

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

3

**“PRUEBAS DE BIOTRATABILIDAD DE UN SUELO
CONTAMINADO CON DIESEL MEDIANTE EL USO
DE TEXTURIZANTES ORGÁNICOS”**

297523

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A:

ADRIANA DOMÍNGUEZ ARRIETA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SUSANA SAVAL BOHÓRQUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 suelo, sostiene, soporta, insinúa el camino de la humanidad. Guarda en su superficie o en las oquedades la huella humana, el paso del hombre por su acontecer histórico, social, científico. Es el suelo matriz y mortaja; paradójicamente: el hombre come del suelo: el suelo se come al hombre.

M. en C. Nicolás Aguilera Herrera

DEDICATORIAS

*A mis padres Angel y Alicia, por su gran cariño.
Por el apoyo que siempre me han brindado para continuar
y seguir siempre con la vista al frente.*

*A mis hermanos, Norma Alicia, Angel, Alejandro, Alberto,
Ana María y Araceli Pilar, por su cariño y paciencia.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar hasta el día de hoy.

A mis padres y hermanos por su cariño.

A la Dra. Susana Sava, por su asesoría para la realización de este trabajo y por ser una gran amiga.

Al M. en C. Sergio Palacios y al M. en C. Jorge Romero por su asesoría y comentarios durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Teófilo Herrera, a la Dras. Silke Cram, Christina Siebe y Rosario Iturbe, por el tiempo dedicado a la revisión del trabajo y a sus comentarios.

A Araceli Pérez y Luis F. Vilchis, por su valiosísima colaboración para la realización del presente trabajo.

A Lucy, por brindarme siempre su amistad que considero un gran tesoro.

A todos mis compañeros y amigos del Instituto de Ingeniería, por su gran compañerismo.

CONTENIDO

	<i>Pág.</i>
RESUMEN	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	III
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
I. MARCO TEÓRICO	4
A. CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON DIESEL	4
B. BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS	6
C. EL PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS EN LA BIORREMEDIACIÓN	8
D. PRUEBAS DE BIOTRATABILIDAD	11
E. USO DE COMPOSTA Y DESECHOS AGROINDUSTRIALES EN EL TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS	13
1. CARACTERÍSTICAS DE LA DE COMPOSTA	13
2. DESECHOS AGROINDUSTRIALES COMO AGENTES TEXTURIZANTES	15
F. ADICIÓN DE FERTILIZANTES AL SUELO	18
G. EFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS DE HIDROCARBUROS EN LAS PLANTAS	20
II. ANTECEDENTES	22

III. METODOLOGÍA	25
A. ESTRATEGIA	25
1. ANTECEDENTES DEL SITIO	25
B. DESARROLLO EXPERIMENTAL	26
1. MUESTREO	26
2. CARACTERIZACIÓN INICIAL	27
3. PRUEBAS DE BIOTRATABILIDAD EN EL LABORATORIO	28
a. 1ª etapa experimental	28
b. 2ª etapa experimental	29
C. TÉCNICAS ANALÍTICAS	30
1. CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO	30
2. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL SUELO	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
A. CARACTERIZACIÓN INICIAL	33
1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO	33
2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO	36
B. PRUEBAS DE BIOTRATABILIDAD	37
1. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA PRUEBA TESTIGO	39
a. Evaluación de parámetros químicos	39
b. Evaluación de la biodegradación del contaminante	41
c. Evaluación de parámetros microbiológicos	42
2. 1ª ETAPA EXPERIMENTAL	44
a. Tratamiento con composta	45
b. Tratamiento con fibra de coco	54
c. Efecto del diesel sobre la germinación y crecimiento de semillas	61
3. 2ª ETAPA EXPERIMENTAL	65
a. Evaluación de parámetros químicos	65
b. Evaluación de la biodegradación del diesel	68
c. Evaluación de parámetros microbiológicos	70
d. Efecto del diesel residual sobre la germinación de semillas y crecimiento vegetal	73
4. COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	75

V. CONCLUSIONES	78
VI. RECOMENDACIONES	80
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXO	V

RESUMEN

Antes de aplicar en campo un proceso de biorremediación a suelos contaminados, es conveniente llevar a cabo pruebas de biotratibilidad. En este trabajo se presentan los resultados de pruebas de biotratibilidad, a nivel de mesocosmos, de un suelo contaminado con diesel, utilizando dos tipos de materiales diluyentes: composta y fibra de coco.

Los experimentos se realizaron con un suelo que fue contaminado con diesel aproximadamente 12 años atrás, con una concentración de diesel de $86,926 \text{ mgkg}^{-1}$. Como control se utilizó una muestra de suelo limpio obtenida de un sitio cercano al contaminado. Se realizó la caracterización física, química y microbiológica de ambos suelos. Las pruebas de biotratibilidad se realizaron en recipientes de vidrio de 3 kg de capacidad a 26°C y humedad constante, en 2 etapas. En la primera etapa se realizaron 4 pruebas por triplicado con las siguientes combinaciones: suelo/composta; suelo/composta/fertilizantes; suelo/fibra de coco; suelo/fibra de coco/fertilizantes. En la segunda etapa se realizaron 3 pruebas por cuadruplicado: suelo/composta/fibra de coco, suelo/composta/fibra de coco/fertilizantes, suelo/composta/fibra de coco/harina de hueso. La cantidad de los diluyentes se agregó para tener una concentración de diesel de $30,000 \text{ mg/kg}$. Los fertilizantes (urea y superfosfato triple) se adicionaron para tener una relación $\text{C:N-NH}_4^+:\text{P-PO}_4^{3-}$ de $100:15:0.1$ y $100:10:0.1$, para la primera y segunda etapas, respectivamente. En la segunda etapa se adicionó harina de hueso como fuente de fosfatos y amonio. Se realizaron 2 muestreos, a los 40 y 80 días para evaluar diesel residual, consumo de fosfatos y amonio, consumo de O_2 , producción de CO_2 , cantidad de hongos, levaduras, bacterias amonificantes y bacterias degradadoras. Los resultados fueron comparados con el tiempo cero. Al final de cada tratamiento se evaluó el efecto del diesel residual en la germinación y crecimiento de semillas de alpiste (*Phalaris canariensis* L) y de jitomate (*Lycopersicum esculentum* L). Los resultados obtenidos indican un porcentaje de degradación de diesel en la muestra control del 21.25 % por la gran actividad degradadora de los microorganismos nativos. Los más altos porcentajes de degradación se obtuvieron en los tratamientos: suelo/composta, suelo/composta/fibra de coco/harina de hueso, suelo/composta/fibra de coco y suelo/fibra de coco, de 72.25, 68.48, 63.28 y 60.69 % respectivamente. La adición de fertilizantes no tuvo efecto favorable en la degradación del contaminante, incluso se registró efecto tóxico y/o inhibitorio del nitrógeno sobre los microorganismos. Los porcentajes de germinación y emergencia de *Phalaris canariensis* fueron arriba del 60 % en todos los casos, lo que indica su baja sensibilidad al contaminante, mientras que la especie *Lycopersicum esculentum* fue muy sensible a concentraciones de diesel superiores a $20,000 \text{ mg/kg}$.

LISTA DE TABLAS

	<i>Pág.</i>
Capítulo I	
I.1. Composición de composta madura	14
I.2. Composición de fibra de coco (Burés, 1997)	16
Capítulo IV	
IV.1. Características físicas y químicas de las muestras de suelo	34
IV.2. Nominación para suelos típicos	35
IV.3. Características microbiológicas de las muestras de suelo	37
IV.4. pH y humedad en la prueba testigo	40
IV.5. Actividad respirométrica en la prueba testigo	43
IV.6. pH y humedad de los tratamientos con composta	45
IV.7. Concentración y degradación de diesel durante el tratamiento con composta	50
IV.8. Coeficiente de respiración de los tratamientos con composta	53
IV.9. pH y humedad de los tratamientos con fibra de coco	54
IV.10. Concentración y degradación de diesel durante el tratamiento con fibra de coco	58
IV.11. Coeficiente de respiración de los tratamientos con fibra de coco	60
IV.12. Porcentaje de germinación y emergencia de semillas de alpiste y jitomate en los tratamientos con composta	62
IV.13. Porcentaje de germinación y emergencia de alpiste y jitomate en los tratamientos con fibra de coco	63
IV.14. pH y humedad de los tratamientos combinados	66
IV.15. Concentración y degradación de diesel durante el tratamiento con texturizantes combinados	69
IV.16. Coeficiente de respiración de los tratamientos con texturizantes combinados	72
IV.17. Porcentaje de germinación y emergencia de semillas de alpiste y de jitomate en los tratamientos con texturizantes combinados	74
VI.18. Comparación de los porcentajes de eliminación de diesel de los diferentes tratamientos	76
VI.19. Comparación de los porcentajes de germinación y emergencia de semillas en los diferentes tratamientos	77

LISTA DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Capítulo I	
I.1. Vías metabólicas de biodegradación de n-alcanos (Britton, 1984)	10
I.2. Integración de las rutas degradativas de algunos compuestos aromáticos (Saval, 2000)	11
Capítulo III	
III.1. Tanque de almacenamiento de diesel y aspecto del suelo contaminado	26
III.2. Imagen tridimensional de la distribución de la mancha de contaminación	27
Capítulo IV	
IV.1. Concentración de N-NH ₄ ⁺ y nitrógeno total residual en la prueba testigo	40
IV.2. Concentración de P-PO ₄ ³⁻ residual en la prueba testigo	41
IV.3. Evolución de la degradación de diesel en la prueba testigo	41
IV.4. Porcentaje de eliminación de diesel en la prueba testigo	42
IV.5. Vista superior de las unidades experimentales correspondientes a la 1ª etapa: testigo; suelo/composta (SC); suelo/composta/fertilizantes (SCF); suelo fibra de coco (SFc); suelo/fibra de coco/fertilizantes (SFcF)	44
IV.6. Concentración de N-NH ₄ ⁺ residual en las pruebas con composta	46
IV.7. Concentración de nitrógeno total residual en los tratamientos con composta	47
IV.8. Concentración de P-PO ₄ ³⁻ residual en los tratamientos con composta	47
IV.9. Evolución de la degradación de diesel durante el tratamiento con composta	48
IV.10. Porcentaje de eliminación de diesel en las pruebas con composta	49
IV.11. Perfiles cromatográficos de diesel estándar y del suelo tratado con composta	49
IV.12. Concentración de bacterias degradadoras de diesel en los tratamientos con composta	51
IV.13. Microorganismos presentes en las muestras tratadas con composta	52
IV.14. Evolución de la actividad respirométrica en los tratamientos con composta	53
IV.15. Concentración de N-NH ₄ ⁺ residual en los tratamientos con fibra de coco	55
IV.16. Concentración de nitrógeno total residual en los tratamientos con fibra de coco	55
IV.17. Concentración de P-PO ₄ ³⁻ residual en los tratamientos con fibra de coco	56
IV.18. Evolución de la degradación de diesel durante el tratamiento con fibra de coco	57
IV.19. Porcentaje de eliminación de diesel en los tratamientos con fibra de coco	57

IV.20. Concentración de bacterias degradadoras de diesel en los tratamientos con fibra de coco	58
IV.21. Microorganismos presentes en los tratamientos con fibra de coco	59
IV.22. Evolución de la actividad respirométrica de los tratamientos con fibra de coco	60
IV.23. Germinación y emergencia de semillas de a) alpiste (<i>Phalaris canariensis</i>) y b) jitomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>) en suelo contaminado sometido a:	63
IV.24. Vista superior de las unidades experimentales correspondientes a la 2ª etapa: suelo/composta/fibra de coco (FcC); suelo/composta/fibra de coco/fertilizantes (FcCF); suelo/composta/fibra de coco/harina de hueso (FcCH);	65
IV.25. Concentración de $N-NH_4^+$ residual en los tratamientos con texturizantes combinados	66
IV.26. Concentración de nitrógeno total residual en los tratamientos con texturizantes combinados	67
IV.27. Concentración de $P-PO_4^{3-}$ residual en los tratamientos con texturizantes combinados	68
IV.28. Evolución de la degradación de diesel durante el tratamiento con texturizantes combinados	68
IV.29. Porcentaje de eliminación de diesel en los tratamientos con texturizantes combinados	69
IV.30. Concentración de bacterias degradadoras de diesel en los tratamientos con texturizantes combinados	70
IV.31. Microorganismos presentes en los tratamientos con texturizantes combinados	71
IV.32. Evolución de la actividad respirométrica de los tratamientos con texturizantes combinados	71
IV.33. Germinación y emergencia de semillas de a) alpiste (<i>Phalaris canariensis</i>) y b) jitomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>) en suelo contaminado sometido a:	75

INTRODUCCIÓN

El rápido avance en la industrialización y tecnología junto con cambios en el manejo de los recursos naturales han ocasionado no solamente ventajas a la sociedad humana, sino también, enormes problemas ambientales. Entre éstos, se han incrementado los derrames y fugas de hidrocarburos refinados del petróleo a suelos y cuerpos de agua superficiales y subterráneos. En México, tan sólo durante el período de junio de 1990 a diciembre de 1995 se registraron 36 accidentes en los que el diesel estuvo presente, y 110 para el período de 1993 a 1996.

Existen muchas alternativas para la limpieza de los sitios que han sido impactados por derrames de hidrocarburos. Una alternativa de saneamiento con importante auge a nivel mundial es la biorremediación. Esta tecnología se basa en la capacidad de los microorganismos para transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos y deseablemente inocuos al ambiente. Algunos compuestos, como los hidrocarburos, pueden llegar a ser completamente mineralizados. Sin embargo, antes de aplicar en campo un proceso de biorremediación a suelos contaminados, es conveniente llevar a cabo estudios de biotratibilidad.

A través de los estudios de biotratibilidad es posible obtener información sobre aspectos como: el potencial de los microorganismos nativos para degradar los contaminantes, los niveles máximos de limpieza que se pueden alcanzar en un suelo en particular, la detección de algún componente tóxico para la actividad microbiana, y las condiciones microambientales propicias para la biorremediación.

Las pruebas de biotratibilidad son determinantes para responder a la posibilidad de aplicar biorremediación en un suelo contaminado en particular. La capacidad de biodegradación de los microorganismos depende de las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo y de las propiedades químicas del contaminante. Con base en la información de la caracterización del sitio y las condiciones óptimas de degradación se puede determinar la factibilidad de una tecnología de biorremediación para un sitio específico.

La utilización de composta y desechos agroindustriales como la fibra de coco, ha sido propuesta por varios autores como una solución a bajo costo y tecnológicamente aceptable para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

A pesar de que la biorremediación ha tomado importante auge y que de hecho se aplica en campo a escala real, existe poca literatura referida al procedimiento adecuado para realizar las pruebas de biotratabilidad a escala laboratorio, de ahí la necesidad de realizar más trabajos enfocados en la realización de este tipo de estudios que sirvan como base para la realización de proyectos de biorremediación, y que los resultados obtenidos en ellas puedan ser escalados más eficazmente a otros niveles de operación, al predecir lo que pueda ocurrir en campo durante el proceso de biorremediación de un suelo contaminado.

Se ha venido trabajando en el laboratorio de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería con suelos contaminados con diesel, buscando alternativas amables al ambiente y eficientes en la reducción de los niveles de contaminantes, la realización de este proyecto contribuye a las investigaciones que se están realizando.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Implementar pruebas de biotratabilidad, a nivel de laboratorio, de un suelo contaminado con diesel mediante el uso de texturizantes orgánicos

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de dos diluyentes y texturizantes en el suelo contaminado
- Cuantificar la degradación de diesel
- Observar la evolución de las comunidades microbianas presentes en el suelo
- Cuantificar el consumo de nutrientes durante el tratamiento
- Evaluar el efecto del diesel residual al final del tratamiento sobre la germinación de semillas y emergencia de las plántulas.

I. MARCO TEÓRICO

Los derrames accidentales de hidrocarburos en suelos y acuíferos son una inevitable consecuencia de las actividades propias de la industria petrolera como son: extracción, refinación, transporte, distribución, almacenamiento y comercialización de combustibles; además de otras industrias como son: fabricación de pinturas, hules y pegamentos, industrias electrónica y mecánica (Saval, 1995). Estos derrames han impactado al ambiente causando la contaminación de grandes extensiones de suelo y el deterioro de los cuerpos de agua superficiales y subterráneos. Las consecuencias ecológicas de esta contaminación varían dependiendo de la magnitud del derrame, la composición química de los contaminantes y la naturaleza del ecosistema contaminado (Atlas, 1981; Frankenberger, 1988).

Las autoridades y compañías de muchas ciudades industriales están haciendo grandes esfuerzos para establecer técnicas eficientes y razonables para la remediación de sitios que han sido contaminados con diferentes tipos y cantidades de hidrocarburos (Kästner *et al.*, 1995).

A. CONTAMINACIÓN DEL SUELO CON DIESEL

La industria ferroviaria es una de las principales fuentes de contaminación por diesel en suelo. El diesel es usado como combustible para locomotoras, por lo que millones de galones son almacenados y transportados como parte de las operaciones cotidianas. Sin embargo, esta industria no es la única fuente de contaminación con diesel, ya que éste es también ampliamente usado como combustible para generadores de energía eléctrica y como disolvente para la limpieza de partes automotrices (Dineen, 1992).

El diesel es producido en columnas fraccionadoras como un destilado medio de hidrocarburos del petróleo. La composición química específica y las propiedades de destilación varían dependiendo de las características del crudo a partir del cual se destilan. Sin embargo, es bien sabido que el diesel es una mezcla compleja de diferentes hidrocarburos con un número de carbonos de 9 a 20, predominantemente, y tiene un punto de ebullición de 282-338 °C. Las parafinas (alcanos normales, ramificados y cíclicos) son los componentes más abundantes del diesel (entre el 65 y 85 %), predominando los de sustitución mono, di y

trimetil, dentro de ésta categoría están el pristano (2,6,10,14-tetrametil pentadecano) y fitano (2,6,10,14-tetrametil hexadecano), ya que están presentes normalmente en concentraciones significativas y pueden ser identificados fácilmente por cromatografía de gases.

Los componentes aromáticos están presentes en el diesel en un 10 a 30 %, incluyendo compuestos mono y poliaromáticos (Block *et al.*, 1991). Debido a la forma de producción del diesel son removidos durante la destilación todos los hidrocarburos de bajo peso molecular (C1 a C8), además de la mayoría de los compuestos aromáticos volátiles como benceno, tolueno, xileno y etilbenceno, y compuestos poliaromáticos (HPA's) que tienen un punto de ebullición más alto. Únicamente están presentes en el diesel, en concentraciones variables, los HPA's de menor peso molecular como naftaleno, 2-metilnaftaleno y fenantreno, y aromáticos con presión de vapor más baja como el tolueno (Dineen, 1992).

Aunque el diesel en suelos no es realmente una amenaza ambiental en términos de riesgo a la salud, el combustible puede migrar a los acuíferos subterráneos que abastecen a las comunidades e impactarlos. Los componentes individuales del diesel en agua sí podrían tener efectos a la salud. De los componentes aromáticos volátiles el tolueno es el que se encuentra más frecuentemente en el diesel y es el de más alto riesgo debido a la inhalación de los vapores. De los hidrocarburos poliaromáticos, los que comúnmente se encuentran en diesel y tienen más alto riesgo a la salud por ingestión son naftaleno, 2-metilnaftaleno y fenantreno. Sin embargo, cuando existe baja concentración de estos compuestos en el diesel presente en el suelo, el riesgo resulta ser extremadamente bajo, por tanto, los requerimientos para la remediación y los criterios específicos de limpieza se basan más en la protección de la calidad de las aguas subterráneas (Block *et al.*, 1991; Dineen, 1992).

