como un posible método de tratamiento de éste suelo, es necesario conocer antes las propiedades físicas y químicas del suelo contaminado (Tabla 1), así como la concentración de metales pesados presentes en el mismo (Tabla 2) y la composición química del contaminante (Tabla 3).

TABLA 1. PROPIEDADES FISICAS Y QUIMICAS DEL SUELO.

PARAMETRO	SUELO CONTAMINADO	SUELO TESTIGO
Textura	Arena migajosa	Arena
• % Limos	14	4
• % Arenas	82	96
• % Arcillas	4	0
Capacidad de Intercambio Catiónico Total	Bajo	Bajo
pH	7.35	7.3
Densidad Aparente (g/cm ³)	1.4646	1.339
Densidad Real (g/cm ³)	1.5039	2.4918
Nitrógeno Total (%)	0.083	0.054
Materia Orgánica	0	Pobre. 0.3243
Determinación de:		
• Carbonatos meq/100 g	0	0
• Bicarbonatos meq/100g	0.5	0.5
• Calcio %	2.8	2.4

TABLA 2. METALES PESADOS PRESENTES EN EL SUELO CONTAMINADO.

Elemento	Concentración ppm	Normatividad (ppm) ^a
Bario	246.55	10,000
Cadmio	0.01	100
Cromo	45.25	2,500
Fierro	12,106.5	N. E. ^b
Magnesio	3,959.5	N. E.
Manganeso	239	N. E.
Níquel	31.4	2,000
Plomo	60.5	1,000
Vanadio	6.8	240
Zinc	392	2,500
Arsénico	16.55	500
Mercurio	0.83	20
Selenio	0.05	N. E.

^a Barklays California Code of Regulations 22 - 66261.24

^b N. E. No especificado.

TABLA 3. COMPOSICION QUIMICA DEL CONTAMINANTE PRESENTE EN EL SUELO.

Componente	Porcentaje
Saturados	37.40
Aromáticos	12.80
Polares	30.16
Insolubles en Pentano	19.64
Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH's)	140,000 ppm.

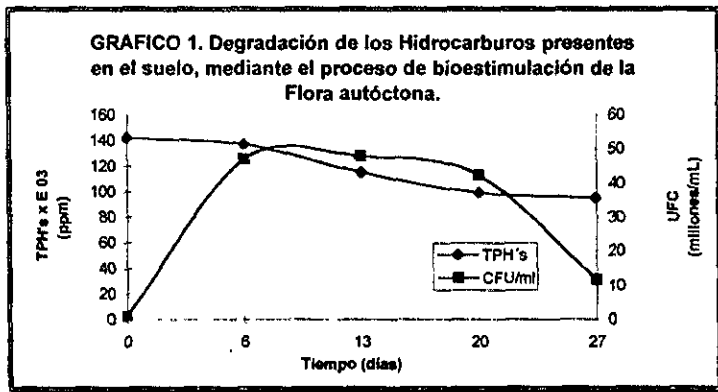
El análisis de las características físicas y químicas del suelo (Tabla 1) en el cual se encuentran adsorbidos los hidrocarburos, muestra que se trata de un suelo con una alta proporción de arenas y limos, lo que le confiere una textura de arena migajonosa. Si se observa la textura del suelo testigo (tomado de un sitio no contaminado próximo al pozo Bellota 401) se notará que en realidad el suelo contaminado posee una textura francamente arenosa, y la alta concentración de hidrocarburos que este posee (140,000 ppm) le confiere

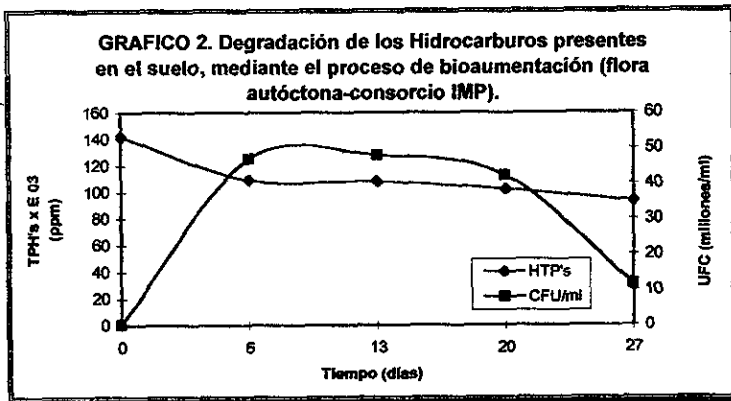
las propiedades de agregación que corresponden a los limos y arcillas que el análisis revela. En general, el suelo (ambos) posee un pH neutro favorable al desarrollo de los microorganismos, y dado que es un suelo arenoso, es de esperarse que posea un bajo o nulo contenido de materia orgánica, aunque la ausencia de ésta en el suelo contaminado pudo también ser debida a un error de método, al interferir los hidrocarburos con esta determinación. La textura arenosa es también favorable para el proceso de biorremediación, ya que le confiere al suelo un buen drenaje y al mismo tiempo asegura una buena aireación, sin embargo, tiene poca capacidad de retener agua (ya que existe la posibilidad de una mayor migración a mayores profundidades), la cual juega un papel determinante en la degradación por microorganismos.

Las concentraciones de metales pesados dentro de la muestra de suelo fue uno de los factores críticos para decidir si el proceso de biorremediación era adecuado, debido a que la presencia de éstos puede provocar un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la microflora (Babich y Stotsky, 1985). Por ejemplo, una gran concentración de iones de Fe puede causar la formación de radicales libres, los que junto con los radicales superóxido e hidroxilo (mediante la reacción de Fenton) (Watts y Dilly, 1996) actúan sobre las células provocando su muerte. Es importante conocer su concentración, ya que en la composición de los desechos de perforación se incluyen los fluidos de perforación, los que poseen una gran cantidad de metales pesados como componentes. El análisis de la concentración de éstos (Tabla 2), y su comparación con los valores permitidos en el suelo que maneja el Código de Regulación de Barkley, Ca., U.S.A., indica que aunque se encuentran concentraciones altas para algunos de los metales pesados presentes como el Hierro (12,106.5 ppm respectivamente) ninguna de ellas se encuentra por encima de los valores establecidos por la norma. Aunque ésta circunstancia no permite asegurar que no se tendrán efectos nocivos o inhibitorios sobre la microflora del suelo, el hecho de que se encuentren algunas poblaciones de éstos en el suelo sugiere la posibilidad de que lo anterior no sucede u ocurre en menor medida. También debe hacerse notar que el Hierro es un nutrimento traza y que su presencia es muy común en el suelo.