Las alternativas de remediación de suelos contaminados con diesel son, básicamente, las mismas que para cualquier suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo, pero las características del diesel en relación con otros productos del petróleo como su baja volatilidad, bajo riesgo a la salud, baja viscosidad, y mayor facilidad de biodegradación permiten una mayor amplitud de opciones de tratamiento, entre ellas, la biorremediación, que es la alternativa más ampliamente aplicada (Dineen, 1992).

B. BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

La biorremediación es una de las tecnologías novedosas más prometedoras para el tratamiento de suelos y acuíferos contaminados con compuestos orgánicos, ya que puede ser llevada a cabo a un bajo costo y constituir una forma eficiente para la destrucción de compuestos considerados como peligrosos y que están presentes en sitios donde han ocurrido derrames de hidrocarburos. Es un proceso en el que intervienen microorganismos con capacidad para transformar gran variedad de contaminantes orgánicos del suelo en compuestos menos tóxicos, algunos compuestos como los hidrocarburos pueden ser completamente mineralizados.

En las tecnologías de biorremediación se explota la capacidad de aclimatación que los microorganismos han desarrollado bajo las condiciones que imperan en el sitio contaminado. Dichas condiciones pueden llegar a ser adversas para su supervivencia, pero las diferentes poblaciones se adaptan entre sí interactuando de manera sinérgica con la cual se logra la degradación del contaminante (Saval, 1995). Participan los microorganismos nativos del suelo, principalmente bacterias, hongos y levaduras, que requieren nutrimentos esenciales para sobrevivir, tales como nitrógeno, fósforo, azufre y elementos traza; así como fuentes de carbono y energía, éstas últimas pueden ser los propios contaminantes (USEPA, 1991a).

Existen varios tipos de tecnologías que pueden ser aplicadas para la biorremediación de suelos y acuíferos contaminados, como son:

- 1) **Bioestimulación.** Adición de estimulantes de la actividad de la comunidad microbiana autóctona como nutrimentos esenciales, co-sustratos o aceptores finales de electrones.
- 2) **Bioaumentación.** Inoculación de microorganismos al sitio contaminado cuando la población autóctona carece de capacidad degradadora, o está en muy baja proporción.
- 3) **Bioventeo.** Suministro de oxígeno a través del suelo para su aprovechamiento como aceptor final de electrones por la población microbiana aerobia nativa o exógena.
- 4) **Biolabranza.** Tratamiento en fase sólida; generalmente se realiza extendiendo el suelo sobre superficies amplias para favorecer la aireación natural.
- 5) **Biosorción o bioacumulación.** Uso de microorganismos con afinidad para absorber metales bajo ciertas condiciones, generalmente se aplica en fase líquida.

- 6) **Bioconversión o biotransformación.** Uso de microorganismos con capacidad para transformar compuestos tóxicos a entidades químicas inocuas
- 7) **Biocomposteo.** El material contaminado se coloca sobre la superficie del terreno en forma de pilas que se cubren para crear condiciones termófilas, periódicamente se mezcla para favorecer la aireación (Korda *et al.*, 1977; Saval, 1995).

Para llevar a cabo un proceso de biorremediación de una manera adecuada se requiere realizar los siguientes pasos:

Investigación y caracterización del sitio contaminado. El conocimiento de las características del sitio permite determinar el potencial de biorremediación del mismo y nos permite predecir el comportamiento y destino de los contaminantes en el suelo. Una adecuada caracterización del sitio incluye: localización del sitio, extensión y profundidad de la contaminación, tipo de suelo, textura, humedad, y pH, entre otros.

Identificación de los contaminantes. El éxito de la biorremediación depende grandemente en la identificación del tipo de contaminante presente, ya que de esta manera se puede obtener más información del mismo, como es su composición química, concentración, toxicidad, biodisponibilidad, solubilidad, sorción (Sims *et al.*, 1990).

Caracterización microbiológica del suelo. Las características microbiológicas del suelo indican si el sitio tiene una comunidad viable que pueda llevar a cabo la biodegradación del contaminante, para esto es importante determinar la distribución, el tipo y el número de microorganismos presentes en el suelo (Rogers *et al.*, 1993).

Pruebas de Biotratibilidad. Estos estudios se llevan a cabo para evaluar la capacidad degradadora de los microorganismos, mediante el estudio de cinéticas de la biodegradación del contaminante (Sims *et al.*, 1990; Rogers *et al.*, 1993; Huesemann, 1994; Gruiz and Kriston, 1995).

Existe una gran cantidad de compuestos contaminantes que pueden ser tratados por biorremediación, entre ellos están: hidrocarburos del petróleo; materiales del tratamiento de la madera como creosota y pentaclorofenol; solventes como acetona, cetonas y alcoholes; y compuestos aromáticos como benceno, tolueno, xilenos y fenoles (USEPA, 1991b). No obstante, se debe entender que cada suelo tiene características físicas, químicas y biológicas diferentes y que no existen reglas generales para que los microorganismos se adapten a cualquier hábitat en particular (Saval, 2000).

C. EL PAPEL DE LOS MICROORGANISMOS EN LA BIORREMEDIACIÓN

El suelo es un sistema altamente complejo, caracterizado por tener una variedad de procesos físicos, químicos y biológicos que son influenciados por factores ambientales. Los microorganismos que habitan el suelo, junto con las enzimas extracelulares, conducen las reacciones metabólicas, por lo que juegan un papel muy importante en la descomposición de la materia orgánica y en los ciclos de los nutrientes esenciales. La integridad de la capacidad metabólica de la microbiota es requisito fundamental para cualquier concepto de protección, biorremediación y regeneración del suelo (Alef y Nannipieri, 1995).

La aplicación de la biorremediación requiere el entendimiento de las interrelaciones de las funciones microbianas, e involucra la optimización y control de procesos de transformaciones bioquímicas de materia y energía, las cuales requieren de catalizadores que, en estos sistemas biológicos, están constituidos por enzimas sintetizadas por los propios microorganismos. La biorremediación es, por tanto, una manipulación controlada del ambiente que permita a los microorganismos generar las enzimas apropiadas para catalizar las reacciones que conduzcan a la biodegradación de los contaminantes (Cookson Jr., 1995).

Los microorganismos pueden llegar a ser altamente especializados ya que poseen una amplia versatilidad bioquímica, que les permite adaptarse a diferentes condiciones microambientales y aun a condiciones extremas, por ello juegan un papel muy específico en la mineralización de los compuestos orgánicos (Bonaventura and Johnson, 1997; Saval, 2000). La capacidad de los microorganismos para degradar compuestos orgánicos complejos es principalmente un reflejo de su versatilidad bioquímica (Cookson Jr., 1995). Cuando el suelo está expuesto a contaminantes como los hidrocarburos del petróleo, sobreviven especies de bacterias que utilizan estos contaminantes como fuente de carbono y energía, degradándolos hasta CO_2 , agua y ácidos orgánicos (Atlas, 1981).

Existen dos tipos de metabolismo dependiendo del tipo de aceptor de electrones: fermentación cuando tiene un origen orgánico y respiración cuando es inorgánico. Así mismo, existen dos tipos de respiración, aerobia cuando el aceptor de electrones es oxígeno molecular y anaerobia cuando el aceptor de electrones es un compuesto orgánico oxidado como nitratos, sulfatos o bióxido de carbono.

La vía metabólica preferida para la degradación de hidrocarburos es la aerobia, debido a que los hidrocarburos son compuestos no oxidados (Lim, 1998).

La ruta inicial por la cual los microorganismos comienzan el proceso de obtención de energía es la glicólisis (ciclo de Emden-Meyerhof-Parnas), el cual acarrea glucosa y otros azúcares a un intermediario como es el piruvato. Otros compuestos con características químicas diferentes (aminoácidos y ácidos grasos) tienen diferentes rutas de degradación, pero todas llegan al mismo intermediario, acetil CoA. Cuando el metabolismo es aerobio, se siguen tres rutas degradativas: el ciclo del ácido cítrico, cadena de transporte de electrones, y fosforilación oxidativa. La presencia de oxígeno molecular es imperativa para la fosforilación oxidativa, constituye el mecanismo más importante para la obtención de la energía necesaria para la actividad celular, y si el proceso llega hasta la producción de bióxido de carbono, es indicativo de una completa mineralización.

Las enzimas necesarias para la degradación de compuestos orgánicos son sintetizadas solamente cuando está presente la información genética específica para la degradación del sustrato de interés (Gibson y Subramanian, 1984).

El proceso de biodegradación se lleva a cabo de manera natural en el suelo, sin embargo, algunas condiciones del medio pueden disminuir o detener el proceso de biodegradación. Estas condiciones incluyen: la inherente biodegradabilidad de los contaminantes, la biodisponibilidad de la fuente de energía y carbono, que deseablemente es el propio contaminante, que la cantidad de microorganismos degradadores sea suficiente y que dichos microorganismos expresen suficiente actividad catabólica, que haya un contacto adecuado microorganismo-sustrato, que sea baja o nula la toxicidad del contaminante, que haya un adecuado pH en el suelo, que exista un flujo ilimitado de elementos nutritivos (macronutrientes: N y P; micronutrientes: elementos traza, S) o de aceptores finales de electrones (oxígeno, nitratos, sulfatos), una buena disponibilidad de agua, condiciones de temperatura adecuadas y ausencia de metales pesados que inhiban la actividad microbiana (Nely, 1990; Sims *et al.*, 1990; Romantschuk *et al.*, 2000).

Biodegradación de Hidrocarburos Alifáticos

Entre los microorganismos que pueden utilizar hidrocarburos para su crecimiento están *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium* y algunos hongos y levaduras. El paso inicial de la degradación de este tipo de hidrocarburos es la oxidación, durante la cual uno de los átomos de la molécula de oxígeno (O₂) se incorpora al hidrocarburo oxidado. Esta reacción es llevada a cabo por monooxigenasas. El producto final de la secuencia de reacciones es acetil-CoA (Fig. 1.1). Sin embargo, la oxidación inicial no en todos los casos es en el carbono terminal, algunas veces ocurre en el segundo carbono, y las reacciones subsecuentes son

diferentes. Los hidrocarburos alifáticos insaturados que tienen un doble enlace terminal, son no refractarios a la degradación anóxica y pueden ser degradados por ciertas bacterias sulfato-reductoras y otras bacterias anaerobias (Britton, 1984; Lim, 1998).

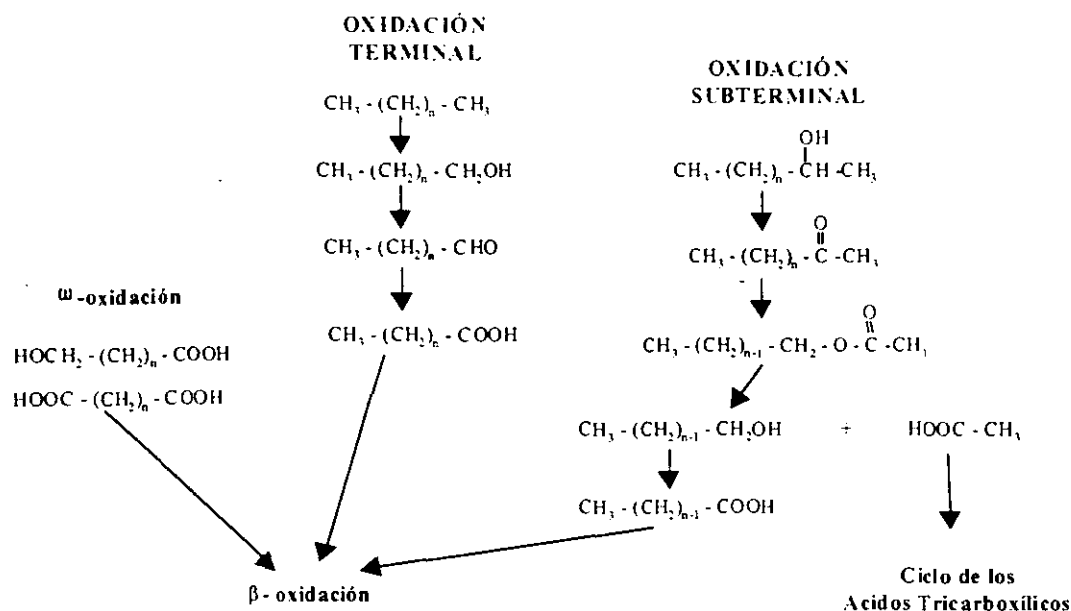


Fig. I.1. Vías metabólicas de biodegradación de n-alcenos (Britton, 1984)

Biodegradación de Hidrocarburos Aromáticos

Muchos hidrocarburos aromáticos pueden ser usados de manera aerobia como donadores de electrones, de los cuales las bacterias del género *Pseudomonas* son las más estudiadas. El metabolismo de estos compuestos, algunos de los cuales son muy complejos, frecuentemente se inicia con la formación de protocatecato o catecol, dependiendo del compuesto. Estos compuestos de un solo anillo, son conocidos como sustratos iniciadores debido a que el catabolismo oxidativo se lleva a cabo únicamente después de que las moléculas aromáticas complejas han sido convertidas a formas más simples.

El protocatecato y el catecol pueden entonces continuar siendo degradados hasta compuestos que puedan incorporarse al ciclo del ácido cítrico, como el succinato, acetil CoA y piruvato (Fig. I.2). Varios pasos del catabolismo de hidrocarburos aromáticos requieren de oxigenasas (Gibson and Subramanian, 1984; Lim, 1998).

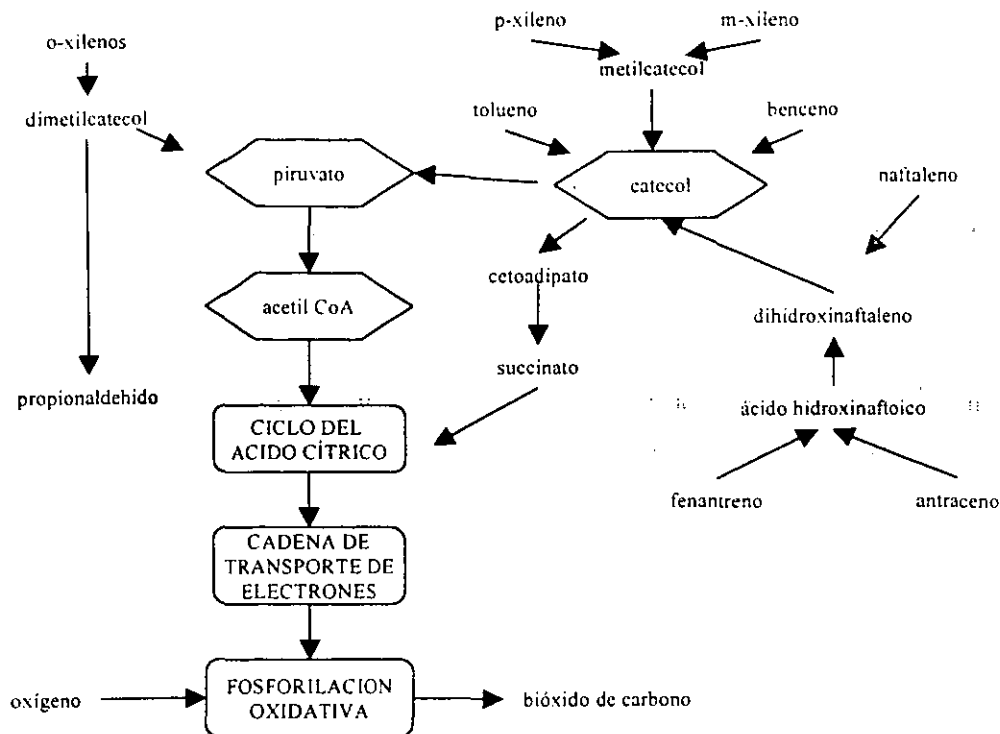


Fig. 1.2. Integración de las rutas degradativas de algunos compuestos aromáticos (Saval, 2000)

D. PRUEBAS DE BIOTRATABILIDAD

Para muchos estudios de biorremediación es un prerrequisito llevar a cabo estudios de biotratibilidad, con ellos se pretende obtener información específica concerniente al potencial de aplicación de la biorremediación para un sitio determinado; se complementan con la información del sitio y las características del contaminante. De esta manera se puede hacer una comparación con otras alternativas de remediación, considerando factores como: la factibilidad de llevarla al campo, seguridad en la operación, aspectos ambientales, tiempo necesario para llevarlo a cabo y costos (Rogers *et al.*, 1993; Cookson Jr., 1995). La información que proporcionan los estudios de tratibilidad (USEPA, 1991a; Gruiz and Kriston, 1995) es la siguiente:

- si los contaminantes del suelo son potencialmente degradables,
- si alguno de los contaminantes es potencialmente tóxico para el proceso de degradación microbiana.

- si se debe realizar un tipo de tratamiento previo a la biorremediación,
- los niveles de limpieza que se pueden alcanzar en cada sitio en particular.
- las características microbiológicas del sitio (por ejemplo, si predominan microorganismos aerobios o anaerobios),
- si el ambiente es apropiado para la biorremediación o se deben ajustar las condiciones ambientales.

En muchos casos, las condiciones ambientales pueden ser alteradas para favorecer el proceso de biodegradación, por ejemplo la remoción previa de metales tóxicos o cambios en el contenido de humedad. Si el nitrógeno y fósforo no están en los niveles adecuados, éstos pueden ser adicionados para optimizar la actividad de los microorganismos. Si la concentración de los contaminantes es tan alta que inhibe la actividad microbiológica, se pueden adicionar agentes que diluyan la contaminación y así reducir la toxicidad de manera que pueda llevarse a cabo la biodegradación del contaminante (USEPA, 1991a). En muchas ocasiones los contaminantes provocan una reducción en el pH del suelo, por lo que se debe ajustar a niveles donde puedan actuar los microorganismos, esto es entre 6.5 y 8.5 si se trata de bacterias (USEPA, 1991b; Huesemann, 1994; Cookson Jr., 1995).

El seguimiento de las pruebas de biotratibilidad (USEPA, 1991a) incluye:

- Determinar el grado de reducción de los contaminantes en el suelo, mediante un monitoreo periódico
- Determinar el consumo de los aceptores de electrones y de nutrimentos esenciales
- Medición de la producción de biogás (CO₂)
- Cuenta de microorganismos degradadores

Los estudios de biotratibilidad se llevan a cabo a cualquier nivel de operación, algunos son proyectos sencillos a nivel microcosmos que generalmente se realizan en lote con volúmenes muy pequeños de muestra, en viales de vidrio transparente o ámbar, sellados herméticamente con septos y anillos de aluminio. Esto permite un mejor control de las variables, incluso del espacio gaseoso; tienen duración de una semana o menos y de ellos se puede obtener información acerca del potencial de degradación de un contaminante o de la presencia de microorganismos nativos degradadores. Los estudios a escala semipiloto o piloto que se realizan en el laboratorio a nivel mesocosmos, en jarras o charolas, o bien a escala de demostración en campo, consisten en la aplicación del esquema de tratamiento propuesto a una pequeña porción del sitio que pueden llevar varios meses de operación (Sims *et al.*, 1990).