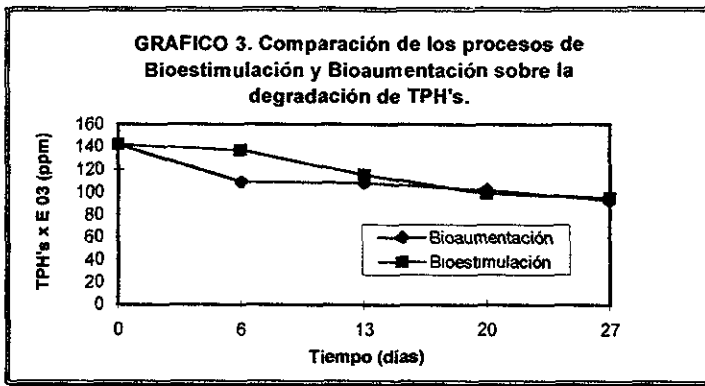
El análisis de las fracciones constituyentes del petróleo presentes en los desechos de perforación (Tabla 3), muestra el porcentaje de cada una de éstas en los desechos, y permitió suponer que el 37.40%, correspondiente a los compuestos saturados (n-alcenos, alcanos ramificados y cicloalcanos) podría ser totalmente degradado, ya que ésta fracción es la más fácilmente atacable por los microorganismos degradadores; y que a su vez, también podría ser degradado el 12.8% correspondiente a la fracción aromática, debida a su relativa simplicidad. Las fracciones polares e insolubles en pentano (asfaltenos), son difícilmente atacadas, por lo que no se esperó que fueran degradadas. Se sugiere caracterizar los hidrocarburos residuales después de la degradación con el fin de corroborar esta hipótesis.

Una vez que se comprobó que las condiciones permitían llevar a cabo un proceso de biorremediación, se probaron los efectos de bioestimulación de la flora autóctona mediante el suministro de nutrientes (Gráfico 1), y de bioaumentación de la flora autóctona, mediante la adición del consorcio microbiano IMP (Gráfico 2).





Los gráficos de degradación de los Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH's) obtenidos a partir de las anteriores cinéticas de degradación, muestran un comportamiento muy similar entre sí, ya que en ambos, se observa una curva típica de crecimiento de los microorganismos (mostrando una fase de crecimiento exponencial, una fase estacionaria y una fase de muerte) que corresponde con la curva de disminución de los TPH's presentes en el suelo. Como se puede observar en el gráfico de comparación de ambas cinéticas (Gráfico 3), la tendencia de disminución es similar en ambos sistemas, sin embargo, existe una diferencia para el tiempo de 6 días, ya que la disminución lograda por bioaumentación es visiblemente mayor que la correspondiente por bioestimulación. No obstante, dicha diferencia no es continua durante los siguientes tiempos, y ambos sistemas alcanzan prácticamente el mismo porcentaje de degradación al cabo de 27 días (30% para la flora autóctona y 27% para el consorcio IMP-flora autóctona).

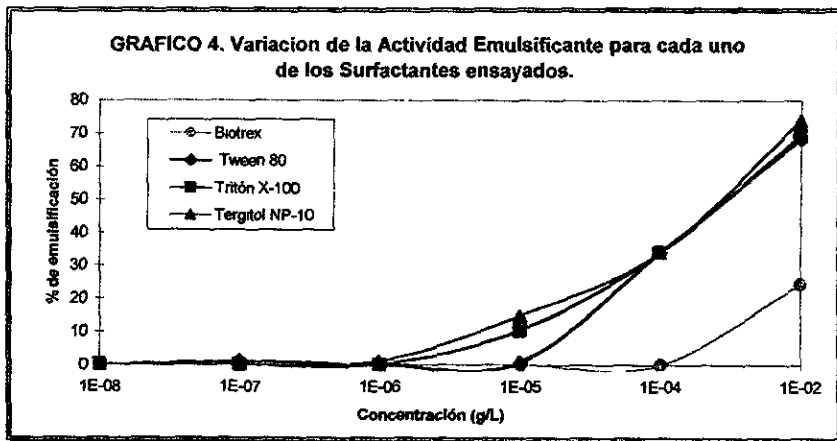


Estos resultados permiten afirmar que el proceso de bioestimulación es suficiente para lograr la degradación del contaminante, y que por tanto no es necesario adicionar nuevos microorganismos al suelo, lo que resulta benéfico si se considera que la adición de éstos posee desventajas debido a que los microorganismos del consorcio IMP pueden ser potencialmente dañinos al ambiente por ser alóctonos. Este riesgo se minimiza o anula al utilizar la flora autóctona, la que se encuentra ya adaptada a las condiciones existentes, y que por tanto, realiza su metabolismo con mayor eficiencia.

Debido a lo anterior, las posteriores cinéticas de degradación fueron llevadas a cabo considerando al proceso de bioestimulación de la flora autóctona como la mejor condición.

La parte central de este trabajo fue la elección y aplicación de un agente de superficie, debido a que cuando los hidrocarburos entran en contacto con la matriz de suelo, éstos quedan retenidos o adsorbidos, lo que provoca una reducción de la disponibilidad del hidrocarburo para su ataque microbiano.

La elección del agente de superficie que posee las mejores propiedades, se realizó con base en los valores obtenidos de cuatro pruebas. La primera de ellas consistió en determinar la actividad emulsificante de cada uno, lo cual se realizó para comparar y elegir el surfactante que lograra formar la mayor emulsión a la menor concentración (Gráfico 4).