La necesidad de una prueba de tratabilidad y la elección del nivel de tratamiento requieren tomar decisiones en las que el tiempo y costo necesarios para llevar a cabo el estudio estén balanceados y protegidos contra el riesgo inherente de la decisión (ej. selección de una inapropiada alternativa de tratamiento). Los estudios se realizan en una fase o bien divididos en 2 o más fases, estos tienen la ventaja de que se usan los resultados de la primera fase para cambiar o confirmar el diseño experimental propuesto para la siguiente fase, aunque tiene la desventaja de requerir aún más tiempo (USEPA, 1991b).

Todos los estudios de tratabilidad requieren el uso de controles, independientemente de su simplicidad y éstos no deben ser omitidos, ya que se usan para establecer la base de comparación de las variables a evaluar. Tales controles son: a) control negativo, donde se maneja el suelo con las condiciones naturales del sitio, y b) control positivo, que involucra la inoculación de cepas microbianas que ya hayan sido probadas.

E. USO DE COMPOSTA Y DESECHOS AGROINDUSTRIALES EN EL TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS

Los métodos comunes de biorremediación en general son lentos, requieren de varios meses o incluso años para alcanzar los niveles deseados, lo que incrementa los costos y desalienta su uso. Las investigaciones recientes indican que la adición de composta, así como de agentes "abultantes" como: paja, estiércol, aserrín, fibra de coco, entre otros (Huesemann, 1996; Safferman, 1998), es una solución de bajo costo y tecnológicamente aceptable para el tratamiento de desechos industriales sólidos o líquidos: para la remediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos tóxicos (como solventes y plaguicidas) y compuestos inorgánicos (como metales tóxicos) (USEPA, 1997, 1998).

I. CARACTERÍSTICAS DE LA COMPOSTA

Hay un gran número de hidrocarburos que se degradan rápidamente durante el composteo o en otros procesos basados en composta (USEPA, 1997, 1998). Cole (1998) indica que la adición de composta madura, generalmente resulta más económico que el composteo mismo.

La composta funciona principalmente como un acondicionador de suelos, debido a su contenido de materia orgánica, la cual mejora la forma en la que el agua interactúa con el suelo, esto incrementa la capacidad de retención de agua y mejora la estructura tanto de suelos arcillosos como arenosos. La composición de la composta de acuerdo a su origen se presenta en la Tabla I.1.

La adición de composta madura al suelo, o en biopilas, puede disminuir drásticamente los tiempos de saneamiento, ya que inocula al suelo con un gran número de microorganismos benéficos, especialmente bacterias y hongos (Biddlestone and Gray, 1994) esto incrementa grandemente las poblaciones microbianas y su actividad. Debido a que los microorganismos son los agentes primarios para la degradación de contaminantes orgánicos en suelo (Alexander, 1994), el incremento en la densidad microbiana puede acelerar la degradación de los contaminantes (Cole, 1994; Kästner *et al.*, 1995). En el suelo, la composición microbiana se modifica por la presencia de compuestos orgánicos que lo contaminan (Struwe, 1986; Martín, 1992; USEPA, 1998). Kästner *et al.* (1995), en un estudio realizado con diesel, corroboraron que la actividad biológica de la composta favorece la transformación de los hidrocarburos, ya que observaron incremento en la mineralización con adición de composta.

Tabla I.1. Composición de composta madura

PARÁMETRO	COMPOSICIÓN (% PESO SECO)	
	ORIGEN	
	desechos municipales	desechos de vegetales
Materia orgánica	25	80
Carbón orgánico	8	50
Nitrógeno (N)	0.4	3.5
Fósforo (P ₂ O ₅)	0.3	3.5
Potasio (K ₂ O)	0.5	1.8
Calcio (CaO)	7.0	1.5

Tomado de Biddlestone and Gray, 1994.

La matriz orgánica sólida de la composta parece ser esencial para favorecer la degradación, ya que la microbiota que se desarrolla en la composta está bien adaptada a sustancias húmicas, estos microorganismos parece que son los responsables para la degradación de hidrocarburos.

La adición de composta a un suelo contaminado puede intensificar la degradación de hidrocarburos, incrementa la biodisponibilidad, retiene ciertos compuestos volátiles y los nutrientes vegetales que contiene sirven como fertilizante. Además, sirve como activador de mecanismos de degradación cometabólica de

compuestos xenobióticos, especialmente de hidrocarburos poliaromáticos de alto peso molecular cuyas rutas metabólicas no son conocidas (Kästner and Mahro, 1996).

La adición de composta para la biorremediación más que cualquier tecnología de limpieza, da como producto final un suelo enriquecido que tiene mejores condiciones que antes de ser contaminado (Cole, 1984).

El objetivo final de un proceso de biorremediación es disminuir el contenido de contaminación a niveles que no representen un riesgo, tratando de regresar al sitio a su condición original, es decir, previa a la contaminación, lo cual, en ocasiones, incluye reforestar para estabilizar el suelo tratado; en este caso la composta favorece el crecimiento vegetal al suministrar condiciones y nutrimentos para una amplia variedad de plantas (USEPA, 1997).

2. DESECHOS AGROINDUSTRIALES COMO AGENTES TEXTURIZANTES

La adición de agentes texturizantes o "abultantes" a suelos contaminados ha tenido efectos benéficos en los procesos de tratamiento. En suelos altamente arcillosos, la adición de estos agentes facilita la disgregación de agregados, lo que favorece la aireación, facilita el drenaje del exceso de agua y pueden ser usados también para controlar la humedad. La cantidad del agente adicionado depende de su disponibilidad y su costo (Huesemann, 1996; USEPA, 1997).

Muchos de estos materiales son subproductos de actividades agrícolas o industriales que encuentran, así, una aplicación y contribuyen además a una mejora en la calidad ambiental, tales materiales pueden ser: orujos de vinificación, corteza o acículas de pino, paja, heno, aserrín, fibra de coco, bagazo de caña, cascarilla de arroz, de centeno y trigo (Burés, 1997). Debido a que son materiales de baja densidad, cuando éstos son agregados al suelo incrementan la porosidad, lo que favorece la difusión de oxígeno y el movimiento de agua en el suelo, estos cambios incrementan la actividad microbiana (Rykerd *et al.*, 1999).

Los agentes "abultantes" además de incrementar la degradación de hidrocarburos, pueden reducir los tiempos necesarios para remediar un suelo contaminado. Aparentemente, el incremento en la biodegradación provocado por estos agentes se debe a que reducen el tamaño de los agregados saturados de hidrocarburos, exponiendo más el hidrocarburo a los sitios activos de los microorganismos (Rykerd *et al.*, 1999). Esto es lo que se conoce como un mejor contacto microorganismo-contaminante.

Fibra de coco

La fibra de coco es un subproducto que se encuentra disponible en grandes cantidades en los países productores de coco (*Cocos nucifera*), situados en los trópicos. Los subproductos resultantes del desfibrado de la nuez de coco proceden del mesocarpio de la misma y consisten en fibras largas, restos de fibra y polvo, de aspecto similar a la turba, que se acumulan como residuo.

La fibra de coco consiste en partículas de lignina y celulosa con una relación C/N de 80, este material tiene elevada capacidad de retención de agua, lo que mejora la retención de agua del suelo a tratar, aumenta la disponibilidad de nutrientes y la tasa de filtración, la porosidad total y la conductividad hidráulica de los suelos donde se utiliza tradicionalmente para mejorar sus propiedades. Tiene elevado contenido de potasio, por lo que puede ser utilizada en el campo como fuente rica en potasio, aunque tiene bajo contenido de otros nutrientes. En la Tabla I.2 se sintetizan algunas de sus características.

Tabla I.2. Composición de la fibra de coco (Burés, 1997)

PARÁMETRO	INTERVALO
PH	4 - 5
Materia orgánica (%)	85 - 95
Capacidad de intercambio catiónico (meq/100 g)	20 - 30
Porosidad total (%)	< 80
Densidad (kg/m ³)	50 - 100

La alta porosidad de la fibra de coco permite una aireación y una conductividad hidráulica muy elevadas (Burés, 1997).

Acículas de pino

En algunas zonas forestales con predominancia de ciertas especies arbóreas puede existir una disponibilidad uniforme de acículas de pino. Se han utilizado en muchos países como enmienda o componentes de sustrato. Son materiales con una porosidad del 93 %, con capacidad de aireación muy elevada, del 47 %, con una densidad de entre 100 y 200 kg de materia seca/m³ y el pH está entre 3.9 y 5.5.

Aserrín o virutas de madera

Constituye subproductos de la industria aserradora. Se descomponen muy lentamente debido al elevado contenido de lignina y compuestos lignocelulósicos. Tiene una relación C/N muy elevada. Este material tiene una alta capacidad de retención de agua, lo que aumenta la tasa de filtración y la disponibilidad de nutrimentos. Las características químicas varían dependiendo de la especie, pero en general el contenido de nutrimentos es bajo y su pH varía entre 3.5 y 4 (Bureš, 1997).

Paja de cereales

Procede del beneficio de los granos. Las características de la paja difieren de acuerdo con la especie, pero tiene una elevada capacidad de aireación. Está constituida por celulosa, hemicelulosa, y es un material rico en lignina y pobre en nitrógeno, por lo que su descomposición es difícil (Staniforth, 1986; Gros y Domínguez, 1992).

Bagazo de caña

Consiste en las fibras procedentes de los restos de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) una vez que se procesa en los ingenios azucareros. Contiene bajo contenido de nitrógeno y es rica en azúcares residuales. Se puede usar en mezcla con corteza de pino.

Cascarilla de arroz

Está formada por las glumillas adheridas al grano de arroz (*Oryza sativa*) y es subproducto del descascarillado de éste. Es un material ligero, su densidad aparente es entre 90 y 220 kg de materia seca m³, su porosidad es elevada, por lo que la permeabilidad es alta, presenta una elevada capacidad de retención de agua lo que favorece la aireación. El pH es neutro, tiene una conductividad eléctrica y capacidad de intercambio catiónico bajos. Es un material rico en potasio y fósforo, pero pobre en nitrógeno (Bureš, 1997).

F. ADICIÓN DE FERTILIZANTES AL SUELO

Los microorganismos requieren nitrógeno, fósforo y micronutrientes para degradar los contaminantes orgánicos en el suelo, además, los microorganismos incorporan a sus estructuras celulares el carbono de los contaminantes junto con el nitrógeno y fósforo inorgánicos del suelo. La mayor parte de los nutrientes existe en materiales minerales y orgánicos, y como tales son insolubles o inaprovechables. Los nutrientes se vuelven disponibles a través de la intemperización de minerales y la descomposición de la materia orgánica (Foth, 1981).

La proporción de nutrientes también es importante, la relación C:N:P de las células bacterianas es de 100:20:1 (Bailey and Ollis, 1986). Sin embargo, la cantidad de nitrógeno o fósforo necesarios para estimular la biodegradación de hidrocarburos es menor a estos requerimientos teóricos, debido a que no todo el carbono de los contaminantes es incorporado a la biomasa, una importante fracción pasa a CO₂ y una cantidad significativa de N orgánico es reciclado cuando las células mueren (Stevenson, 1980, 1986).

La relación C:N se ha empleado para cuantificar los requerimientos de nitrógeno en términos de la cantidad de sustrato-C disponible (Walworth *et al.*, 1997b). La fracción de nitrógeno que permanece en la solución del suelo depende de las características químicas de éste como son: capacidad de intercambio catiónico, potencial de fijación de amonio de las partículas de suelo, contenido de materia orgánica, entre otros. Por tanto, aunque la relación C:N puede ser usada para estimar la cantidad de nitrógeno requerido para oxidar biológicamente una cantidad de hidrocarburos, no es una buena base para el cálculo de las cantidades necesarias para fertilizar el suelo. En general, la cantidad de nitrógeno inorgánico fertilizante que debe ser adicionada, está en función de varios factores como son: la concentración del contaminante, la tasa de degradación esperada, la cantidad de nitrógeno orgánico del suelo, y la tasa a la cual el nitrógeno orgánico se recicla internamente (McGill *et al.*, 1981 citado por Huesemann, 1994).

Existen al menos dos formas adicionales para estimar la cantidad de nitrógeno y fósforo como fertilizante que se debe aplicar para estimular la biodegradación de hidrocarburos. La más común es el uso de una relación C:N:P fija. La otra involucra el monitoreo de los niveles de nitrógeno y fósforo en el suelo y la aplicación de fertilizantes según su demanda (Huesemann, 1994).

Se ha publicado en la literatura un amplio intervalo de relaciones C:N y C:P. Mientras que Frankenberger (1991) recomienda una relación C:N:P de 100:10:1, Dibble y Bartha (1979) encontraron una

óptima biodegradación de lodos aceitosos con relación C:N y C:P de 60:1 y 800:1, respectivamente. Por otro lado, Brown *et al.* (1983), encontraron una óptima biodegradación de lodos de refinería a una tasa C:N de 9:1. Morgan y Watkinson (1989) en una revisión de numerosos estudios encontraron que se han indicado para la degradación de hidrocarburos y lodos relaciones C:N óptimas entre 9:1 y 200:1.

Existe una gran controversia en cuanto a la necesidad de adición de nitrógeno para la biorremediación y los niveles óptimos. Existen muchas publicaciones sobre los efectos benéficos de la adición de nitrógeno (Dibble and Bartha, 1979; Frankenberger, 1991; Walworth *et al.*, 1997b), pero también existen trabajos donde no se observó efecto alguno (Walworth and Reynolds, 1995; Margesin and Shinner, 1997), o bien hubo un efecto nocivo por la aplicación de nitrógeno nítrico (Huntjens *et al.*, 1986; Walworth *et al.*, 1997b).

La sobrefertilización con nitrógeno en forma de amonio o nitrato, puede resultar en una alta concentración de nitratos en el suelo, ya que los microorganismos presentes convierten el amonio en nitrato vía nitrificación (Alexander, 1980).

Un factor importante a considerar es que la humedad del suelo y los niveles de nitrógeno están unidos muy estrechamente. Un suelo seco puede ser fácilmente sobrefertilizado, mientras que un suelo húmedo es menos sensible a un exceso de nitrógeno. Esto se debe a que el nitrógeno inorgánico de las sales usadas como fertilizantes se particionan en la fracción líquida del suelo. En suelos secos existe un pequeño volumen de agua, mientras que en suelos húmedos un mayor volumen de agua diluye el nitrógeno, lo cual disminuye el efecto de éste (Walworth *et al.*, 1997a, 1997b).

Actualmente, se han empleado fertilizantes comerciales para estimular la biodegradación. Entre los fertilizantes nitrogenados se encuentran el nitrato de amonio, hidróxido de amonio, urea, urea formaldehído, sulfato de amonio y nitrato de sodio. Dentro de éstos, la urea ha tenido importancia creciente ya que tiene algunas ventajas sobre los demás fertilizantes como por ejemplo su alto contenido de nitrógeno (45 a 46 %), bajo costo, alta solubilidad en agua y facilidad de manejo.

Entre los materiales fertilizantes fosfóricos se encuentran los superfosfatos, fosfato mono y diamónico, escoria básica, harina de hueso y fosfato coloidal. Los superfosfatos, en general, no tienen efectos permanentes sobre la reacción del suelo. La escoria básica, la harina de hueso y la roca fosfórica tienen tendencia a neutralizar la acidez del suelo. El superfosfato triple, es el más concentrado, conteniendo 20 % de fósforo equivalente al 45 % de P_2O_5 (Foth, 1981).

G. EFECTOS DIRECTOS E INDIRECTOS DE HIDROCARBUROS EN LAS PLANTAS

Los análisis de fitotoxicidad son más rápidos que otros estudios de toxicidad, aunque menos sensibles. Es importante considerar aspectos prácticos tales como el tiempo requerido para que pueda establecerse una cubierta vegetal sobre un área que ha sido sujeta a un tratamiento de biorremediación. Una cubierta vegetal no es sólo de importancia estética sino también, estabiliza el área, previniendo problemas de erosión asociados al viento y a la lluvia.

Los hidrocarburos en suelo generalmente tienen efectos negativos en las comunidades vegetales. La forma en la cual los hidrocarburos actúan en las plantas es compleja e involucra tanto toxicidad por contacto directo como efectos nocivos indirectos por la interacción de los hidrocarburos con los componentes abióticos y microbianos del suelo (Bossert and Bartha, 1984; Frankenberger, 1992).

La toxicidad por contacto directo ocurre, principalmente, por el efecto disolvente de los hidrocarburos de bajo punto de ebullición sobre las estructuras lipídicas de la membrana celular, y se presenta, principalmente, por contacto con las porciones tiernas de la raíz y los retoños de las plantas, disminuye la actividad fotosintética de las hojas cuando los hidrocarburos entran en contacto con ellas (Mendelson *et al.*, 1990). La fracción volátil puede tener un alto poder de penetración produciendo efectos narcóticos (Frankenberger, 1992). El orden decreciente de toxicidad de los hidrocarburos es: monoaromáticos > olefinas > naftalenos > parafinas (Bossert and Bartha, 1984). Dentro de cada clase, la toxicidad está correlacionada directamente con el incremento en la polaridad e inversamente con el incremento en el peso molecular (McGill *et al.*, 1981). Los efectos directos de los hidrocarburos también incluyen efectos de ácidos nafténicos en hormonas vegetales del crecimiento (Fattah and Wort, 1970).

Los efectos indirectos de hidrocarburos en el suelo incluyen daño en las raíces de las plantas debido a la competencia por el consumo de oxígeno del suelo por parte de los microorganismos degradadores, generando condiciones anóxicas lo que, además, pueden provocar la producción microbiana de compuestos fitotóxicos como son H_2S (DeJong, 1980). Los intermediarios metabólicos de la degradación de hidrocarburos pueden incrementar temporalmente su toxicidad. Los productos de la degradación microbiana incompleta incluyen ácidos grasos, compuestos fenólicos y terpenos, los cuales poseen propiedades fitotóxicas (Stevenson, 1966). Los microorganismos degradadores de hidrocarburos compiten también con las

plantas por los nutrientes minerales. Los hidrocarburos también afectan la estructura física del suelo ya que reducen los espacios porosos disminuyendo su capacidad para almacenar agua y aire (DeJong, 1980).

En suelos saturados de hidrocarburos las plantas herbáceas mueren inmediatamente, en cambio, los efectos en los árboles y matorrales se manifiestan hasta varios meses después del derrame. En los suelos de clima frío se requieren largos periodos de tiempo para su restablecimiento, del orden de varios años. Para derrames donde las concentraciones están entre 10,000 y 50,000 mg/kg no se han observado efectos negativos, e incluso a muy bajas concentraciones, se han encontrado efectos benéficos debido a que los hidrocarburos actúan como hormonas de crecimiento y por el aumento en el contenido de humus y de la capacidad de retención de agua (Bossert and Bartha, 1984). Otros efectos benéficos, debido a su descomposición, incluyen el incremento en la estructura física (agregación), aumento en la estabilidad, capacidad de retención de agua y diversidad microbiana. También se ha observado que aumenta la tasa de fijación de nitrógeno debido a la presencia de bajas concentraciones de hidrocarburos (Frankenberger, 1992).

En los procesos de recuperación vegetal de sitios contaminados existe una competencia por las reservas de nutrientes, especialmente por nitrógeno. Esto genera una selección de las plantas que no requieren o requieren poco nitrógeno exógeno, por lo que es común observar un mayor crecimiento de plantas con capacidad de asociarse simbióticamente con organismos fijadores de nitrógeno. De aquí que una alternativa empleada para promover la reforestación de sitios contaminados con hidrocarburos sea la adición de nutrientes, especialmente nitrógeno y fósforo, que permitan superar la competencia por los nutrientes (Bossert y Bartha, 1984).