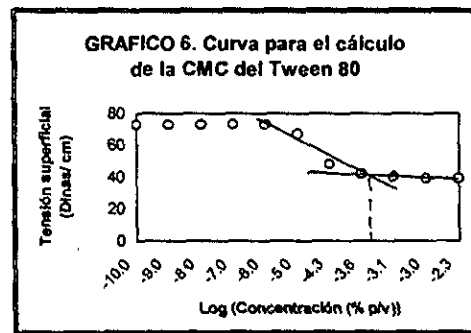
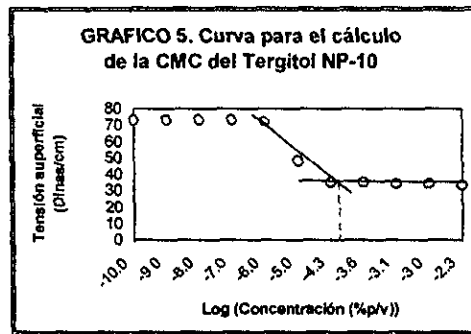
Al observar las curvas anteriores correspondientes al porcentaje de emulsificación del queroseno, obtenidas para diferentes diluciones ensayadas con cada surfactante, se tiene que el Tergitol NP-10 y el Tritón X-100 presentan una actividad emulsificante alta a diluciones mayores, es decir, a una concentración menor del surfactante. Para una dilución de 10^{-5} , el Biotrix y el Tween 80 presentaron un valor de cero, mientras que el Tritón X-100 y el Tergitol NP-10 presentan valores del 10 y 15% respectivamente. Esto resulta importante, si se considera desde el punto de vista ecológico y económico, ya que significa la menor cantidad de surfactante a emplear, que aún posea la capacidad de emulsificar al contaminante.

La segunda prueba corresponde al lavado del suelo, y en ésta se evaluó la capacidad de cada surfactante de solubilizar y liberar la mayor cantidad posible de hidrocarburos provocando con ello su biodisponibilidad al ataque microbiano. Esta capacidad se reporta como el porcentaje de hidrocarburos removido del suelo (Tabla 4), los cuales son mayores para el Tergitol N-10 y Tritón X-100 que para los restantes. Dicha prueba se realizó con una concentración de 0.5% de surfactante (ya que una concentración mayor de éste podría lavar completamente los hidrocarburos de la muestra de suelo, obteniéndose valores muy similares para todos los surfactantes).

TABLA 4. RESULTADOS DEL PROCESO DE LAVADO DE SUELO DEL CONTAMINANTE PRESENTE EN EL SUELO.

Agente de Superficie	HIP's Removidos (%)
Biotrix	43.24
Tritón X-100	47.33
Tergitol NP-10	53.60
Tween 80	37.05

La tercera prueba consistió en el cálculo de la Concentración Micelar Crítica (CMC) de cada surfactante, para lo cual se prepararon diluciones de cada uno de ellos, y se determinó la tensión superficial de cada dilución. Con estos datos, se construyeron los Gráficos 5 al 8 de los cuales se obtiene el valor de la CMC (Tabla 5) al extrapolar la intersección de las curvas de diferente pendiente sobre el eje de las abscisas, y posteriormente calcular el valor del Antilog para el valor correspondiente.



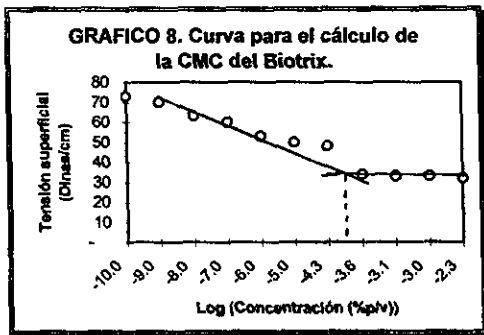
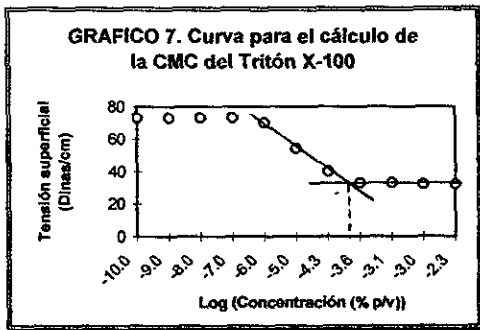


TABLA 5. CONCENTRACION MICELAR CRITICA (CMC) DE CADA UNO DE LOS SURFACTANTES ENSAYADOS.

Agente de Superficie	Concentración Micelar Crítica calculada (M)	Concentración Micelar Crítica reportada. (M)
Biotrix	1.818×10^{-3}	
Tritón X-100	2.0×10^{-3}	3.14×10^{-4} * 2.0×10^{-4} **
Tergitol NP-10	3.13×10^{-3}	3.7×10^{-3} •
Tween 80	1.9×10^{-3}	1.0×10^{-4} •

* Aronstein, 1991.

** Liu, 1991.

• Laha, 1992.

Los valores obtenidos de la CMC (Tabla 5) corresponden a la concentración mínima del surfactante que forma micelas, las que atrapan al hidrocarburo dentro de la región hidrofóbica, liberándolo de la matriz del suelo y haciéndolo disponible para el microorganismo. Todos los valores obtenidos, se reportaron en concentraciones Molares (M); y todas ellas se encuentran por arriba de las concentraciones reportadas en la literatura para algunos de ellos. No obstante esta discrepancia entre los datos obtenidos y los reportados, para fines prácticos éstas concentraciones son demasiado pequeñas para ser aplicadas al suelo, y partiendo del hecho de que por arriba del valor de la CMC se libera una mayor cantidad del contaminante, los valores obtenidos permiten tener un valor mínimo de referencia de las concentraciones a emplear (por encima de la CMC) en las cinéticas de degradación en presencia del agente de superficie.

La última prueba consistió en determinar la toxicidad de cada surfactante para la microflora del suelo, al hacer crecer éstos en una solución del surfactante con una concentración del 1% (v/v). Ninguno de los surfactantes presentó un efecto inhibitorio o tóxico sobre la microflora del suelo o sobre el Consorcio microbiano IMP, ya que ambos presentaron curvas normales de crecimiento. Los resultados de esta prueba y de las pruebas anteriores son mostrados en la Tabla 6

TABLA 6. CUADRO COMPARATIVO DE LAS PRUEBAS DE SELECCION DEL SURFACTANTE.

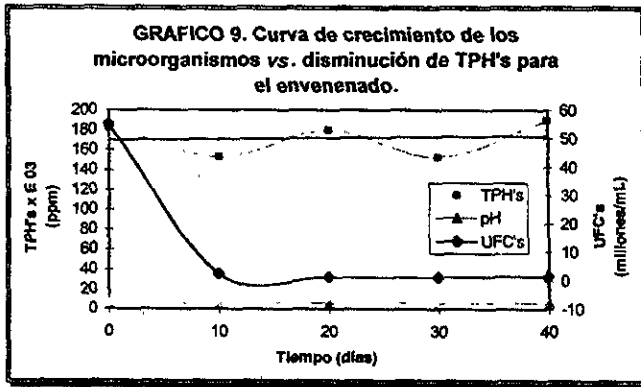
Agente de Superficie	Lavado de Suelo % HTP's removidos	Actividad Emulsificante (%)	Toxicidad
Biotrix	43.24	0	NULA
Tritón X-100	47.33	10.15	NULA
Tergitol NP-10	53.60	14.83	NULA
Tween 80	37.05	0.7	NULA

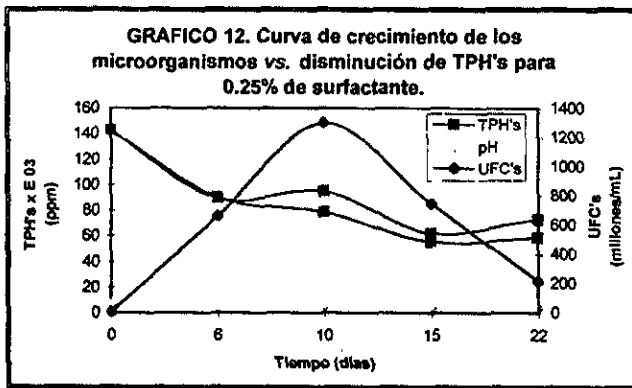
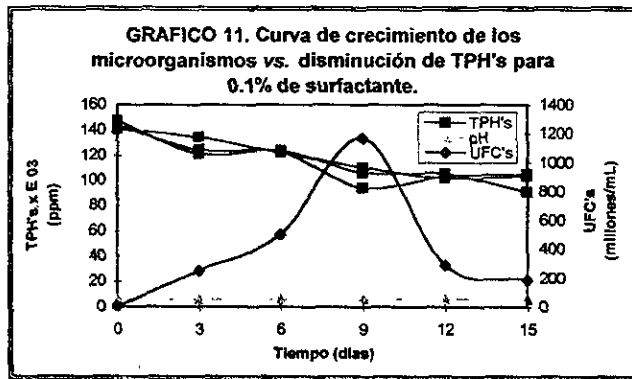
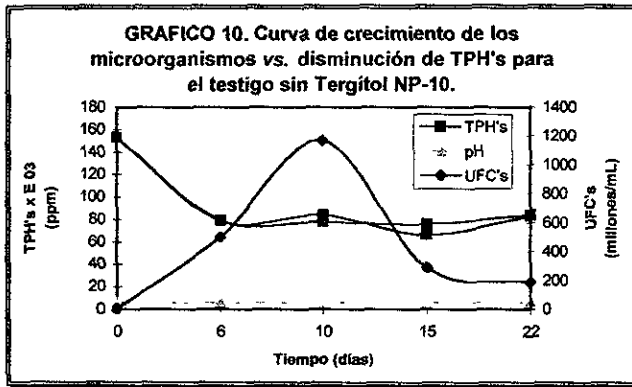
Este resumen de los resultados de las pruebas de selección del surfactante permitió concluir que aunque el Tritón X-100 y el Tergitol NP-10 presentaron características y valores muy semejantes (debido a la misma naturaleza química de ambos), éste último logró

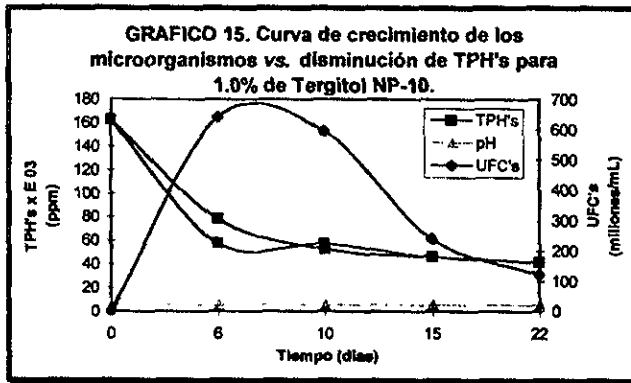
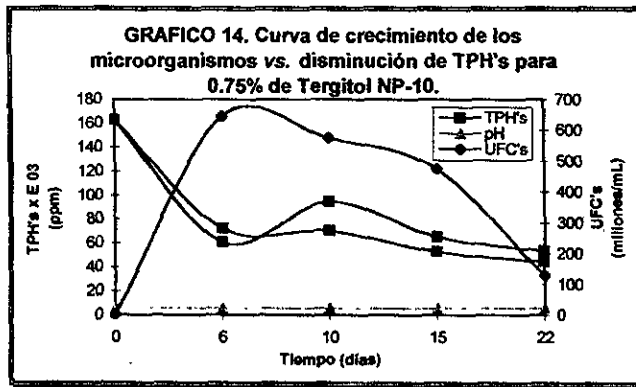
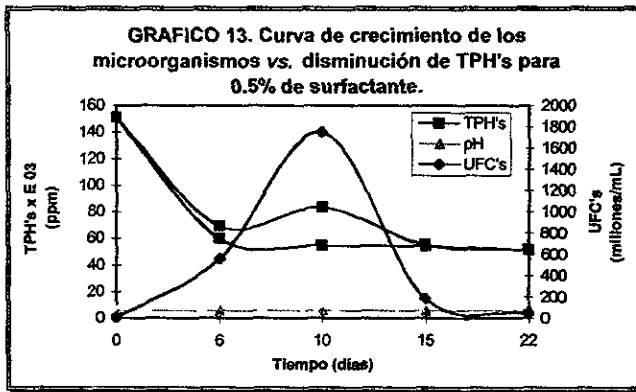
tener un mejor efecto solubilizante de los hidrocarburos en el suelo, por lo que se consideró emplearlo en las posteriores cinéticas de degradación.

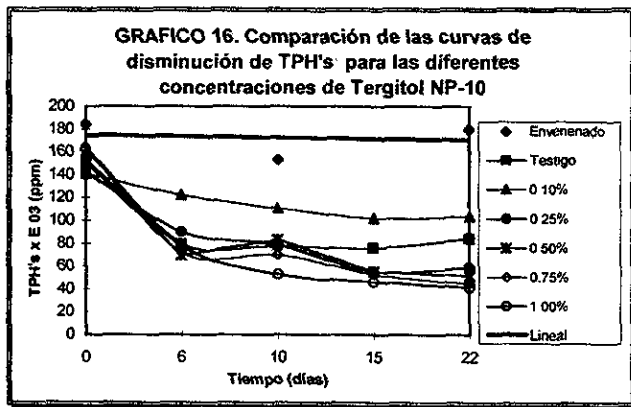
Estas cinéticas se realizaron probando diferentes concentraciones del surfactante (Gráficos 11 al 15); así como también un testigo sin surfactante (Gráfico 10) para comprobar el efecto de la adición de éste, y un testigo sin microorganismos (envenenado con azida de sodio) mostrado en el Gráfico 9.