Los efectos de los hidrocarburos en las plantas son altamente dependientes de la concentración y tipo de hidrocarburo, de la diversidad vegetal en el sitio, del clima y del tipo de suelo. Una mayor diversidad vegetal beneficiará el proceso de recuperación debido a su mayor potencialidad, las plantas con un sistema más profundo de raíces tendrán menos contacto que una planta con raíces tendidas en la superficie (Odu, 1972). Por otro lado, en los climas templados se da mayor recuperación vegetal que en los climas árticos y subárticos; y los suelos más ricos en nutrientes y humus tendrán una mayor capacidad de recuperación (Bossert y Bartha, 1984).

II. ANTECEDENTES

El gran avance industrial ha provocado grandes problemas de contaminación de suelos y acuíferos, una de las tecnologías empleadas para la remediación y restauración de estos sitios es la biorremediación, la cual utiliza la actividad microbiana presente en el suelo para depurarlo de los contaminantes. Para llevar a cabo un proyecto de biorremediación, es conveniente llevar a cabo pruebas de biotratabilidad.

En el Instituto de Ingeniería, se ha venido trabajando en el desarrollo de pruebas de biotratabilidad en diferentes tipos de suelos y de materiales de acuíferos, como base para llevar a cabo proyectos de biorremediación en escala real, dichos trabajos sirvieron como antecedentes al presente trabajo, y se resumen a continuación.

- Se llevó a cabo la biorremediación de un suelo contaminado con mezclas de gasolina y diesel, mediante la estimulación de la flora microbiana autóctona con adición de fertilizantes. El suelo contaminado fue extraído del lugar de origen y trasladado a otra zona donde se llevó a cabo el tratamiento, el cual consistió en aplicar fertilizantes y mantener un riego constante, con una duración de 6 meses. El pH del suelo era muy alto por lo que se adicionó ácido fosfórico con la finalidad de reducir el pH y a la vez suministrar fósforo como nutrimento, con esto se favoreció la biodegradación de los contaminantes por incremento de la actividad de los microorganismos presentes en el suelo. A los 2 meses se llevó a cabo un muestreo; al hacer los análisis se observó una reducción del 80% en la concentración de diesel. Después de 6 meses de tratamiento, se obtuvo una remoción del contaminante del 98 %. Con el fin de verificar que la biorremediación se llevó a cabo, se sembró pasto en el suelo y, durante la época de lluvias se observó el crecimiento de especies vegetales autóctonas, además de las que fueron sembradas (Saval, 1997).

Debido a que las condiciones que prevalecían en el sitio de tratamiento eran muy especiales y a que el suelo presentó drenaje deficiente, en las pruebas de biotratabilidad en el laboratorio, a nivel de mesocosmos en palanganas de plástico, no se lograron simular las condiciones reales del sitio y en este caso el estudio de tratabilidad no tuvo el éxito esperado, ya que no se observó degradación del contaminante.

- En otro estudio, llevado a cabo en el laboratorio, se trabajó con muestras de suelo con un grado de contaminación muy alto, de 37,000 mg/kg de HTP's. Se trabajaron en diferentes lotes a nivel de mesocosmos en frascos de vidrio de 4 litros y se aplicaron diferentes fórmulas de nutrimentos. Después de 30 días de tratamiento se observó variación en algunos parámetros, entre los que se puede mencionar un incremento en la producción de CO₂ y consumo de oxígeno por parte de los microorganismos. La reducción de HTP's alcanzó valores superiores al 60 % en todos los tratamientos, incluso en el control al que no se adicionaron nutrimentos. Esta similitud entre los diferentes tratamientos y el control pudo deberse a los altos niveles de pH alcanzados, los cuales limitan la actividad microbiana. (Datos no publicados). En este estudio no se lograron identificar claramente los factores limitantes de la biodegradación, sin embargo, las pruebas preliminares que se realizaron sugirieron que la biorremediación podría llevarse a cabo, y así se hizo en el sitio original.

- Se llevó a cabo otro estudio enfocado, principalmente, a realizar pruebas de biotratabilidad a nivel piloto para reducir el contenido de diesel y gasolina en agua subterránea y suelos contaminados, el cual se realizó en una instalación de almacenamiento de combustibles localizada dentro de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. En este estudio, diferentes lotes de agua subterránea conteniendo combustible en fase libre en concentraciones superiores a 20,000 mg/l, se inocularon con cultivos mixtos de bacterias degradadoras de diesel, se adicionaron fuentes de nitrógeno amoniacal y fosfatos. Los resultados obtenidos a nivel de mesocosmos en garrafones de 20 litros, indicaron una disminución casi total en la concentración de diesel. Los cultivos obtenidos de estas pruebas se utilizaron como inóculo para el suelo contaminado extraído del mismo sitio, al cual, también se le adicionaron fuentes de nitrógeno amoniacal y fosfatos en forma de fertilizantes. Después de 2 meses de tratamiento por biolabranza con riego constante y homogeneización del suelo, se observó que la concentración inicial de diesel de 6,256 mg/kg y gasolina de 313 mg/kg, se redujo en 99.77% y 100 %, respectivamente. Esta prueba de demostración resultó exitosa tanto para el tratamiento de agua subterránea como para el suelo (Guzmán, 2001).

- En otro estudio, realizado a nivel microcosmos, se evaluó el efecto de la concentración de diesel industrial, nitrógeno y fósforo, así como la relación C:N:P durante la biodegradación de éste hidrocarburo en un suelo contaminado aprovechando la flora nativa. Para ello, se empleó una técnica estadística basada en la metodología de superficie de respuesta con un diseño experimental central compuesto. El análisis de varianza reveló un ajuste adecuado del modelo y los efectos significativos de la concentración de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos, así como la interacción diesel-nitrógeno amoniacal y diesel-fosfatos éstas, debidas a la necesidad de nutrimentos por la alta actividad metabólica del suelo. Con base en el modelo se encontró que la

concentración de las muestras originales de 51,685 mg/kg de diesel, se debe reducir a una concentración aproximada de 35.000 mg/kg para aumentar los porcentajes de biodegradación y sean evidentes la necesidad de mayores concentraciones de nitrógeno amoniacal y de fosfatos. Se encontró también que las pruebas de respirometría, generación de CO₂ y consumo de oxígeno, no son indicativas del grado de biodegradación del diesel (Zegarra *et al.*, 2000). En este mismo suelo se encontró que el suelo tenía una importante actividad biológica y que estaban presentes bacterias con los genes específicos para la degradación de hidrocarburos (Milcic *et al.*, 2000). Ambos trabajos sirvieron como base para decidir la utilización de este mismo suelo para realizar el presente trabajo.

- Por otra parte, trabajos realizados en el Instituto de Geología por Rangel *et al.* (2001, en prensa), permitieron confirmar que la aplicación de fibra de coco a suelos mejora sus características físicas. Estos autores propusieron el uso de fibra de coco para reemplazar a los suelos oscuros como material de cubierta en la propagación de hongos. En este estudio se observó que con la adición de fibra de coco se obtiene una marcada mejoría tanto en la porosidad y textura del suelo, como en su capacidad de retención de agua, mientras que el pH, la conductividad eléctrica y el contenido de cationes solubles se mantuvieron estadísticamente inalterados.

En los trabajos realizados previamente, se tuvieron éxitos y fracasos al pretender realizar pruebas de biotratabilidad. Varias cosas importantes quedaron como experiencia, entre ellas, comprender la necesidad de realizar trabajos en el laboratorio como un apoyo a los trabajos de campo. Los resultados que se obtienen de este tipo de trabajos se toman como base para el escalamiento, esto es para llevar a cabo un proyecto de biorremediación en un sitio en particular, no obstante, es necesario puntualizar que no se pueden escalar los resultados sin realizar un ajuste previo, debido a que en campo no es posible controlar todas las condiciones ambientales que influyen directamente en la dinámica del sistema.

III. METODOLOGÍA

A. ESTRATEGIA

En este trabajo se decidió realizar las pruebas de biotratabilidad a nivel de mesocosmos, para lo cual se emplearon recipientes de vidrio, que para el caso específico de este trabajo permiten un mejor manejo de la temperatura y la humedad. Esto facilita también el seguimiento de diferentes variables que permiten optimizar la degradación del contaminante.

Primeramente se llevó a cabo un muestreo en la zona contaminada para obtener el volumen de muestra a utilizar en todo el estudio, así como una muestra control. Una vez obtenidas las muestras se trasladaron al laboratorio donde se realizó la caracterización de cada una de ellas. Las pruebas de biotratabilidad se llevaron a cabo en dos etapas, en la primera se probó el efecto independiente de dos texturizantes, composta y fibra de coco, así como la adición de fertilizantes. En la segunda etapa, se probó el efecto combinado de ambos texturizantes, la adición de fertilizantes, además de la adición de harina de hueso como nutrimento. En todos los casos se evaluó el efecto sobre la degradación de diesel, y sobre las comunidades microbianas. Se realizó un análisis estadístico considerando la degradación de diesel, el porcentaje de germinación de semillas y la emergencia de las plántulas.

1. ANTECEDENTES DEL SITIO

El muestreo se llevó a cabo en un suelo localizado debajo de un tanque de almacenamiento de diesel, de 500 l de capacidad (Fig. III.1), el cual, por falta de mantenimiento tuvo un goteo constante que duró aproximadamente 12 años. En un estudio geofísico realizado a este sitio en 1996 para diagnosticar la contaminación del subsuelo, se determinaron, con base en las pruebas de resistividad a diferentes profundidades y con el apoyo de la correlación geológica superficial, cinco horizontes litoeléctricos: un relleno artificial con un espesor de 4.60 a 6.40 metros; un estrato limo-arcilloso de 1.40 m

con alternancia de fragmentos rocosos (este estructura también corresponde a un relleno artificial); terreno natural de 14 m correlacionada con coladas basálticas altamente fracturadas, piroplásticas y suelos que han sedimentado la fracturación y, finalmente, una capa inferior correlacionada con coladas basálticas, con interclaciones entre eventos de escoria volcánica (propias de la zona).

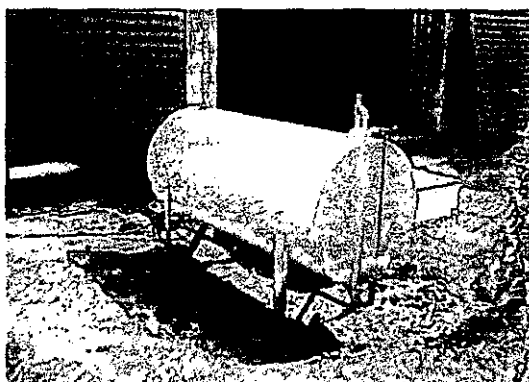


Fig. III.1. Tanque de almacenamiento de diesel y aspecto del suelo contaminado

La mancha de contaminación se movió hacia el extremo poniente del tanque y llegó al muro de la edificación colindante, hacia la profundidad alcanzó alrededor de 4 m. De acuerdo a los valores resistivos se infirió que el producto contaminante se diluyó hasta perderse a profundidad, dado que la estructura del subsuelo es altamente permeable. La zona presentó una mayor contaminación en la parte superficial cercana al tanque. Al parecer el relleno donde se cimentó el edificio presenta una baja permeabilidad, por lo que el producto tendió a moverse hacia el lado opuesto, en donde los materiales son de mayor permeabilidad (Instituto de Ingeniería y AMBSA, 1996).

B. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. MUESTREO

La muestra se tomó mediante excavación con la ayuda de una pala de albañil, a nivel de superficie hasta 15 cm de profundidad (para aprovechar la presencia de las poblaciones aerobias). Se colectaron proximadamente 12 kg de suelo en frascos de vidrio de 500 g con tapa hermética y contratapa de teflón, y se trasladaron al laboratorio donde se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento. Para llevar a cabo los

análisis y las pruebas de biotratibilidad, se homogeneizó perfectamente la muestra con la ayuda de una batidora Kitchen Aid Mod. KSM90, con la finalidad de minimizar fuentes potenciales de variación durante la experimentación. Se tomó una muestra de suelo compuesta a partir de 3 puntos en un sitio fuera de la mancha de contaminación que sirvió como control y se trató de la misma manera que la muestra contaminada.

Todo el material empleado durante el muestreo se lavó perfectamente para evitar la presencia de compuestos que interfirieran con los análisis, además de utilizarse el equipo adecuado para garantizar la seguridad del personal durante el muestreo, de acuerdo a los lineamientos del SW-846 de la EPA (USEPA, 1996a).

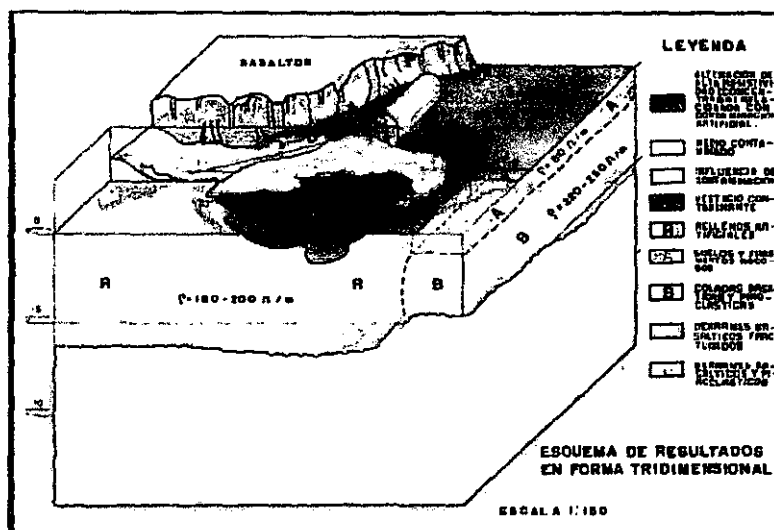


Fig. III.2. Imagen tridimensional de la distribución de la mancha de contaminación

2. CARACTERIZACIÓN INICIAL

Se llevó a cabo la caracterización de las muestras de suelo considerando parámetros físicos y químicos como son: contenido de humedad, capacidad de retención de agua, densidad real, densidad aparente, porosidad, *textura*, pH, *materia orgánica*, *carbono orgánico*, *nitrógeno total*, *nitrógeno amoniacal*, *fosfatos* y se determinó la concentración del contaminante. Como dato complementario se determinó el contenido de metales pesados en el lixiviado tanto del suelo control, como del contaminado.

Dentro de las características microbiológicas, se llevó a cabo el conteo de bacterias heterótrofas, bacterias degradadoras de diesel y bacterias amonificantes así como la cuantificación de hongos y levaduras. Se evaluó la actividad respirométrica del suelo mediante la medición del consumo de oxígeno y producción de bióxido de carbono.

3. PRUEBAS DE BIOTRATABILIDAD EN EL LABORATORIO

Con los datos obtenidos de la caracterización del suelo se montaron las pruebas de biotratibilidad en el laboratorio. Para esto, el suelo se diluyó de 86,926 ppm hasta una concentración de aproximadamente 30,000 ppm (esto es, una dilución del 34.51 %), mediante la adición de los agentes texturizantes, composta y fibra de coco. Estas pruebas se llevaron a cabo en recipientes de vidrio en forma de molde para hornear con una capacidad de aproximadamente 3 kg de suelo. Se dividieron en dos etapas las cuales se describen a continuación.

a. 1ª etapa experimental

En esta etapa, los texturizantes se emplearon únicamente como diluyentes, por lo cual se esterilizaron para evitar el aporte de microorganismos que no fueran autóctonos, ya que estos últimos poseen la capacidad para degradar el contaminante.

La composta y la fibra de coco se secaron a temperatura ambiente y se molieron para tener un tamaño de partícula homogéneo. Ambos materiales se esterilizaron 2 veces por espacio de una hora, a 120 °C y 1.1atm de presión. Después de esterilizarlos, se dejaron airear aproximadamente un día para eliminar todos los compuestos volátiles tóxicos (Alef and Nannipieri, 1995).

Se realizaron cuatro pruebas diferentes, cada una por triplicado, en las cuales se adicionaron los texturizantes en relación suelo/diluyente de 1:1.3. Se montó, también por triplicado, un testigo al que solamente se le controló la humedad a cerca del 70 % de su capacidad de campo:

- 1) Suelo contaminado (1,300 g) + composta (1,700 g)
- 2) Suelo contaminado (1,300 g) + composta (1,700 g) + fertilizantes
- 3) Suelo contaminado (1,300 g) + fibra de coco (1,700 g)
- 4) Suelo contaminado (1,300 g) + fibra de coco (1,700 g) + fertilizantes

Se adicionaron los fertilizantes en solución a los lotes correspondientes, la cual se preparó con urea y superfosfato triple, hasta alcanzar una relación $C:NH_4^+ : PO_4^{3-}$ de 100:15:0.1. Se mantuvieron a temperatura constante de 25 °C. La pérdida de humedad por la evaporación durante la incubación se compensó con la adición de agua, procurando mantener las condiciones óptimas de humedad, entre 30 y 40 % de acuerdo al texturizante, y así favorecer la actividad microbiana.

Se llevaron a cabo muestreos al inicio y a los 40 y 80 días, con la finalidad de tener el seguimiento de la biodegradación del contaminante en el suelo, para lo cual se determinaron en cada muestreo los parámetros siguientes: contenido de humedad, pH, nitrógeno total y amoniacal, fósforo, concentración de diesel residual, de bacterias degradadoras de diesel, bacterias amonificantes, hongos y levaduras, y la actividad respirométrica del suelo.

Se realizaron pruebas de germinación y emergencia de dos tipos de semillas, alpiste (*Phalaris canariensis*) y jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Primeramente se probó la calidad de las semillas determinando el porcentaje de germinación de las mismas. Para esto, se colocó en el fondo de una caja petri un disco de papel filtro, se humedeció y se colocaron 100 semillas, se dejaron incubar durante 14 días, pasado ese tiempo se realizó un conteo de las semillas germinadas, las pruebas se hicieron por quintuplicado.

Una vez establecido el porcentaje de germinación de las semillas, se montaron las pruebas de germinación y emergencia para los diferentes tratamientos. Para esto, se colocó en las cajas petri un disco de papel filtro en el fondo para mantener la humedad, sobre éste se colocó una cama de suelo, se colocaron 100 semillas y se cubrieron con suelo, se ajustó la humedad aproximadamente al 70 % de la capacidad de campo del suelo, se registró el peso de la caja petri para poder ajustar la humedad durante la incubación. Se incubaron durante 14 días. Las pruebas se realizaron por quintuplicado.

Pasado el tiempo de incubación, se llevó a cabo el conteo de las plántulas, para determinar el porcentaje de emergencia. Se extrajeron las semillas del suelo y se llevó a cabo un conteo de las que germinaron, para obtener el porcentaje de germinación.

b. 2ª etapa experimental

Tomando como base los resultados obtenidos en la primera etapa se llevó a cabo la segunda etapa experimental, en la que se evaluó el efecto combinado de los dos diluyentes empleados en la etapa anterior, pero, en este caso, no se esterilizaron. Debido a que se observó adsorción del contaminante en la fibra de

coco, ésta se mezcló en proporción del 25% con respecto a la composta adicionada, esto es en relación suelo/fibra de coco/composta, de 1:0.32:1. La relación $C:NH_4^+:PO_4^{3-}$ se modificó a 100:10:0.1 y se probó la adición harina de hueso como fuente adicional de nutrimentos. Las pruebas se montaron por cuadruplicado de la siguiente manera:

- 1) Suelo (1,300 g) + fibra de coco (420 g) + composta (1,280 g)
- 2) Suelo (1,300 g) + fibra de coco (420 g) + composta (1,280 g) + fertilizantes
- 3) Suelo (1,300 g) + fibra de coco (420 g) + composta (1,280 g) + harina de hueso

Como en la etapa anterior, se llevaron a cabo muestreos al inicio y a los 40 y 80 días, con la finalidad de tener el seguimiento de la biodegradación del contaminante en el suelo, evaluando los mismos parámetros que en la 1ª etapa.