La disminución de TPH's para todas las concentraciones ensayadas, son comparadas en el Gráfico 16.









Al igual que para las cinéticas ya antes realizadas, las curvas de degradación en presencia del agente de superficie mostraron comportamientos similares, excepto para aquella que corresponde al testigo envenenado con azida de sodio (Gráfico 9), en la cual se observó que la concentración de TPH's permanece prácticamente constante después de 40 días de cinética, y que la población microbiana se abatió significativamente hasta el valor de cero. También se encontró que el pH permanece siempre sin variación, siendo de 6.5 en promedio. Este comportamiento permitió definir con precisión el porcentaje de degradación originado por medios físicos o químicos, que es tan solo del 4%. De lo anterior se concluyó que toda la degradación que se presentó de las cinéticas, es originado por la flora microbiana presente en el suelo.

Como ya antes se mencionó, el comportamiento de las cinéticas para las concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0% al igual que para el testigo sin surfactante, fue muy similar (Gráficos 10 al 15), tanto en las curvas de degradación como en las curvas de crecimiento de los microorganismos presentes, así como la correlación entre ambas. En cada una de ellas se observan dos curvas de degradación de TPH's, debido a que se graficaron los valores obtenidos con su duplicado, y en el caso del Gráfico 11, por triplicado). El pH permaneció constante en todas ellas, con el valor promedio ya antes mencionado de 6.5. En el Gráfico 16, se puede distinguir claramente la diferencia que existe entre las curvas obtenidas para la concentración de 0.1% de surfactante y del testigo

envenenado con respecto a las restantes, sin embargo, éstas últimas presentan curvas superpuestas que no permiten aclarar si existe diferencia entre las distintas concentraciones de surfactante.

Para tratar de dilucidar lo anterior, se calcularon los porcentajes de degradación obtenidos después de 15 días (Gráfico 17), pero en éste se observa nuevamente que no existe diferencia entre las concentraciones de 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0%. Debido a ello, es que se decidió realizar un análisis de varianza y de comparación múltiple (Prueba de Bonferroni) considerando a cada uno de los valores de TPH's (incluyendo duplicados y triplicados) obtenidos en cada tiempo de las cinéticas ensayadas para cada una de las concentraciones (APENDICE 1).

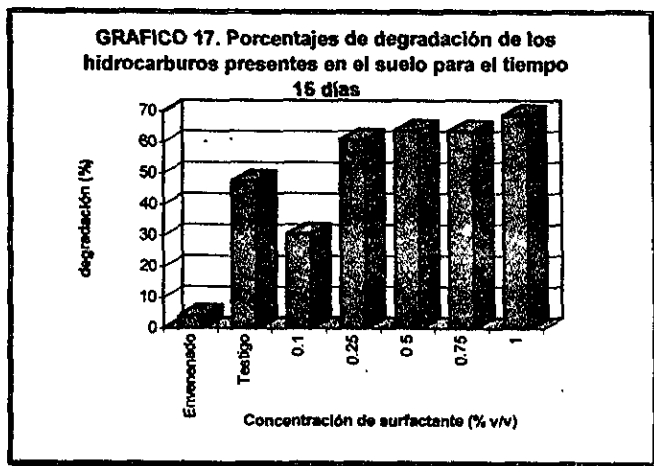
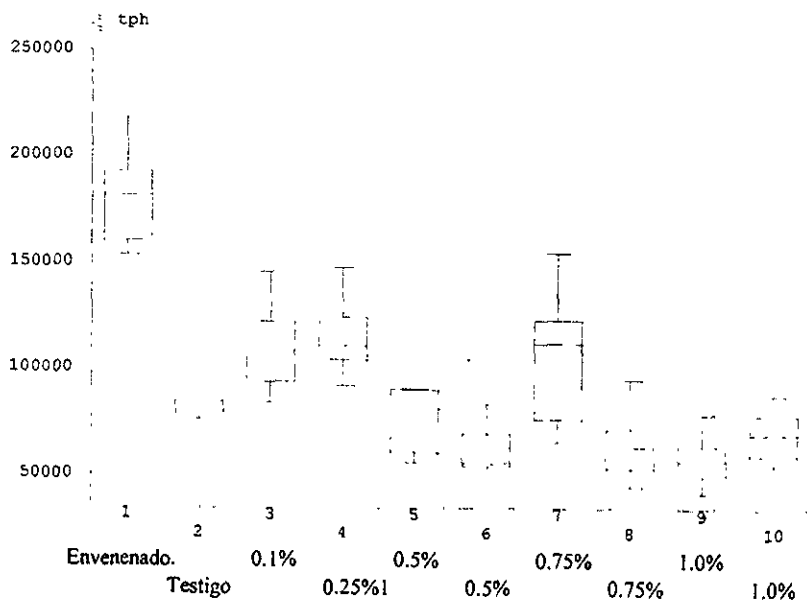


FIGURA 7. DIAGRAMA DE CAJAS PARA LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TERGITOL NP-10.

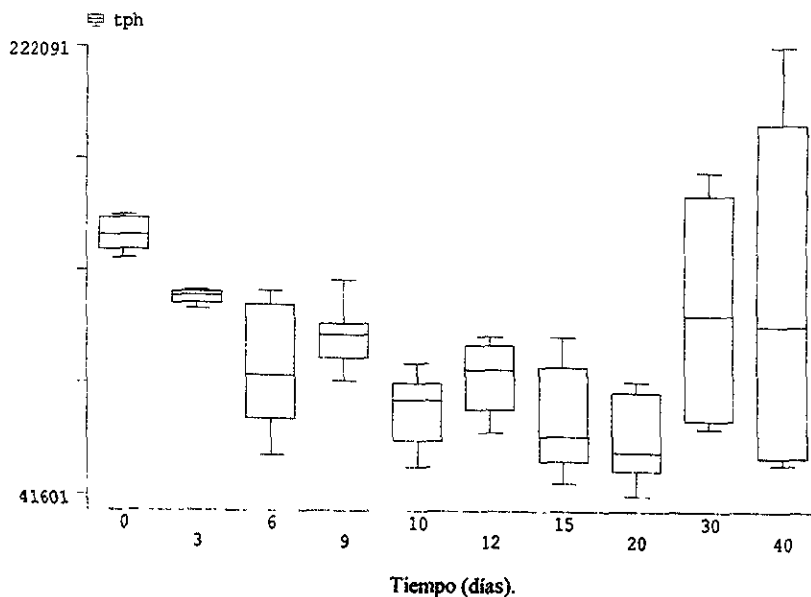


Análisis de varianza para las diferentes concentraciones del surfactante.