C. TÉCNICAS ANALÍTICAS

I. CARACTERIZACIÓN FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO

Contenido de humedad. Se evaluó por el método gravimétrico. El secado se realizó en un horno Felisa Mod. 243 a 105 °C. (NOM-AA-16-1984; Allison, 1985).

Capacidad de retención de agua (CRA). Se determinó por el método de saturación del suelo con agua y drenado por gravedad (Carter, 1993).

Densidad real (ρ_m). Se determinó en picnómetros de vidrio de 25 ml. los pesos se registraron en una balanza analítica OHAUSAGA 110.

Densidad aparente (ρ_p). Se determinó por el método de la probeta (Klute, 1986).

Porosidad. Se obtuvo por cálculo a partir de la densidad real y aparente, mediante la ecuación:

$$\% \text{ porosidad} = 1 - (\rho_m / \rho_p) \times 100 \text{ (Carter, 1993).}$$

Textura. Se determinó mediante el método del Hidrómetro Modificado por Day empleando un hidrómetro estándar ASTM No. 152G con escala Bouyoucs g/l (Klute, 1986).

pH. Se realizó en una suspensión de suelo en agua desionizada en preparación 1:2 empleando un potenciómetro Conductronic pH20 con electrodo de vidrio Corning G-p Combo W/RJ (Jackson, 1982; Aguilera, 1986).

Carbono orgánico. Se realizó por el método de Walkley y Black modificado, de acuerdo a Nelson y Somer (Carter, 1993).

Materia orgánica. Se obtuvo por cálculo a partir del carbono orgánico a partir de la siguiente fórmula:

$$\% m.o. = (\% c.o.) (1.72)$$

Nitrógeno total. Se determinó por digestión ácida (Jackson, 1982; NOM DGN-AAA-24-1984), utilizando un equipo de digestión BÜCHI 435 con extractor de humos, y un destilador BÜCHI 323.

Nitrógeno amoniacal. Se determinó por destilación a partir de un filtrado de intercambio iónico con 450 ml de NaCl al 10% por 100 g de suelo.

Fósforo disponible. Se evaluó por el método colorimétrico de Bray P-I (Jackson, 1982), empleando un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 20D.

Concentración de diesel. Se llevó a cabo por el método EPA 8015 (USEPA, 1966a), por extracción con hexano a reflujo y eliminación de agua con sulfato de sodio anhidro y de partículas por filtración a través de fibra de vidrio y centrifugación a 3000 rpm. Durante 15 min. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian mod. 3350) con detector de ionización de flama (FID) a 300 °C e inyector a 320 °C Se utilizó una columna capilar J&B DB-1 100% metil silicona (no polar), con una longitud de 60 m, diámetro interno 0.25 µm y espesor de película de 1µm. Las condiciones fueron: flujo del gas acarreador (He, N₂) de 2 ± 0.2 ml/min.; flujo de aire de 300 ± 10 ml/min.; flujo del gas del detector (H₂) de 30 ± 1 ml/min. Inyector 1075 Split/Splitless/SPI (Septum-Equipped Programmable Injector). Se utilizó tolueno como estándar interno. El área de diesel y el área del estándar interno se utilizaron para la determinación de la concentración de diesel en el suelo (Geerdink and Loosdrecht, 1996).

Metales Pesados. Se realizó por los métodos EPA 6010 para As, Ba, Cd, Ni, Pb y Se; EPA 7196A para Cr (VI); y EPA 7470 para Hg (USEPA, 1996a).

2. CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DEL SUELO

Conteo de bacterias heterótrofas. Se empleó la técnica tradicional de conteo en placa, utilizando como medio de crecimiento el medio Agar Cuenta en Placa (No. Cat. 1.05463) que contiene peptona de caseína 5 g/l, extracto de levadura 2.5 g/l, D(+)-glucosa 1.0 g/l y agar-agar 14 g/l.

Conteo de bacterias degradadoras. Se usó un medio mineral con 100 µl de diesel industrial como única fuente de carbono.

Bacterias amonificantes. Se realizó por el método del Número Más Probable (NMP), según Katznelson (1946), utilizando un medio de crecimiento Agar BBL-Gelatina Nutritiva (No. Cat. 11481) que contiene gelatina digerida por enzimas pancreáticas, extracto de carne bovina y gelatina.

Cuantificación de hongos y levaduras. Se realizó mediante la técnica de conteo en placa utilizando como medio de crecimiento el medio Agar Dextrosa y Papa (No. Cat 119), que contiene infusión de papa (sólidos) 4g, dextrosa 20g y agar 14 g/l.

Actividad respirométrica del suelo. Se colocaron 25 g de la muestra en botellas serológicas de 120 ml, se taparon con un septo y un sello de aluminio. Se incubaron a 26 °C durante 5 días. Diariamente se tomaron 0.5 ml de biogás para cuantificar bióxido de carbono y oxígeno en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica (Fisher gas partitioner mod. 1700) con doble columna (Porapak Q y malla molécula 5 Å), se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 30 ml/min.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERIZACIÓN INICIAL

Al inicio del proyecto se realizó una caracterización inicial tanto del suelo contaminado como del suelo control. Los resultados de ambas caracterizaciones se presentan a continuación.

1. CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO

En la tabla IV.1 se muestran las características físicas y químicas de la muestra control y de la contaminada. La concentración de diesel en la muestra contaminada fue muy alta, de 86,926 ppm. Esta concentración podría encontrarse por arriba de un umbral de concentración para que pueda llevarse a cabo la degradación de hidrocarburos en suelo (Dibble y Bartha, 1979; Brown *et al.*, 1983; Leahy y Colwel, 1990; McAllister *et al.*, 1995). Zegarra *et al.* (2000) con el mismo suelo utilizado en este estudio, encontraron que a una alta concentración de diesel (50.000 mg/kg) se obtienen porcentajes de degradación muy bajos, cercanos al 3 %, mientras que a concentraciones por debajo de 38,000 mg/kg es notable el incremento en la degradación y por consiguiente es más representativo el efecto de los nutrientes sobre la degradación del diesel. Por este motivo el suelo se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 30,000 ppm (esto es, una dilución del 34.51 %), para que sea evidente el efecto de la adición de nutrientes durante el tratamiento.

La muestra control no presentó contaminación por diesel lo que indicó que fue un control representativo del estudio.

La textura de las muestras control y contaminada fue del tipo migajón-arenoso. La presencia de arenas permite la transferencia de fluidos que garantiza una adecuada aireación, así mismo, la presencia de limos favorece la retención de agua, lo que permite ajustar la humedad para favorecer el crecimiento de bacterias en la matriz del suelo (Frankenberger, 1992).

De manera general, se reporta para este tipo de textura una densidad aparente de 1.20 a 1.75 g/cm³ (Juma, 1998), el suelo control presentó una densidad aparente que cae en este intervalo, de 1.20 g/cm³, sin embargo, en el caso de la muestra contaminada este valor es muy bajo, de 0.98 g/cm³. A pesar de que la muestra fue secada a 105 °C previo a la determinación, es probable que no se hayan perdido los hidrocarburos de alto punto de ebullición.

Tabla IV.1. Características físicas y químicas de las muestras de suelo

Parámetro*	Suelo Control		Suelo contaminado	
	Arena	Limo	Arena	Limo
Concentración de Diesel (mg/kg)	ND		86.926	
Clasificación textural	Migajón arenoso		Migajón arenoso	
Proporción de Componentes (%)	55	45	62.5	37.5
Densidad aparente (g/ml)	1.20		0.98	
Densidad real (g/ml)	2.31		1.90	
Porosidad (%)	47.98		48.67	
Capacidad de retención de agua (ml/kg)	312		536	
Humedad (%)	27.29		24.74	
PII	7.77		5.47	
Materia orgánica (%)	6.27		52.06	
Carbono orgánico (%)	3.64		30.26	
Nitrógeno total (mg/kg)	357.5		140	
Nitrógeno amoniacal (mg/kg)	6.0		2.73	
Fósforo (mg/kg)	2.10		1.82	
Metales Pesados lixiviables (mg/l)**				
Bario	0.56		0.400	
Cadmio	0.030		ND	
Níquel	0.080		ND	
Plata	ND		0.370	

* Concentraciones expresadas en base seca

** Datos obtenidos por Laboratorios ABC

ND: No detectado

La densidad de partícula o real siempre es mayor que la densidad aparente, ya que ésta última considera el espacio poroso del suelo además del volumen de los sólidos. Los suelos minerales, normalmente, tienen una densidad real de 2.65 g/cm³ (Paul y Clark, 1996), ambas muestras presentan valores menores a éste, de 2.31 y 1.90 g/cm³ para el suelo control y el contaminado, respectivamente, pero elevados con respecto a lo conocido para suelos orgánicos (Porta *et al.*, 1994). La porosidad de ambas muestras fue cercana al 48 %, típica de un suelo con alto contenido de arenas y limos (Freeze y Cherry, 1979).

Debido a la cercanía con que se tomaron las muestras, la humedad fue similar, de 27.29 % en la muestra control y de 24.74 % en la contaminada. El agua del suelo afecta no solamente a la humedad disponible para los microorganismos, sino también el estado de aireación, la cantidad de materiales solubles, la presión osmótica y el pH del suelo.

Se observó una marcada diferencia en la capacidad de retención de agua (CRA) entre ambas muestras, siendo mucho mayor en la muestra contaminada que en la muestra control, el incremento en la cantidad de materia orgánica por efecto de la presencia del contaminante fue la causa de una mayor CRA.

El pH de la muestra contaminada fue muy bajo (5.47) debido, probablemente, a la producción de CO₂ y ácidos orgánicos generados a partir del contaminante (Gordon *et al.*, 1980), Bossert y Bartha (1989) y Block *et al.* (1989) encontraron variaciones en el pH en suelos contaminados con hidrocarburos durante periodos largos. Es muy importante considerar este factor para llevar a cabo las pruebas de biotratibilidad, ya que los microorganismos que degradan contaminantes, generalmente bacterias, tienen un pH óptimo que se encuentra entre 6.0 y 8.0 (Pelkzar *et al.*, 1982), los hongos son más tolerantes a condiciones ácidas por lo que es necesario considerar la posible implicación de algunas especies fúngicas en la degradación de ciertos contaminantes.

De acuerdo con los resultados anteriores, resalta el hecho de que, debido a la alta concentración del diesel en la muestra contaminada, el porcentaje de materia orgánica y carbono orgánico de ésta, fueron mucho más altos que en el control. De acuerdo con una nominación para suelos agrícolas propuesta por varios autores (Tabla IV.2) con base en criterios de fertilidad, el suelo control se clasifica como un suelo medianamente rico y el suelo contaminado como extremadamente rico. El estado del arte de la biodegradación de hidrocarburos en suelos no cuenta con una clasificación de suelos por el contenido de materia orgánica y nutrimentos de ahí que se emplee esta nominación.

Tabla IV.2. Nominación para suelos típicos

NOMINACIÓN	MATERIA ORGÁNICA ¹ (%)	NITRÓGENO ^{2,3} mg/kg	FOSFORO ^{2,3} mg/kg
Extremadamente pobre	0 - 0.2	< 320	
Pobre	0.8 - 2.0	320 - 630	< 4.0
Regular	2.0 - 4.0	640 - 950	
Medianamente rico	4.0 - 8.0	960 - 1 260	4.0 - 6.9
Rico	8.0 - 15.0	1 270 - 1 580	7.0 - 12.5
Muy rico	15.0 - 30.0	1 590 - 2 210	
Extremadamente rico	> 30.0	> 2 210	> 12.5

¹Aguilera, 1989; ²Vazquez y Bautista, 1993; ³Tavera, 1985.

La cantidad de nitrógeno total fue muy baja, tanto en la muestra contaminada como en la control, de la misma manera que el nitrógeno amoniacal. De acuerdo con la nominación de suelos de referencia, el suelo control es un suelo pobre en nitrógeno, mientras que el contaminado se clasifica como extremadamente pobre. En cuanto a los ortofosfatos, ambos suelos se clasifican como pobres. Tomando esto como referencia,

se decidió adicionar fertilizantes para incrementar la actividad de los microorganismos y favorecer así la degradación del contaminante.

Dentro de la caracterización se determinó la presencia de algunos metales pesados lixiviables, en la muestra control se detectaron Ba, Cd y Ni, y en la muestra contaminada se detectó Ba y Pb, en ambos casos las concentraciones fueron muy bajas por lo que se asume que en este caso particular no hay un efecto negativo. Frankenberger (1992) indica efectos inhibitorios en la biodegradación de diesel a concentraciones de plomo de 10 mg/kg y de 1,000 mg/kg de Cd en suelo, sin embargo, Salanitro *et al.* (1997) no observaron efectos en la biodegradación de crudo en presencia de varios metales en concentraciones menores a 20 mg/kg.

2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS DEL SUELO

El contenido de bacterias heterótrofas en el suelo contaminado fue de 1.16×10^7 ufc/g de suelo, concentración que podría considerarse muy elevada considerando la presencia del contaminante, en la muestra de suelo control la concentración fue de 9.35×10^5 ufc/g, cifra que es más baja que la detectada en los suelos no contaminados (Tabla IV.3).

La proporción de bacterias potencialmente degradadoras de diesel fue del mismo orden de magnitud que las heterótrofas, 10^7 ufc/g, y es un valor alto considerando el pH del suelo que fue de 5.47, este resultado indica que la mayoría de las bacterias heterótrofas son capaces de degradar el contaminante. Debido a la antigüedad del derrame, de alrededor de 12 años, se dio un enriquecimiento natural de bacterias nativas con capacidad degradadora, como ya se había establecido en un estudio previo con este suelo (Milcic *et al.*, 1998). Las poblaciones microbianas nativas del suelo generalmente son capaces de degradar los hidrocarburos, ya que muchas de las especies que se sabe los degradan, se encuentran comúnmente en el suelo, por tanto es más importante proporcionar condiciones adecuadas para que las bacterias indígenas inicien actividad degradadora, que introducir nuevas especies u organismos modificados genéticamente (Jorgensen *et al.*, 2000).

En las pruebas de respirometría de la muestra control se alcanzó, después de 10 días de incubación, un consumo acumulado de oxígeno de 742.93 mg/kg. Analizando la parte complementaria que corresponde a la producción de bióxido de carbono, se obtuvo una producción acumulada de 1,194.78 mg/kg, con una tasa de consumo y producción de 72.89 y 124.65 mg/kg-día, respectivamente. Estos valores se encuentran

ligeramente por arriba de los encontrados por otros autores. Zegarra (2000) detectó una tasa de producción de CO₂ de aproximadamente 21.56 mg/kg, y Bartha y Pramer (1965) de 31 mg/kg. Es importante considerar que la actividad respirométrica depende de muchos factores, de los cuales destacan: la cantidad de materia orgánica, del tipo de suelo y de las comunidades microbianas presentes en el mismo (Smith *et al.*, 1998).

En el caso de la muestra contaminada el consumo de oxígeno, después de 10 días de incubación, fue de 1,341.84 mg/kg, a una tasa de consumo de 919.07 mg/kg-día, mientras que la producción acumulada de CO₂ fue de 4,414.25 mg/kg, a una tasa de producción de 476.48 mg/kg-día, lo que era de esperarse, pues al ser mayor la cantidad de materia orgánica el consumo de O₂ y la producción CO₂ son más elevados. Como se observó en este caso, la presencia del contaminante incrementó la actividad respirométrica debido a la utilización del diesel como fuente de carbono (Jorgensen *et al.*, 1995). Esta diferencia de actividad con respecto al control sugirió que la población autóctona está bien adaptada y confirma el potencial de degradación de las bacterias autóctonas. Odu (1972) determinó que la población microbiana de un suelo contaminado con hidrocarburos es mayor en un orden de magnitud, lo que indicó la presencia de una población más adaptada debido a la presión de selección impuesta por la presencia del contaminante.

Contrariamente al caso de la muestra control, la producción de CO₂ fue menor que el consumo de oxígeno. Debido a la alta concentración de contaminante el suelo se encuentra muy compactado, lo que dificulta el flujo de gases a través del mismo.

Tabla IV.3. Características microbiológicas de las muestras de suelo

Parámetro*	Suelo Control	Suelo contaminado
Cuenta de bacterias heterótrofas (ufc/g)	9.35 E5	1.16E7
Cuenta de bacterias degradadoras de diesel (ufc/g)	ND	1.74 E7
Consumo acumulado de O ₂ (mg/kg) (10 días de incubación)	742.93	1,341.84
Tasa de consumo de O ₂ (mg/kg-día)	72.89	919.07
Producción acumulada de CO ₂ (mg/kg) (10 días de incubación)	1.194.78	4,414.25
Tasa de producción de CO ₂ (mg/kg-día)	124.65	476.48

*Concentraciones expresadas en base seca

ND: No detectada

B. PRUEBAS DE BIOTRATABILIDAD

Las pruebas de biotratibilidad se montaron considerando los resultados obtenidos en la caracterización de las muestras.

La literatura indica que el empleo de composta y desechos agroindustriales en el tratamiento de suelos mejoran las características físicas de éstos, lo que favorece la degradación de los contaminantes orgánicos (Huesemann, 1996; Safferman, 1998). Por este motivo y debido a que la concentración del contaminante fue muy alta, se decidió diluir el suelo con composta y fibra de coco.

La composta funciona como una matriz orgánica que aporta al suelo un soporte para que los microorganismos se desarrollen, además de funcionar como un reservorio de nutrientes, los cuales pueden ser obtenidos por los microorganismos de manera paulatina. Cuando es adicionada sin esterilizar, inocula al suelo con microorganismos que están bien adaptados a sustancias húmicas (Kästner y Mahro, 1996). La fibra de coco es un desecho que puede obtenerse con relativa facilidad y a un costo razonable; lo que disminuye los costos de tratamiento y puede ser aplicado a gran escala en proyectos de biorremediación.

Debido a que el suelo a tratar fue pobre en fertilizantes se decidió adicionar nitrógeno y fósforo, los dos macronutrientes más importantes para la biodegradación de hidrocarburos, sin embargo, el aporte de carbono de estos últimos provoca un desbalance de nutrientes (Brown *et al.*, 1983; Bossert y Bartha, 1984) lo que hace necesario un ajuste de los mismos. Los microorganismos requieren carbono para su crecimiento, nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, así como de bases púricas y pirimídicas y de sus polímeros (proteínas y ácidos nucleicos); y el fósforo que constituye a los fosfolípidos y fosfoproteínas, para almacenamiento y liberación de energía.

El empleo de fertilizantes comerciales se ha extendido mucho en las investigaciones para estimular la biodegradación de hidrocarburos. Generalmente se adicionan de acuerdo a relaciones de nutrientes establecidas, con base en la concentración del contaminante. Se ha encontrado un amplio intervalo de relaciones C:N:P para la degradación de diferentes hidrocarburos, pero su eficiencia depende de muchos factores entre los que se pueden citar: la disponibilidad de carbono para los microorganismos, tipo de suelo, tipo de contaminante y contenido de agua del suelo (Burés, 1997).