Fuente	SS	df	MS	F	Prob>F
Entre grupos	7.4584e+10	9	8.2871e+09	24.88	0.0000
Dentro de grupos	2.8983e+10	87	333134241		
Total	1.0357e+11	96	1.0788e+09		

Prueba de Bartlett para igualdad de varianza: $\chi^2(9) = 31.6246$ Prob> $\chi^2 = 0.0000$

FIGURA 8. DIAGRAMA DE CAJAS PARA LOS DIFERENTES TIEMPOS DE DURACION DE LAS CINÉTICAS DE DEGRADACION.



Análisis de varianza para los diferentes tiempos de degradación.

Fuente	SS	df	MS	F	Prob>F
Entre grupos	5.0133e+10	9	5.5703e+09	9.07	0.0000
Dentro de grupos	5.3433e+10	87	614174083		
Total	1.0357e+11	96	1.0788e+09		

Prueba de Bartlett para igualdad de varianza: $\chi^2(9) = 71.9153$ Prob> $\chi^2 = 0.001$

Fuente	SS parcial	df	MS	F	Prob>F
Modelo	9.2372e+10	18	5.1318e+09	35.76	0.0000
Concentración	4.2239e+10	9	4.6932e+09	32.70	0.0000
Día	1.7788e+10	9	1.9765e+09	13.77	0.0000
Residual	1.1194e+10	78	143516641		
Total	1.0357e+11	96	1.0788e+09		

Número de obs = 97

R-cuadrada = 0.8919

MSE fija = 11979.8 R-

cuadrada ajustada = 0.8670

El análisis de varianza realizado para los diferentes tratamientos se muestra como un diagrama de cajas (Figura 7), en el cual se tiene que el tratamiento 1 (envenenado) es significativamente diferente de todos los demás tratamientos, y que a su vez, los tratamientos 2, 3 y 4 (testigo, 0.1 y 0.25% respectivamente) son similares entre sí y significativamente diferentes del resto. No existe diferencia significativa entre los tratamientos 0.5, 0.75 y 1.0% (tratamientos restantes). Lo anterior es importante porque permite concluir que estadísticamente el tratamiento 6 (correspondiente a una concentración del 0.5%) es el mejor, ya que permite una mayor disminución de hidrocarburos a la menor concentración de surfactante utilizado. Estos resultados poseen una $\text{Prob} > \chi^2$ menor de 0.05, lo que significa que se tiene un intervalo de confianza mayor del 95%. El análisis de comparación múltiple permitió construir un diagrama de bloques para los tiempos de duración de las cinéticas (Figura 8), el cual reveló que todos los tiempos son estadísticamente diferentes del tiempo cero, y que de los 10 días en adelante, no hay diferencia entre éstos, lo que significa que durante los primeros 10 de duración de la cinética, ocurre en mayor medida el fenómeno de degradación, durante el cual, se degradan todos los componentes químicos fácilmente metabolizables por los microorganismos, y que después de este tiempo, las fracciones restantes con estructuras químicas complejas, permanecen en el sistema. Asimismo, las cajas en este diagrama se ordenan (desde el día cero hasta el día 20) para simular el comportamiento de una curva típica de degradación, disminuyendo marcadamente durante los primeros 6 días y volviéndose asintótica después de los 10 días. Se excluyen las cajas que representan los 30 y 40 días, debido a que corresponden al testigo envenenado, en el cual prácticamente no ha habido ninguna degradación. Los resultados de la prueba estadística de Bonferroni son mostrados en los APENDICES 2 y 3.

Estos resultados permiten generar varias hipótesis: a) A concentraciones mayores del 0.5%, aunque se incremente la cantidad de hidrocarburos en forma soluble, éstos no se encuentran disponibles para los microorganismos, debido quizá a la gran cantidad de micelas formadas (debido a que las concentraciones son varias veces mayores que la CMC) las cuales "secuestran" a las moléculas de hidrocarburos dentro de sí mismas. Esto hace que los microorganismos no puedan atacarlas y por tanto degradarlas. b) Puede suceder también que al exceder la concentración de 0.5%, las mismas moléculas del surfactante puedan competir

con las moléculas del hidrocarburo como fuente de carbono disponible para el metabolismo microbiano, reduciendo la utilización del hidrocarburo y por tanto su degradación, aunque Sundaram *et al.* (1994) afirmen que las moléculas de surfactante no actuaron como fuente de carbono alterna en un experimento de degradación de queroseno. Después de los 10 días de degradación, ya no existe una disminución significativamente importante, y quizá esto se deba a que el surfactante después de 10 días fue totalmente utilizado como fuente de carbono por los microorganismos, lo que ocasionaría que ya no puede ser solubilizada y atacada una mayor cantidad de hidrocarburos, y esto se refleje en una disminución de la degradación de los mismos.

Estos resultados poseen gran relevancia ya que confirman que la flora autóctona del suelo es suficiente para lograr una disminución de los hidrocarburos del petróleo presentes en un suelo contaminado, y que el uso de un agente de superficie promueve y aumenta la biodegradación de éstos, ambos factores de gran relevancia si se considera la aplicación de un sistema de bioremediación en los suelos del Estado de Tabasco, que poseen grandes problemas de contaminación por hidrocarburos.

7. CONCLUSIONES.

- La flora autóctona de los suelos contaminados provenientes del pozo Bellota 401 es suficiente para lograr la adecuada degradación de los hidrocarburos del petróleo presentes en los desechos de perforación.
- El agente de superficie o surfactante no-iónico Tergitol NP-10, es el que posee las mejores características al tener un mayor porcentaje de emulsificación y una mejor solubilización (lavado del suelo) de los hidrocarburos presentes en el suelo.
- El Tergitol NP-10 en una concentración del 1.0% no presentó ningún efecto tóxico o inhibitorio sobre el crecimiento de la flora autóctona del suelo.
- La totalidad de la disminución de los hidrocarburos en el suelo, es debida a la actividad degradadora de la flora autóctona del mismo.
- La adición de un agente de superficie o surfactante incrementa la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo presentes en los desechos de perforación de pozos petroleros de un 47.4% (del testigo sin surfactante) hasta un 68.48% (con 1.0% de surfactante), en un tiempo de 10 días.
- El análisis estadístico muestra que una concentración del 0.5% de Tergitol NP-10 incrementa significativamente la disminución de los hidrocarburos en el suelo, con un intervalo de confianza mayor del 95%.