En este estudio, la relación de fertilizantes empleada como C:N-NH₄⁺:P-PO₄³⁻ fue de 100:15:0.1, la cual fue tomada de resultados experimentales obtenidos en un trabajo previo (Zegarra, 2000), en el que se observó más del 60 % de degradación de diesel empleando este mismo suelo.

La solución de fertilizantes que se adicionó a los lotes correspondientes, se preparó con fertilizantes nitrogenados y fosfatados, urea y superfosfato triple. La urea es más económica que otras sustancias que se emplean como fuente de nitrógeno como son sulfato, fosfato y nitrato de amonio, además produce reacción

alcalina con lo que se incrementa el pH del suelo. Se ha comprobado en varios trabajos su efectividad como fuente de nitrógeno durante la biorremediación (Frankenberger, 1998), la urea se convierte en amonio por acción de la enzima ureasa (Burés, 1997). El superfosfato triple, el cual contiene calcio, también favorece el incremento del pH.

Los destilados medios del petróleo como son el diesel y gasolina, bajo condiciones adecuadas son altamente susceptibles a la biodegradación. El diesel es una mezcla de hidrocarburos que debido a su relativa baja volatilidad, permite que los procesos de biodegradación sean atractivos en los proyectos de biorremediación de suelos (Jackson, 1990). Su biodegradación ha sido investigada por muchos autores (Morgan *et al.*, 1989; Jackson, 1990; Grundmann y Rehm, 1991; Frankenberger, 1992; Gruiz y Kriston, 1995; Walworth y Reynolds, 1995; Rainwater *et al.*, 1996; Saval, 1997). Por esto se decidió experimentar con un suelo contaminado con diesel que presentó una flora autóctona con gran potencial para la degradación del mismo.

1. EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA PRUEBA TESTIGO

El testigo se monitoreó de la misma manera que las pruebas y solamente se controló la humedad, para evaluar de esta manera la actividad inherente al suelo y considerar la posibilidad de que se llevara a cabo una atenuación natural por la actividad de los microorganismos autóctonos. En virtud de que no se adicionó algún material diluyente, la concentración de diesel fue la original del suelo, de 86.926 mg·kg.

a. Evaluación de parámetros químicos

El testigo se mantuvo con un porcentaje de humedad entre 34 y 37 %, y el pH fluctuó por debajo de 6.0 casi todo el tiempo que duró el tratamiento (Tabla IV.4). Este pH fue muy bajo debido a la presencia del contaminante, como ya se mencionó.

La concentración de nitrógeno total fue muy elevada, comparada con el nitrógeno amoniacal que representa cerca del 1.0 % del total. Esto indica que la mayor parte está en forma de nitrógeno orgánico, considerando que es un suelo superficial.

Tabla IV.4. pH y humedad en la prueba testigo

MUESTRA	% Humedad			PH		
	T ₀	40 DIAS	80 DIAS	T ₀	40 DIAS	80 DIAS
Testigo	37	35	33	5.83	6.13	5.61
	38	35	36	5.83	6.05	5.89
	37	32	36	5.75	5.86	5.78
Promedio	37	34	35	5.80	6.01	5.76
% Variabilidad	1.92	4.75	5.31	0.79	2.30	2.43

La concentración de nitrógeno amoniacal al inicio del tratamiento fue de aproximadamente 60 mg/kg de suelo, y disminuyó a lo largo del tiempo debido a la mineralización del mismo por los microorganismos, dándose un consumo casi total del mismo (Fig. IV.1).

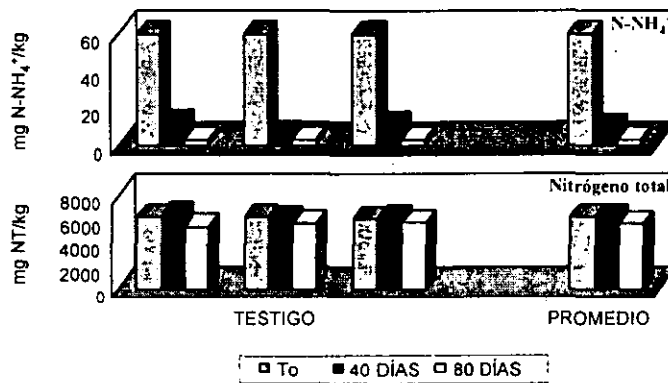


Fig. IV.1. Concentración de N-NH₄⁺ y nitrógeno total residual en la prueba testigo

La concentración del fósforo en el testigo fue baja, de 3.42 mg/kg, a los 40 días disminuyó considerablemente, aunque posteriormente volvió a incrementarse. Este comportamiento tan errático puede deberse a que al inicio del proceso de biorremediación el consumo de fósforo se incrementa y, posteriormente, al disminuir el contaminante, disminuye, además de que mejoran las condiciones que propician la mineralización de este nutrimento, y, posiblemente se deba a un intercambio isoiónico del fósforo adsorbido en el complejo de intercambio, la gran cantidad de materia orgánica del suelo debida al contaminante incrementa la capacidad de intercambio iónico del suelo (Fig. IV.2).

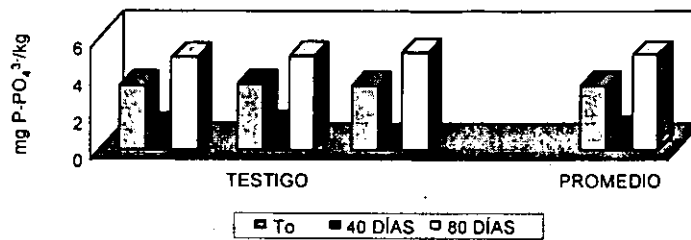


Fig. IV.2. Concentración de P-PO₄³⁻ residual en la prueba testigo

b. Evaluación de la biodegradación del contaminante

La degradación del diesel a los 80 días fue del 21 %, lo que se puede explicar como una atenuación natural debido a la gran cantidad de bacterias degradadoras nativas (Fig. IV.3). Zegarra (2000) observó muy baja degradación de diesel, del 3 % con una concentración inicial de 50,000 mg/kg, y con la adición de nitrógeno y fósforo aumentó al 21 %, esto indica que a pesar de la adición de fertilizantes, con altas concentraciones el diesel, se tiene efectos inhibitorios y/o tóxicos para los microorganismos. Estos efectos también han sido observados en varios estudios (Brown *et al.*, 1983; Song *et al.*, 1990; Raymond, 1992; Atlas y Bartha, 1998). Debido a la presencia de algunos compuestos tóxicos en la mezcla de hidrocarburos, existe un umbral o concentración máxima en el suelo a la cual se inhibe la actividad microbiana (Leahy y Colwell, 1990).

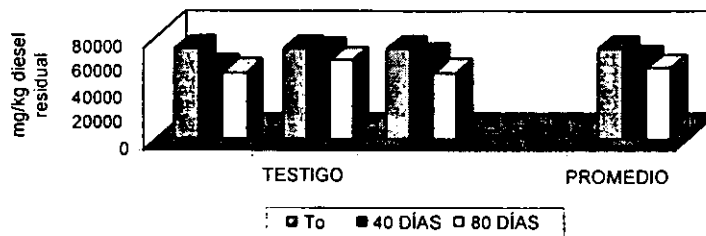


Fig. IV.3. Evolución de la degradación de diesel en la prueba testigo

Por otra parte, la elevada concentración del diesel ocasiona la compactación del suelo, esto puede provocar un reducción en la biodisponibilidad de oxígeno y/o nutrientes como lo sugieren Brown *et al.* (1983) y Bossert y Bartha (1984), lo que ocasiona una disminución en la biodegradación, o una degradación incompleta, que incluso puede ocasionar la acumulación de productos intermediarios hasta niveles tóxicos, tal como lo sugiere Frankenberger (1992).

A pesar de que en este caso en particular, sí se observa que los microorganismos autóctonos pueden degradar el diesel a la concentración que originalmente se encuentra en el suelo, esta degradación es mínima, por tanto, se necesitaría mucho tiempo para que, de manera natural, el suelo recobrar su estado inicial, aún asegurando que la humedad se mantenga constante.

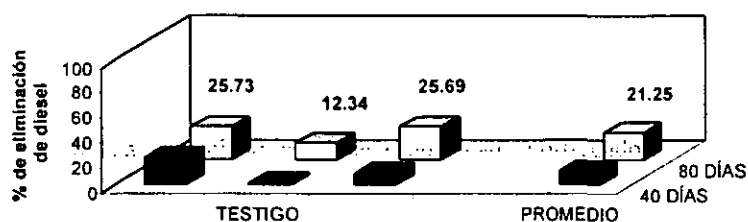


Fig. IV.4. Porcentaje de eliminación de diesel en la prueba testigo

c. Evaluación de parámetros microbiológicos

La concentración de bacterias degradadoras de diesel fue del orden de 10^6 ufc/g, hacia el final del tratamiento disminuyó en un orden de magnitud. Los consorcios de microorganismos responden a los derrames de hidrocarburos incrementando la población de los degradadores. En este caso, la concentración del contaminante es muy alta pero, debido a la antigüedad del derrame, la microbiota ya se encuentra adaptada para consumirlo, de ahí que se dé la atenuación natural. Sin embargo, la tasa de degradación es muy baja, por lo cual existe la necesidad de someter al suelo a un tratamiento en el que se incremente la actividad de los microorganismos y se reduzca el tiempo de degradación del diesel.

El número más probable de bacterias amonificantes se mantuvo casi constante, en el orden de 10^7 bact/ml, con una ligera disminución al final del tratamiento.

La concentración de hongos estuvo en el inicio, en un orden de magnitud de 10^6 ufc/g, disminuyendo paulatinamente hasta 10^5 ufc/g. Raymond *et al.* (1976), observaron que los hongos fueron la flora predominantemente degradadora de hidrocarburos; es muy probable que en este caso, la población de hongos también contribuya a la degradación del diesel. Su sobrevivencia fue favorecida por el pH del suelo que fue de 5.47. La concentración de levaduras fue, en promedio, de 10^8 ufc/g al inicio y disminuyó hasta por debajo de 10^6 ufc/g. Los hongos y levaduras son importantes, ya que son responsables de la degradación de

polímeros vegetales complejos en el suelo, descomponen residuos resistentes y posibilitan a las bacterias el uso de sus metabolitos para continuar el proceso de descomposición. Crecen y se dispersan produciendo muchas células y filamentos y pueden atacar residuos orgánicos muy ácidos o bajos en nitrógeno para la descomposición bacteriana.

El consumo de oxígeno fue muy alto al principio, de 5.685.28 mg/kg a una tasa de 1,047.87 mg/kg-d en la fase exponencial pero, posteriormente, disminuyó hasta 3.174 mg/kg a los 80 días, en donde la tasa de consumo fue de 504.54 mg/kg-d (Tabla IV.5). La producción de CO₂ fue, al inicio, de 5,429.13 mg/kg a una tasa de producción de 1,071.62 mg/kg-d. Al final del tratamiento disminuyó a 3,245.90 mg/kg con una tasa promedio de 502.79 mg/kg-d (Tabla IV.5).

Los resultados de las pruebas de respirometría obtenidos por Zegarra (2000) para este mismo suelo fueron menores, pero esto indica que el suelo tiene buena actividad biológica y, aunque no se refleja en la degradación del contaminante, se ha visto que existen otras fuentes como son la materia orgánica del suelo, la propia biomasa y las fuentes abióticas que son utilizados por los microorganismos y generan CO₂ como producto de su aprovechamiento.

Tabla IV.5. Actividad respirométrica en la prueba testigo

MUESTREO	CONSUMO ACUMULADO DE O ₂ (mg/kg)	TASA DE CONSUMO DE O ₂ (mg/kg-d)	PRODUCCIÓN ACUMULADA DE CO ₂ (mg/kg)	TASA DE PRODUCCIÓN DE CO ₂ (mg/kg-d)	COEFICIENTE DE RESPIRACIÓN (CR)
To	5,885	1,062	5282	1,044	0.95
	5,499	1,025	5583	1,106	
	5,674	1,056	5422	1,064	
Promedio	5,686	1,048	5429	1,072	
% Variabilidad	3.39	1.89	2.77	2.94	
40 DÍAS	3,213	850	3761	602	1.11
	3,346	685	3687	577	
	3,355	681	3599	556	
Promedio	3,305	739	3682	578	
% Variabilidad	2.40	12.98	2.19	3.9	
80 DÍAS	3,079	457	3197	470	1.02
	3,329	533	3398	509	
	3,114	483	3142	530	
Promedio	3,174	505	3246	503	
% Variabilidad	4.25	5.12	4.15	6.07	

El coeficiente de respiración (CR) es un índice que representa las moles producidas de CO₂ por mol de O₂ consumido. De acuerdo con las referencias consultadas una relación C/H de 0.5 (grupo -CH₂-), representa un coeficiente de respiración teórico de 0.67, mientras que para la mayoría de los constituyentes de la materia orgánica del suelo, el coeficiente de respiración oscila entre 0.80 y 1 (Freijer *et al.*, 1996). Si se considera que todo el diesel degradado se mineralizó, los valores del CR, teóricamente, no debieron haber

excedido el valor de 0.67, sin embargo, en este caso los valores estuvieron arriba del teórico, al inicio fue de 0.95, y de 1.11 y 1.02 a los 40 y 80 días, respectivamente. Esto puede indicar que posiblemente, existió otra fuente de producción de CO₂, aunque también se ha visto que no siempre es posible relacionar directamente la degradación de los hidrocarburos con la actividad respirométrica (Zegarra, 2000).

Existe un gran intervalo de CR's reportados en la literatura para diferentes tipos de suelo y de contaminantes, éstos van de 0.32 a 1.5, algunos de estos valores son mayores al teórico de 0.67 debido, posiblemente, a la presencia de otras fuentes de carbono como la materia orgánica. Mientras que otros fueron menores, posiblemente, por no mineralizar toda la fuente de carbono, por la producción de biomasa o por cambios en la producción de CO₂, como consecuencia de la disminución en la fracción más biodegradable.

2. 1ª ETAPA EXPERIMENTAL

En esta etapa se probó el efecto de la mezcla de dos sustratos con el suelo contaminado para diluirlo y para mejorar sus propiedades, y así favorecer la degradación del diesel. Para esto se empleó composta madura producida a partir de desechos domésticos y que tenía 6 meses de madurez; y un residuo agroindustrial, la fibra de coco. Las mezclas se prepararon con una relación suelo:composta y suelo:fibra de coco de 1:3, para alcanzar la concentración inicial de diesel que quedó alrededor de 30,000 mg/kg (Fig. IV.5).

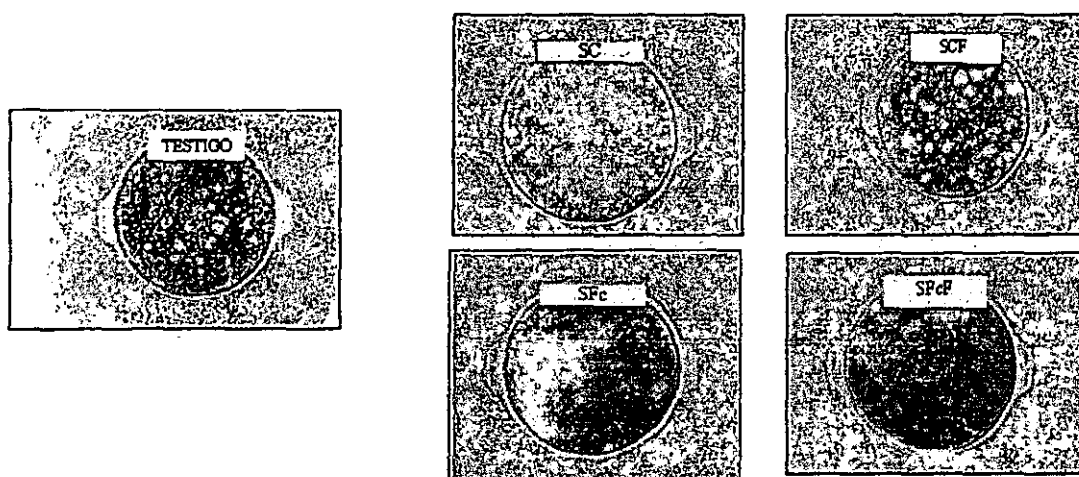


Fig. IV.5. Vista superior de las unidades experimentales correspondientes a la 1ª etapa: testigo; suelo/composta (SC); suelo/composta/fertilizantes (SCF); suelo/fibra de coco (SFc); suelo/fibra de coco/fertilizantes (SFcF)

Las características del suelo variaron dependiendo del sustrato empleado para su dilución, ya que tienen diferente efecto de reacción, y de la adición de fertilizantes, sobre todo por la reacción que produce en el suelo la adición de nitrógeno en forma de urea.

a. Tratamiento con composta

Las tecnologías de composteo o adición de composta, como lo practicado en este estudio, han sido aplicadas para la limpieza ex-situ de suelos contaminados. La adición de una matriz orgánica a un suelo contaminado mejora la actividad microbiana, la retención de agua y la forma en que ésta interactúa con el suelo y, la actividad degradadora específica natural que puede encontrarse en los suelos contaminados (Jorgensen *et al.*, 2000).

La adición de composta madura provee de una mayor concentración de material reactivo que el que se encuentra en el suelo, debido a que su contenido húmico puede ser de hasta 30 % (Cole, 1998).

Evaluación de parámetros químicos

Al realizar las mezclas de suelo con composta, la humedad se mantuvo en condiciones óptimas, con valores de alrededor del 30% debido a que la capacidad de retención de agua (CRA) de la composta es de 151 ml/kg. Se evaluó periódicamente la humedad de todos los recipientes para asegurar que no hubiera déficit de agua a lo largo del tratamiento.

Tabla IV.6. pH y humedad de los tratamientos con composta

MUESTRA	% Humedad			pH		
	T ₀	40 DÍAS	80 DÍAS	T ₀	40 DÍAS	80 DÍAS
Suelo + Composta	27	31	28	7.05	6.36	6.95
	27	33	26	6.94	6.84	7.13
	27	29	23	7.01	6.91	7.38
Promedio	27	31	26	7.0	6.70	7.15
% Variabilidad	1.91	4.99	9.52	0.79	4.46	3.01
Suelo + Composta + Fertilizantes	29	33	27	8.11	8.88	8.42
	29	35	31	8.29	8.87	8.71
	28	31	12	8.24	8.79	8.32
Promedio	29	36	23	8.21	8.84	8.48
% Variabilidad	2.96	4.92	42.30	1.13	0.55	2.38

La degradación del contaminante está altamente influenciada por factores ambientales, de estos, el contenido de humedad, aunque no ha sido identificado como un factor que gobierne directamente la degradación según Freijer *et al.* (1996), tiene una influencia en la efectiva difusión de gases en la atmósfera del suelo.

El pH del suelo originalmente fue de 5.47, al ser mezclado con composta (S+C) se incrementó hasta un pH promedio de 7 (Tabla IV.6), efecto que ha sido mencionado por Kästner y Mahro (1995) y, prácticamente, se mantuvo muy cercano a la neutralidad durante todo el tratamiento, lo que indica que el suelo así mezclado tuvo buena capacidad amortiguadora.

Con la adición de fertilizantes (S+C+F) el pH aumentó hasta 8, esto se debe a que la urea produce reacción alcalina, con lo que se incrementa el pH del suelo. A los 40 días se observó un incremento en este parámetro, alcanzando valores hasta de 8.84.