8. SUGERENCIAS.

Se propone para trabajos posteriores que se compruebe si en realidad existe una utilización importante del surfactante como fuente de carbono, que compita con la utilización de los hidrocarburos en la degradación. También es importante conocer las fracciones y componentes del petróleo presentes antes y después del proceso de degradación, para comprobar y detectar las fracciones utilizadas y aquellas que ya no puedan serlo, por los microorganismos del suelo. Deben analizarse también los efectos de la adición del Tergitol NP-10 a diferentes tiempos durante una cinética de degradación.

Se propone también una modificación en la composición del medio de cultivo, ya que en éste se utiliza sulfato de amonio como nutrimento, y podría utilizarse en su lugar un compuesto que posea en su composición a los nitratos, que son una forma química que le confiere menos condiciones reductoras al medio y por tanto favorece de alguna manera la oxigenación del suelo, además de ser fácilmente asimilable por los microorganismos del suelo. Dicha modificación podría favorecer el proceso de biodegradación.

10. BIBLIOGRAFIA CITADA.

1. Aboul-Kassim, T. A. y B.R.T Simoneit. (1993). *Detergents: A Review of the Nature, Chemistry and Behavior in the Aquatic Environment*. Part I. Chemical Composition and Analytical Techniques, CRC Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., No. 23, pp. 325-376.
2. Alfred, B., y G. O. Brown. (1994). *Surfactant-Induced Reductions in Soil Hydraulic Conductivity*. G.W.M.R. Spring, pp. 174-184.
3. Aronstein, B. N., Calvillo, Y. M. y M. Alexander, (1991). *Effect of Surfactants at Low Concentrations on the Desorption and Biodegradation of Sorbed Aromatic Compounds in Soil*. Environ. Sci. Technol., No. 25, pp. 1728-1731.
4. Atlas, Ronald M., (1981), *Microbial degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective*. Microbiological reviews, March, vol. 45, No. 1. pp. 180-209.
5. Atlas, Ronald M., (1991), *Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation of Oil Spills*. J. Chem. Tech. Biotechnol., No. 52, pp. 149-156.
6. ASTM Method STP 4221. (1994), *Analysis of Soils Contaminated with Petroleum Constituents*, ASTM specialized Technology Publications, Philadelphia.
7. Auger, R. L., Jacobson, A. M. y M. M. Domach. (1995). *Effect of Nonionic Surfactant Addition on Bacterial Metabolism of Naphthalene: Assessment of toxicity and Overflow Metabolism Potential*. Journal of Hazardous Materials, No. 43, pp. 263-272.
8. Babich, H. y Stotsky, G. (1985). *Heavy metal toxicity to microbe-mediated ecologic processes: a review and potential application to regulatory processes*. Environ. Res. No. 36, pp. 111-137.
9. Bartha, R., y R. M. Atlas. (1987). *Transport and transformations of Petroleum: Biological Processes*. In *Long-term Environmental Effects of Offshore Oil and Gas Development*, edit Boesch & N.N. Rabalais. Elsevier Applied Science, new York, pp. 287-341.
10. Beaver, L. D. (1956). *Soil Physics*. John Wiley & Sons, Nueva York. p. 489.
11. Bouwer, E.J., Chen, C.T., y Li, Y.H.. (1992). *Transformation of a Petroleum mixture in Biofilms*. Wat. Sci. Tech., Vol. 26. No. 3-4, pp. 637-646.

12. Bouyoucos, G., J. (1962). *Hydrometer method improved for making particle size analysis of soil*. Agron. J., No. 54, pp. 464-465.
13. Bury, S. J. y C.A. Miller. (1993). *Effect of Micelar Solubilization on Biodegradation Rates of Hydrocarbons*. Environ. Sci. Technol. Vol. 27, pp. 104-110.
14. Cabridenc, R., (1985), *Test to Predict the Environmental Behavior of Chemicals Degradation by Microorganisms in Soil and Water*. Edit. John Wiley & Sons, Ltd. Chapter 4.2, U.S.A.
15. Cartwright, N.A., (1991). *Evaluation of Contaminated Soil Remediation Technologies at Petroleum Refineries*. At the 1991 National Petroleum Refiners Association, Annual Meeting, March, 17-19, Convention Center, San Antonio Texas.
16. Cheng, L. y R. Bray. (1951). Soil Sci., No. 72, p. 449.
17. EPA Method 418.1 (Spectrophotometric, Infrared), 1983, *Petroleum Hydrocarbons, Total Recoverable, Method for Chemical Analysis of Water and Waste*, EPA 60014-79-020, USEPA, Cincinnati, Ohio 45268.
18. EPA METHOD 3540, (1986), Soxhlet Extraction, SW 846, *Test Method for Evaluating Solid Wastes. Office of Solid Waste and Emergency Response*, Washington, DC 20460.
19. Hueseman, M. H., (1994). *Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils*. *Journal of Soil Contamination*. No. 3, Vol. 3, pp. 299-318.
20. Kokub, D., Shafeeq, M., Khalid, Z. M., Hussain A., y Malik, K. A., (1990), *Comparative Studies on Emulsification and Biodegradation of Indigenous Crude Oils by Enriched Bacterial Culture*. *Biorecovery*, Vol 2, pp. 56-68.
21. Leahy, J. G., y Colwell, R.R., (1990). *Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment*. *Microbiological Reviews*, September, Vol. 54, No. 3, pp. 305-315.
22. Lees, Z. M., y Senior, E., (1995), *Bioremediation: a practical solution to land pollution*. *Appl. Envir. Microbiol.* No. 30, pp.1211-145.
23. León, F. R., M. Yañez M., y Jimenez, D. A., (1993). *Los fluidos de perforación y el Medio Ambiente*. *Ingeniería Petrolera*. Diciembre, pp. 17-31.
24. Lui, S. y Sulfita, J. M., (1993). *Ecology and Evolution of Microbial Populations for Bioremediation*. *TIBTECH*, August, Vol. 11, pp. 344-352.
25. Magistad, J. (1945). *Am. Soc. Agron.*, Vol. 21, p. 1045.

26. Mihelcic, J.R., McNally, D.L. y D. R. Lueking. (1995). *Effect of Different Surfactant Concentrations on Naphthalene Biodegradation*. ACS 207th National Meeting (San Diego 3/13-17/94) ACS Symposium Series No. 594, pp. 112-123.
27. Mukerjee, P., y K. J. Mysels. (1971). *Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems*. NSRDS-NBS 36, U.S. Dept. Of Commerce, Washington, D.C.
28. Prince, M., y Y. Sambasivam. (1993). *Bioremediation of Petroleum Wastes from the Refining of Lubricants Oils*. Environmental Progress, Vol. 1, pp. 5-11.
29. Thai, L. T. y W. J. Maier. (1992). *Solubilization and Biodegradation of Octadecane in the Presence of two Comercial Surfactants*. 47th Purdue Industrial Waste Conference, (167).
30. Schollenberger, G. y F. Simon. (1945). Soil Sci., Vol. 59, p. 13.
31. Sundaram, N. S., Sarwar, M., Bang, S.S., y M.R. Islam. (1994). *Biodegradation of Anionic Surfactants in the presence of Petroleum Contaminants*. Chemosphere, Vol. 29, No. 6, pp. 1253-1261.
32. Vo-Dinh, T., (1989). *Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds*. Wiley & Sons, Co., New York, pp. 1-14.
33. Volkering, F., A. M. Breure, J.G. Van Andel, y W.H. Rulkens. (1995). *Influence of Nonionic Surfactants on Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Applied and Environmental microbiology, May, Vol. 61, No. 5, pp. 1699-1705.
34. Walkley A., y E. Black. (1934). Soil Sci., Vol. 73, p. 29.
35. Watts, R. J., y S. E. Dilly, (1996). *Evaluation of Iron Catalysts for the Fenton-like Remediation of Diesel Contaminated Soils*. Journal of Hazardous Materials, Vol. 51, pp. 209-224.
36. West, C. C., y J. H. Harwall. (1992). *Surfactants and Subsurface Remediation*. Environ. Sci. Technol., Vol. 26, pp. 2324-2330.

10. APENDICE.

10.1 APENDICE 1.

Tabla de valores de TPH's para las cinéticas de degradación en presencia del Tergitol NP-10.
Los valores se reportan en ppm.

	TIEMPO (días).									
	0	3	6	9	10	12	15	20	30	40
Envenenado	216,885				192,423			180,009	153,150	160,149
	184,339				158,237			182,852	171,872	222,091
Testigo	153,281	122,260	79,440	113,508	78,259	91,555	76,159	84,296		
	137,140	121,187	78,915	109551	84,164	92,279	66,710	83,290		
	145,488	124,335	113,749	104,484		92,424	95,250			
			116,017				43,799			
		120,987				83,908				
0.1 %	140,615	134,420	122,097	110,661		102,219	103,799			
	147,322	121,295	123,979	106,414		105,839	91,617			
		124,383	122,725	94,350		103,426	105,319			
0.25 %	142,563		90,289		90,289		62,248	58,968		
			89,458		89,458		55,687	73,491		
0.5%	151,137	117,048	69,510	97,197	83,683	67,234	55,468	51,706		
	153,209	116,807	60,047	87,643	54,724	67,089	54,506			
	154,512	123,032	111,915	128,418		76,499	105,645			
			118,382				65,408			
0.75%	162,511		72,441		70,385		53,237	53,762		
			61,067		94,838		65,573	44,838		
1.0%	162,642		78,653		52,887		55,862	41,601	68,898	54,199
	156,474		57,830		57,218		46,632	69,379	75,109	59,799
	183,333				70,079			87,620		
					81,671			58,574		

10.2. APENDICE 2.

Prueba de comparación múltiple de Bonferroni para diferentes concentraciones de surfactante.

Row Mean- Col Mean	1	2	3	4	5	6
2	-96169.4 0.000					
3	-65264.9 0.000	30904.4 0.015				
4	-62686.8 0.000	33482.6 0.005	2578.19 1.000			
5	-100580 0.000	-4410.14 1.000	-35314.6 0.001	-37892.8 0.000		
6	-115438 0.000	-19268.4 1.000	-50172.8 0.000	-52751 0.000	-14858.3 1.000	
7	-70813 0.000	25356.4 0.143	-5548.03 1.000	-8126.22 1.000	29766.5 0.016	44624.8 0.000
8	-112298 0.000	-16128.5 1.000	-47032.9 0.000	-49611.1 0.000	-11718.4 1.000	3139.91 1.000
9	-119308 0.000	-23138.4 0.734	-54042.8 0.000	-56621 0.000	-18728.3 1.000	-3869.96 1.000
10	-107322 0.000	-11152.5 1.000	-42056.9 0.000	-44635.1 0.000	-6742.38 1.000	8115.91 1.000
Row Mean- Col Mean	7	8	9			
8	-41484.9 0.000					
9	-48494.8 0.000	-7009.88 1.000				
10	-36508.9 0.001	4976 1.000	11985.9 1.000			

10.3 APENDICE 3.

Prueba de comparación múltiple de Bonferroni para diferentes tiempos de degradación.

Row Mean- Col Mean	0	3	6	9	10	12
3	-25001.8 1.000					
6	-52630.9 0.001	-27629.2 0.462				
9	-40578.1 0.115	-15576.4 1.000	12052.8 1.000			
10	-70743.1 0.000	-45741.3 0.005	-18112.1 1.000	-30165 0.317		
12	-57651.7 0.001	-32649.9 0.363	-5020.72 1.000	-17073.6 1.000	13091.4 1.000	
15	-72861.1 0.000	-47859.4 0.001	-20230.2 0.887	-32283 0.108	-2118.04 1.000	-15209.5 1.000
20	-82060.5 0.000	-57058.8 0.000	-29429.6 0.116	-41482.4 0.016	-11317.5 1.000	-24408.9 1.000
30	-29123.8 1.000	-4122 1.000	23507.2 1.000	11454.4 1.000	41619.3 0.207	28527.9 1.000
40	-22321.5 1.000	2680.25 1.000	30309.4 1.000	18256.6 1.000	48421.6 0.048	35330.2 0.895

Row Mean- Col Mean	15	20	30
20	-9199.42 1.000		
30	43737.4 0.099	52936.8 0.020	
40	50539.6 0.020	59739 0.004	6802.25 1.000