En lo que respecta al consumo de fertilizantes y debido a que la relación C:N empleada fue alta, se puede observar que la concentración de nitrógeno amoniacal en los tratamientos a los que se adicionó (S+C+F) fue muy alta; los resultados muestran un incremento a lo largo del tiempo, contrario a lo que se esperaba, debido a la presencia de bacterias amonificantes. Este comportamiento se observó tanto en las pruebas con fertilizantes como en las que no se adicionaron, aunque el efecto fue más evidente cuando no se adicionaron (Fig. IV.6).

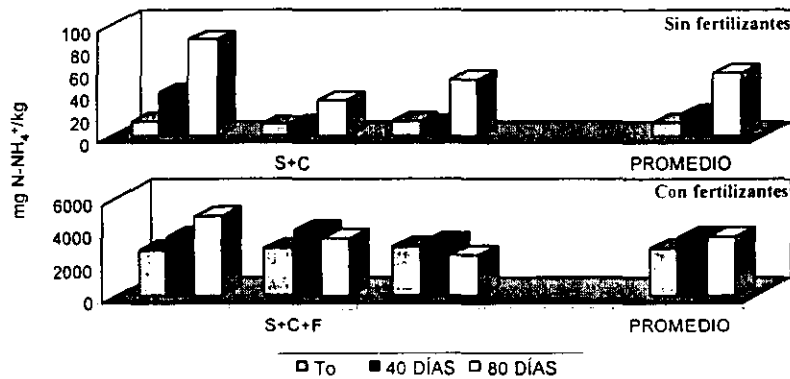


Fig. IV.6. Concentración de N-NH₄⁺ residual en las pruebas con composta

La concentración de nitrógeno total, al incrementarse la de nitrógeno amoniacal, también se incrementó a los 40 días aunque, en general, tendió a disminuir a los 80 días (Fig. IV.7), lo que indica que se

empezó a dar la mineralización de nitrógeno, o bien, fue inmovilizado, principalmente, por incorporación a componentes orgánicos como aminoácidos y proteínas, biosintetizados durante la descomposición de los hidrocarburos (Joergensen *et al.*, 1999; Deni y Pennincky, 1999). El nitrógeno es el elemento determinante de la tasa de descomposición, los microorganismos metabolizan el nitrógeno disponible en forma de amonio, por lo que la adición de nitrógeno inorgánico en cantidades adecuadas acelera la descomposición de la materia orgánica al proporcionar a los microorganismos el nitrógeno necesario para incrementar su actividad, y una pequeña parte es incorporada a la biomasa, ó bien, es empleado por microorganismos nitrificantes (Cabrera *et al.*, 1991).

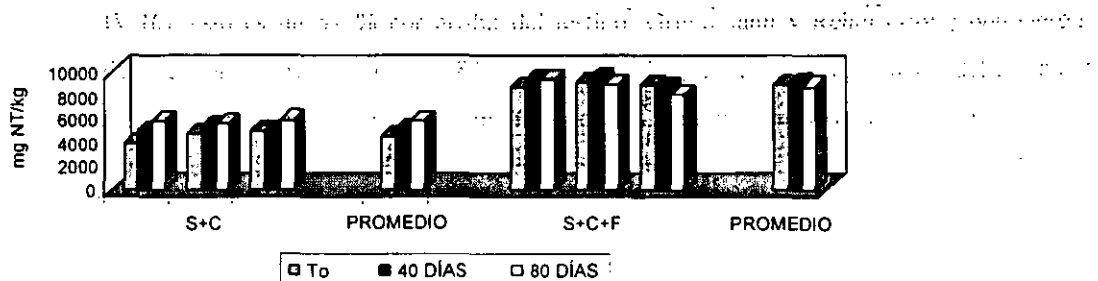


Fig. IV.7. Concentración de nitrógeno total residual en los tratamientos con composta

El fósforo es, también, un elemento fundamental en la descomposición de la materia orgánica. En el caso del fósforo, la cantidad adicionada de este componente fue mínima, según la relación, sin embargo se observó, en el caso de las muestras a las que no se adicionaron fertilizantes, una disminución de los fosfatos, lo que indica que los microorganismos lo consumieron. En las pruebas a las que sí se adicionó fósforo, a los 40 días de tratamiento se observó un incremento pero disminuyó ligeramente hacia el final del tratamiento (Fig.IV.8).

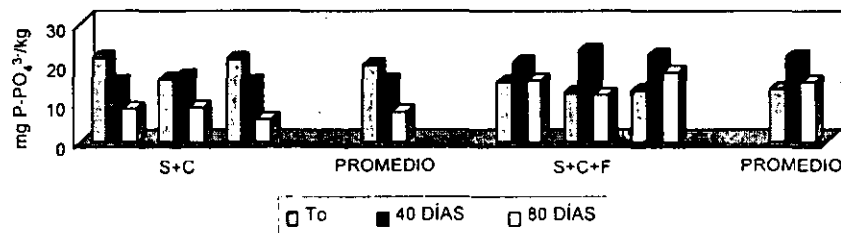


Fig. IV.8. Concentración de P-PO₄³⁻ residual en los tratamientos con composta

Evaluación de la biodegradación del diesel

Previo al inicio de las pruebas, se obtuvo un perfil cromatográfico de un extracto de la composta, y no se observó presencia de ningún compuesto que pudiera interferir en la cuantificación del diesel. Jorgensen *et al.* (2000) realizaron una prueba similar y tampoco detectaron ningún compuesto.

Para el final del tratamiento, se tenía una concentración de diesel residual promedio de 8.553 mg/kg en las pruebas sin fertilizantes (Fig. IV.9), lo que equivale a un porcentaje de eliminación del 72.25% (Fig. IV.10), esto es un 51 % por arriba del testigo. Grundmann y Rehm (1991) obtuvieron un porcentaje de degradación de diesel entre 50 y 85 %. La tendencia que siguió la degradación del contaminante, es un patrón de comportamiento que ha sido obtenido por otros autores independientemente de la concentración inicial. Sin embargo, Zegarra (1999) observó que, a concentraciones de diesel por arriba de 38,000 mg/kg la degradación es muy lenta, ya que aunque el diesel tiene componentes de fácil degradación, las altas concentraciones producen efectos tóxicos en los microorganismos.

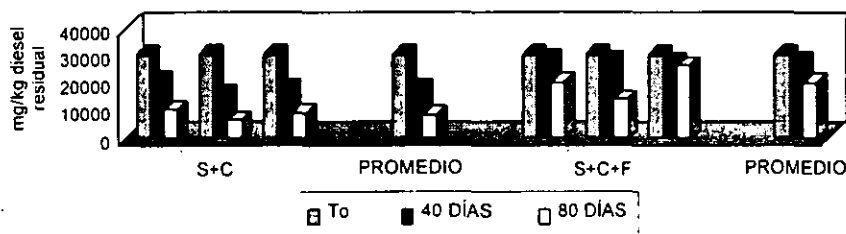


Fig. IV.9. Evolución de la degradación de diesel durante el tratamiento con composta

La concentración de diesel residual al final del tratamiento es un parámetro de importancia fundamental en la aplicabilidad de la biorremediación. Durante la degradación del diesel, los componentes que se degradan primero, son los compuestos de cadena lineal cuya degradación es más sencilla, como lo han determinado algunos autores por espectrofotometría de masas (Walker *et al.*, 1976; Atlas, 1981). La naturaleza del diesel residual no está bien conocida pero, es probable que consista de compuestos alifáticos de cadena ramificada, compuestos aromáticos y poliaromáticos como los naftenos, cada uno de los cuales puede tener una cadena con un grupo alquil unido al centro del anillo. Esta fracción puede ser también inherentemente recalcitrante (Jorgensen *et al.*, 2000), lo que puede resultar en una tendencia al decaimiento en la abundancia microbiana y, además, su degradación requiere microflora con actividad muy especializada (Song & Bartha, 1990; Gruiz and Kriston, 1998). Es probable también, que la difícil degradación del diesel

residual sea producto de cambios en las comunidades microbianas ya que, al final del proceso, la capacidad degradativa puede haberse disminuido (Jorgensen *et al.*, 2000).

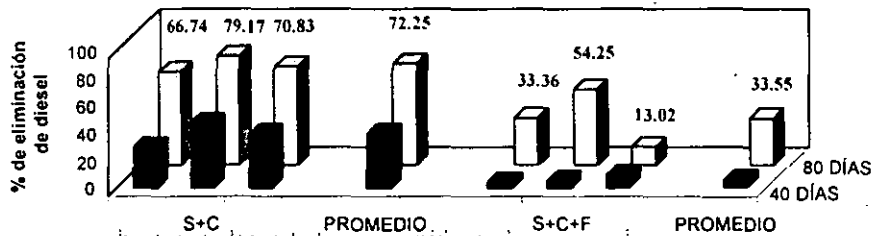


Fig. IV.10. Porcentaje de eliminación de diesel en las pruebas con composta

El perfil cromatográfico (Fig. IV.11) de los suelos corrobora los argumentos anteriores, a tiempos largos en el tratamiento se observa la pérdida de ciertos componentes, los picos definidos (cadenas lineales según Geerdink *et al.*, 1996) son los que se han perdido, mientras que permanecen los picos no definidos y la campana que, de acuerdo con los mismos autores, corresponden a los alcanos ramificados, compuestos aromáticos y poliaromáticos.

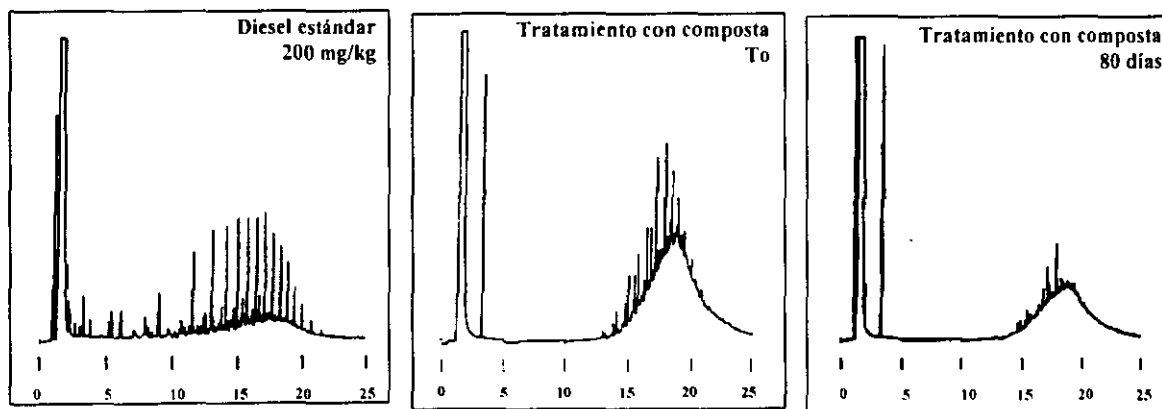


Fig. IV.11. Perfiles cromatográficos de diesel estándar y del suelo tratado con composta

En las pruebas con fertilizantes, a los 40 días la degradación había sido muy baja, con una concentración de diesel residual promedio de 28.774 mg/kg, esto representa sólo un 6.64 % de eliminación, sin embargo, a los 80 días se obtuvo una mayor degradación del contaminante, el cual llegó a 20.481 mg/kg, lo que equivale a una eliminación del 33.35 %, es decir un 12 % arriba del testigo, sin embargo, estadísticamente no existe diferencia significativa entre ambos. Esto puede deberse a que se presentó una

inhibición en la actividad de los microorganismos por un exceso en la concentración de los nutrientes, sobre todo de nitrógeno (Tabla IV.7). Es importante tomar en cuenta este hecho para establecer una relación de nutrientes adecuada, ya que adicionar cantidades excesivas no es benéfico y puede contribuir a la lixiviación de nitratos (Brown *et al.*, 1983).

Tabla IV.7. Concentración y degradación de diesel durante el tratamiento con composta

MUESTRA	DIESEL RESIDUAL (mg/kg)			DEGRADACIÓN DE DIESEL (%)	
	T ₀	40 DIAS	80 DIAS	40 DIAS	80 DIAS
Suelo + Composta	30,820	21,131	10,252	31,44	66,74
		15,765	6,419	48,85	79,17
		18,419	8,989	40,24	70,83
		18,438	8,553	40,17	72,25
% Variabilidad		14,55	22,84	21,67	8,77
Suelo + Composta + Fertilizantes	30,820	29,644	20,537	3,81	33,36
		28,788	14,100	6,59	54,25
		27,890	26,806	9,51	13,02
		28,774	20,481	6,64	33,55
% Variabilidad		3,05	31,02	42,88	61,45

La presencia de varios hidrocarburos refinados puede inhibir la reacción de las ureasas en suelos, de acuerdo con Frankenberger Jr. (1988), quien menciona que en el caso del diesel, el grado de inhibición va del 24 al 44 % de acuerdo con el tipo de suelo, aunque este intervalo no se considera alto.

Graham *et al.* (1999) establecen que aunque el suplemento de nitrógeno y fósforo puede incrementar las tasas de biodegradación, algunas combinaciones de estos dos nutrientes pueden producir bajas tasas de degradación. Los mismos autores mencionan que el aporte excesivo de nitrógeno sobre el fósforo puede influenciar negativamente la eficiencia del sistema, en este caso la relación de nutrientes empleada (100:5:0.1) fue desbalanceada con respecto a la relación N:P.

Evaluación de parámetros microbiológicos

En este tratamiento, como se esperaba, se encontró una alta concentración de microorganismos, esto se debe a que los microorganismos están ya adaptados al contaminante (Jorgensen *et al.*, 2000), su número en general, expresado como microorganismos degradadores, se encontró del orden de 10^7 ufc/g suelo seco. un valor alto a pesar de la elevada concentración del contaminante presente en el suelo, pero se encuentra dentro de los valores reportados por otros autores, de 10^5 a 10^8 ufc/g suelo (Margensin and Shinner, 1997; Jorgensen

et al., 2000). Los altos niveles de bacterias degradadoras persistieron mientras hubo elevadas concentraciones de hidrocarburos en el sistema, ya que el diesel les proporciona una fuente de carbono fácilmente asimilable lo que favorece su actividad. La adición de composta además de aportar materia orgánica, mejora varias propiedades del suelo que favorecen la actividad microbiana.

En este caso en particular, la cantidad de bacterias degradadoras de diesel fue disminuyendo, y a los 80 días estaban en el orden de 10^5 (Fig. IV.12), sin embargo, esta disminución no se vio reflejada en la degradación del diesel. Se ha visto (Atlas, 1981) que aunque se puede correlacionar un alto número de bacterias degradadoras de hidrocarburos con la presencia de éstos, no parece haber una posible correlación entre el número de degradadoras y la tasa de degradación de los hidrocarburos.

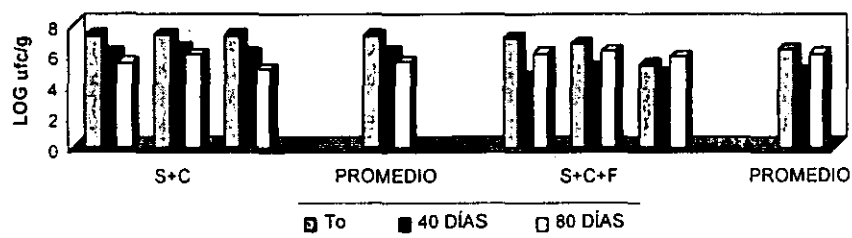


Fig. IV.12. Concentración de bacterias degradadoras de diesel en los tratamientos con composta

En el caso del tratamiento con composta y fertilizantes la disminución en el contenido de bacterias a los 40 días fue de casi dos órdenes de magnitud, esto se debe en parte al pH que presentaron estas muestras (8.65), que pudo inhibir la actividad bacteriana. En este punto se observó una mayor concentración de nitrógeno amoniacal, lo que es también uno de los factores que determinan el incremento del pH del suelo. Sin embargo, se sabe que los actinomicetos tienen un pH óptimo más alcalino que el de las bacterias, incluso se detectó su presencia al llevar a cabo el conteo, por lo que se puede deducir que probablemente los actinomicetos pudieron contribuir a la degradación del diesel, ya que sus enzimas les permiten degradar complejos orgánicos como celulosas, ligninas, quitinas y proteínas, las cuales tienen una estructura muy similar a algunos de los componentes del mismo, como son los compuestos aromáticos y poliaromáticos, cuya degradación generalmente es menos eficiente.

A los 80 días de tratamiento, la cantidad de bacterias degradadoras de diesel se incrementó nuevamente, esto se vio reflejado en un mayor porcentaje de degradación del diesel, para este tiempo el pH ya se encontraba ligeramente más bajo, aunque aún por arriba de 8.

La concentración de hongos se encontró al inicio en el orden de 10^5 ufc/g suelo, y para el final del tratamiento aumentó en promedio un orden de magnitud. En los tratamientos con fertilizantes y debido al pH tan alto que se alcanzó, no se observó su desarrollo. La concentración de levaduras fue al inicio del orden de 10^4 ufc/g suelo y posteriormente se incrementó en casi 2 órdenes de magnitud (Fig. IV.13). De la misma manera que en el caso anterior, con la adición de fertilizantes y el incremento en el pH se vio inhibido su crecimiento, aunque, en este caso, la ligera disminución en el pH que se presentó posteriormente provocó una reactivación de la microflora.

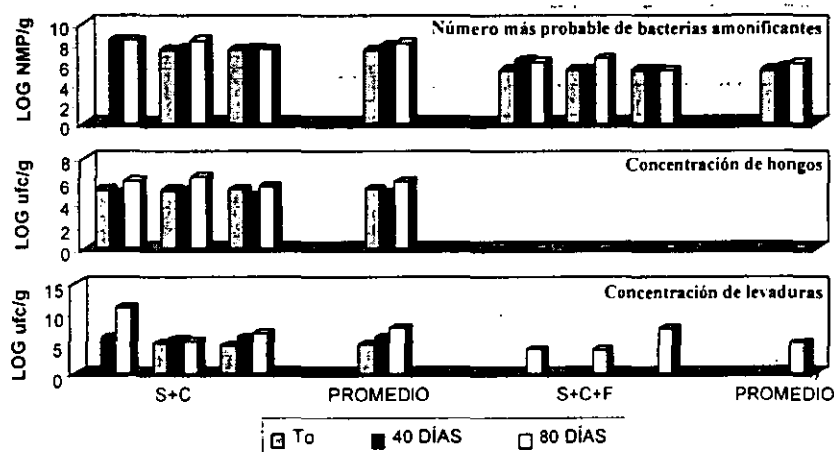


Fig. IV.13. Microorganismos presentes en las muestras tratadas con composta

Como una medida indirecta de la actividad de los microorganismos presentes en el suelo, se midió la actividad respirométrica del suelo para cada uno de los tratamientos, los niveles de CO_2 indican la existencia de biodegradación. Puede apreciarse que se dio una mayor actividad respirométrica en los tratamientos sin fertilizantes que en los que sí los tenían, en éstas últimas a los 40 días se dio un gran incremento en la actividad, la cual disminuyó nuevamente para los 80 días. En el caso de los tratamientos con composta y fertilizantes, a los 40 días disminuyó la producción y, posteriormente, se incrementó ligeramente (Fig. IV.14).

Durante la medición respirométrica se dio un gran consumo de oxígeno, pero no se vio reflejado en la producción de CO_2 , el CR en todos los casos estuvo por debajo del teórico. En las muestras con fertilizantes fue aun más bajo (Tabla IV.8), esto puede deberse a que se llevó a cabo la degradación de la materia orgánica de manera incompleta, lo que pudo dar como resultados la acumulación de intermediarios. La cantidad absoluta de CO_2 presente también puede estar influenciada por el pH (Graham *et al.*, 1999).

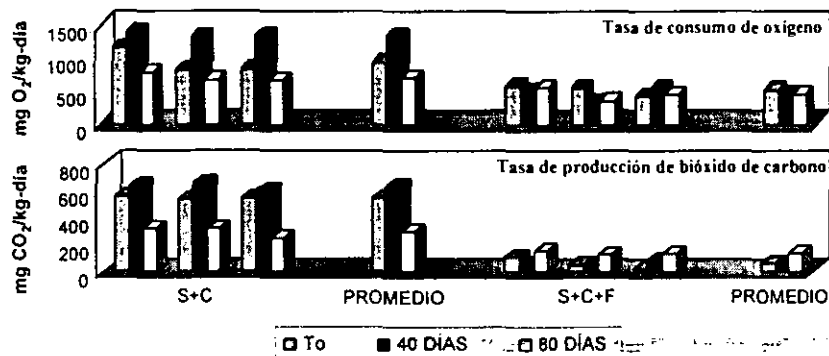


Fig. IV.14. Evolución de la actividad respirométrica en los tratamientos con composta

La fracción de diesel que no se transformó en CO₂, se explica que entra a formar parte de la biomasa microbiana activa o masa residual microbiana (Jorgensen *et al.*, 1995). Para favorecer la utilización de los intermediarios y debido a que la degradación del diesel se lleva de manera aerobia, se mantuvieron mejores condiciones de oxigenación en el suelo. Por esto, cual se llevó a cabo un mezclado con mayor frecuencia, ya que se ha visto que la actividad microbiana y la degradación se incrementan con la aireación (Grundmann and Rehm, 1991; Gruiz and Kriston, 1995). El mezclado incrementó el contenido de O₂ en la atmósfera del suelo y favoreció la disminución de la concentración de CO₂ al mejorar la difusión de los gases (Graham *et al.*, 1999).

Tabla IV.8. Coeficiente de respiración de los tratamientos con composta

MUESTRA	COEFICIENTE DE RESPIRACIÓN (CR)		
	To	40 DÍAS	80 DÍAS
Suelo+Composta	0.64	0.54	0.42
Suelo+Composta+Fertilizantes	0.23	0.15	0.29

Como ya se mencionó anteriormente, el efecto tóxico o inhibitorio de la adición de fertilizantes también se hizo evidente en la medición respirométrica, ya que tanto el consumo de oxígeno como la producción de CO₂ disminuyeron con respecto a los tratamientos sin fertilizantes.

b. Tratamiento con fibra de coco

De la misma manera que la composta, el uso de residuos agroindustriales como son: aserrín, bagazo de caña o fibra de coco, entre otros, se han venido empleando para mejorar algunas de las propiedades físicas de los suelos y así optimizar la degradación de contaminantes. Estos agentes que en la práctica se denominan texturizantes, mejoran la actividad microbiana, ya que son materiales de baja densidad que cuando se adicionan al suelo incrementan la porosidad, la difusión de O_2 , reducen el tamaño de los agregados saturados de hidrocarburos y aumentan su exposición a los sitios microbiológicamente activos (Rhykerd *et al.*, 1999), lo que puede reducir el tiempo requerido para la biorremediación de suelos contaminados.

Evaluación de parámetros químicos

La fibra de coco posee características higroscópicas muy pronunciadas respecto a otros materiales. tiene una capacidad de retención de agua de 3,200 ml/kg de suelo, lo que equivale a retener 3 veces su peso en agua. Debido a esta propiedad es necesario adicionar un mayor volumen de agua para mantener las condiciones de humedad establecidas en 40 %.

Al mezclar el suelo con fibra de coco (S-Fc) el pH no se modificó, debido a que la fibra de coco no tiene el mismo efecto de reacción que la composta, aunque a lo largo del tratamiento sí se incrementó ligeramente, hasta alcanzar un pH promedio de 6.51. Con la adición de fertilizantes (S+Fc+F) el pH se incrementó a 7.85. A los 40 días se observó mayor incremento en este parámetro, alcanzando valores de 8.41 (Tabla IV.9).

Tabla IV.9. pH y humedad de los tratamientos con fibra de coco

MUESTRA	% Humedad			pH		
	T ₀	40 DÍAS	80 DÍAS	T ₀	40 DÍAS	80 DÍAS
Suelo + Fibra de coco	49	49	33	5.92	5.62	6.89
	45	53	51	5.86	5.58	6.19
	48	58	47	5.76	5.65	6.45
Promedio	48	53	44	5.84	5.61	6.51
% Variabilidad	4.13	9.02	21.81	1.38	0.62	5.43
Suelo + Fibra de coco + Fertilizantes	42	61	54	7.73	8.45	8.20
	46	55	56	7.86	8.41	8.26
	47	57	49	7.96	8.39	8.11
Promedio	45	58	53	7.85	8.41	8.19
% Variabilidad	5.5	5.04	6.46	1.46	0.36	0.92

La concentración de nitrógeno amoniacal en las muestras sin fertilizantes se incrementó hacia los 40 días, aunque posteriormente volvió a disminuir. En las mezclas con fertilizantes la concentración tendió a disminuir, con un ligero incremento a los 80 días, esto sugiere que se dio la incorporación del nitrógeno amoniacal a la biomasa o bien a su inmovilización en la matriz del suelo (Fig. IV.15).

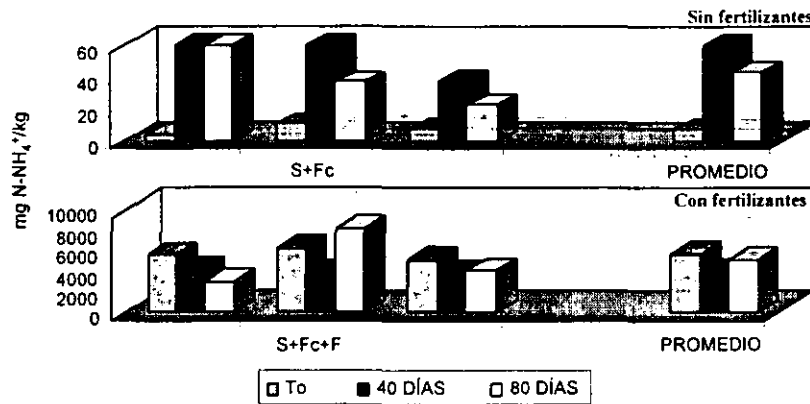


Fig. IV.15. Concentración de N-NH₄⁺ residual en los tratamientos con fibra de coco

De la misma manera que en el tratamiento con composta la concentración de nitrógeno total se incrementó a los 40 días, tanto en las pruebas con fertilizantes como en las que no se adicionaron, esto, como resultado del incremento en el nitrógeno amoniacal, aunque en general tendió a disminuir a los 80 días, aunque la disminución fue mayor para las muestras sin fertilizantes (Fig. IV.16). La variabilidad en los datos obtenidos también puede ser explicada por el hecho de que la cantidad de las formas inorgánicas de nitrógeno en el suelo (nitrógeno amoniacal, nitratos y nitritos) están sujetas a cambios rápidos, a través de procesos como son la amonificación, nitrificación, desnitrificación y otros procesos microbianos conocidos (Black, 1965).

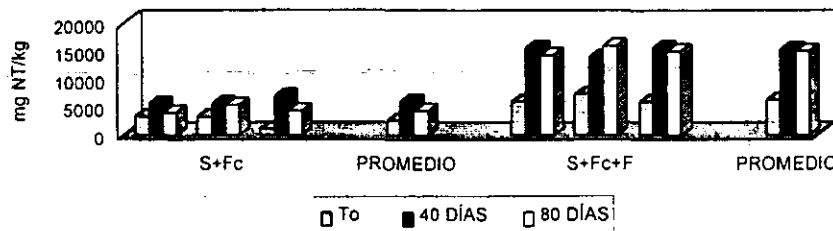


Fig. IV.16. Concentración de nitrógeno total residual en los tratamientos con fibra de coco

La concentración de fósforo en el tratamiento sin fertilizantes disminuyó paulatinamente al ser utilizado por los microorganismos (Fig. IV.17). En el tratamiento con fertilizantes nuevamente se presentó un comportamiento errático causado posiblemente por el efecto inhibitorio de la concentración de nitrógeno sobre los microorganismos.

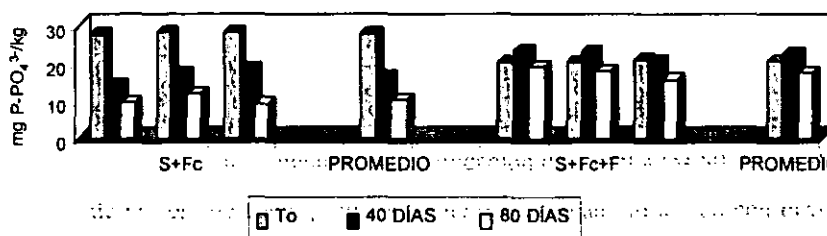


Fig. IV.17. Concentración de $P-PO_4^{3-}$ residual en los tratamientos con fibra de coco

Evaluación de la biodegradación del contaminante

A los 40 días de tratamiento, la degradación del contaminante en los tratamientos sin fertilizantes fue menor en comparación con las pruebas con composta, de 19.91 % en promedio. Al término del tratamiento, el porcentaje de eliminación fue muy cercano al del tratamiento con composta, del 60.69 %, de hecho, no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos (Figs. IV.18 y IV.19).

El pH en estos tratamientos, el cual siempre se mantuvo por debajo de 6, pudo haber influido en la baja degradación del diesel, aunque Kästner y Mahro (1996) observaron que no hay diferencia significativa en la degradación de HPA's entre las pruebas a pH 5 y pH 7.

Se puede observar también, que en las mezclas a las que se adicionaron fertilizantes se dio menor degradación del contaminante, a los 40 días el porcentaje de eliminación era del 14.65 %, pero, a los 80 días el porcentaje fue muy similar al obtenido con composta, 31.75 %, 10 % por arriba del testigo.

La fibra de coco mostró una gran capacidad de adsorción del diesel, de 3.642 ml/kg, esto pudo haber sido la causa de que la degradación haya sido más lenta que con la adición de composta, al estar adsorbido el diesel a la fibra de coco se encuentra menos disponible para los microorganismos. La degradación de los compuestos orgánicos generalmente ocurre en la fase acuosa donde están presentes las bacterias y donde la asimilación del sustrato y nutrimentos puede ocurrir más fácilmente.

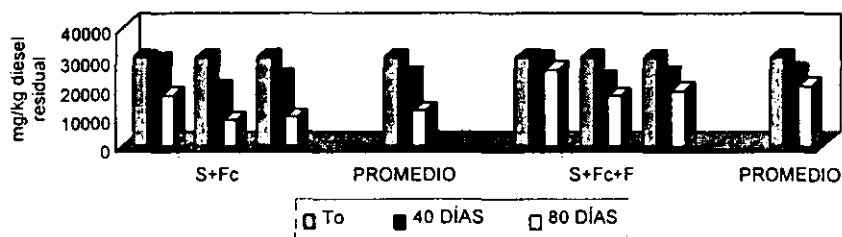


Fig. IV.18. Evolución de la degradación de diesel durante el tratamiento con fibra de coco

El incremento en la degradación de diesel a los 80 días pudo haberse debido a su desorción paulatina de la fibra de coco, probablemente por intercambio iónico con otros componentes, o por cambios en pH y/o humedad, lo cual favoreció su degradación.

En este caso, como con en el tratamiento con composta, la adición de fertilizantes no favoreció la degradación del diesel (Tabla IV.10). Se ha visto (Walworth *et al.*, 1997) que una concentración demasiado alta de sales nutritivas genera un incremento en la presión osmótica que conlleva a una drástica disminución del agua disponible del suelo.

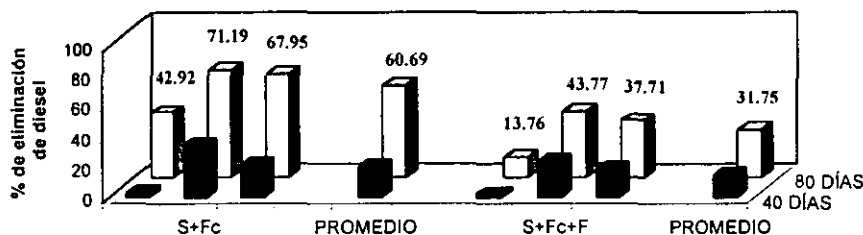


Fig. IV.19. Porcentaje de eliminación de diesel en los tratamientos con fibra de coco

En un estudio realizado por Walker *et al.* (1976) se observó que la degradación de los contaminantes formados por mezclas como es el caso del diesel, es un proceso dinámico y que los componentes, aunque se degradan simultáneamente, son degradados a diferentes tasas. La degradación de alcanos saturados se representa como una línea recta y su degradación es mayor, los alcanos cíclicos de 1 a 3 anillos tienen la misma tendencia, pero su degradación no es tan eficiente, mientras que la tasa de degradación de los hidrocarburos aromáticos es lenta al principio pero después de varias semanas se incrementa.

Tabla IV.10. Concentración y degradación de diesel durante el tratamiento con fibra de coco

MUESTRA	DIESEL RESIDUAL (mg/kg)			DEGRADACIÓN DE DIESEL (%)	
	T ₀	40 DÍAS	80 DÍAS	40 DÍAS	80 DÍAS
Suelo + Fibra de coco	30,254	29,254	17,268	3,31	42,92
		19,704	8,715	34,87	71,19
		23,729	9,695	21,57	67,95
		24,229	11,893	19,91	60,69
% Variabilidad		19,79	39,36	79,58	25,49
Suelo + Fibra de coco + Fertilizantes	30,254	29,574	26,091	2,25	13,76
		23,145	17,012	23,50	43,77
		24,745	18,844	18,21	37,71
		25,821	20,649	14,65	31,75
% Variabilidad		12,96	23,25	75,50	49,98

Evaluación de parámetros microbiológicos

Al inicio, la concentración de bacterias degradadoras de diesel fue del orden de 10^7 ufc/g suelo, disminuyó ligeramente a los 40 días, pero volvió a incrementarse al final del tratamiento. Cuando se adicionaron los fertilizantes, el comportamiento fue inverso, hubo un ligero incremento a los 40 días y posteriormente disminuyó, sin embargo, su número permaneció ligeramente por debajo de 10^7 ufc/g suelo (Fig. IV.20). A pesar de la concentración tan elevada de microorganismos, la degradación, como ya se mencionó, no fue tan eficiente como cuando el suelo se trató con composta. lo que corrobora el hecho de que el contaminante no se encontraba disponible para los microorganismos presentes.

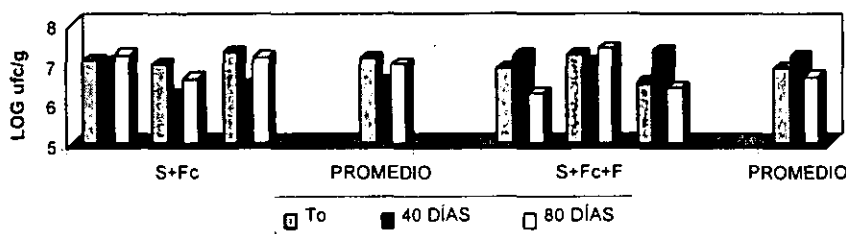


Fig. IV.20. Concentración de bacterias degradadoras de diesel en los tratamientos con fibra de coco

El número más probable de bacterias amonificantes en los tratamientos a los que no se adicionaron fertilizantes se mantuvo, en promedio, en el orden de 10^8 bacterias/g suelo. En el caso de los tratamientos con fertilizantes el número fue menor desde el inicio, esto es, apenas por arriba de 10^5 , a los 40 días se dio un incremento en dos ordenes de magnitud y posteriormente volvió a disminuir (Fig. IV.21). Lo más notable fue

que en el momento que se incrementó el número de bacterias amonificantes se registró una menor concentración de nitrógeno amoniacal, aunque se dio un gran incremento en la concentración de nitrógeno total, esto indica que se incrementó la inmovilización del nitrógeno.

La cantidad de hongos y levaduras en los tratamientos fue del orden de 10^6 ufc/g suelo, los primeros disminuyeron en un orden de magnitud al final del tratamiento, mientras que las levaduras, reportaron un incremento a los 40 días de dos ordenes de magnitud, aunque posteriormente disminuyeron al nivel original (Fig. IV.21). El incremento en el pH provocado por la adición de fertilizantes, influyó en la determinación de ambos tipos de microorganismos, debido a que los hongos se desarrollan en niveles de pH tendientes a la acidez, pues no se observó desarrollo a los 80 días, cuando el pH estaba más alto; asimismo, la concentración de levaduras también disminuyó a los 80 días.

La producción de CO_2 fue mayor que en las pruebas con composta, esto se debió a que la fibra de coco favorece más las propiedades físicas del suelo, como es el hecho de incrementar su porosidad, lo que tiene como consecuencia mayor flujo de gases en la atmósfera del suelo. A los 40 días, de la misma manera que con la composta, se dio un gran incremento en la actividad, la cual posteriormente volvió a disminuir, no obstante, este incremento no se vio reflejado en la degradación del diesel, ya que en el periodo transcurrido entre el inicio y los 40 días ésta fue muy baja (Fig. IV.22).

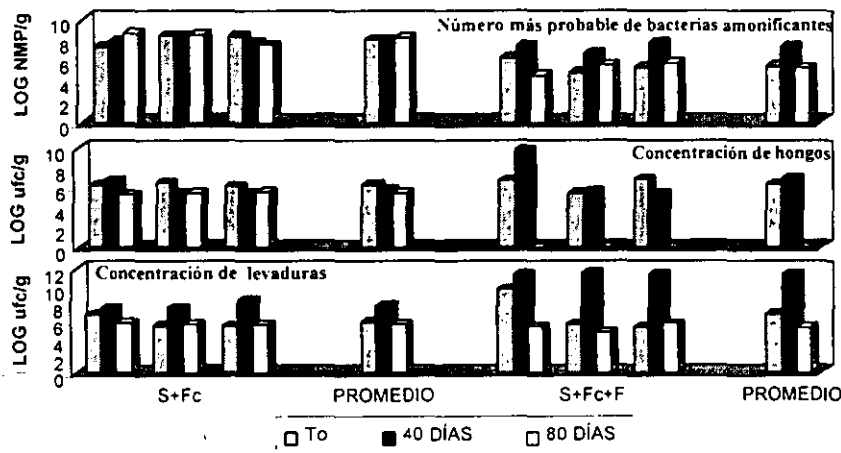


Fig. IV.21. Microorganismos presentes en los tratamientos con fibra de coco

El mismo comportamiento que se describió para los tratamientos con composta, relativo al consumo de oxígeno cuando se adicionaron fertilizantes, volvió a presentarse en los tratamientos con fibra de coco, ya que se observó un mayor consumo de oxígeno en relación con la producción de CO_2 . En este caso también se

llevó a cabo un mayor mezclado para favorecer la completa degradación del contaminante. Se ha observado que la nitrificación promovida por aportes de fertilizantes amonificados resulta en un incremento de iones H⁺ que pueden reaccionar con el CO₂ y disminuir su producción al formarse CO₃²⁻.

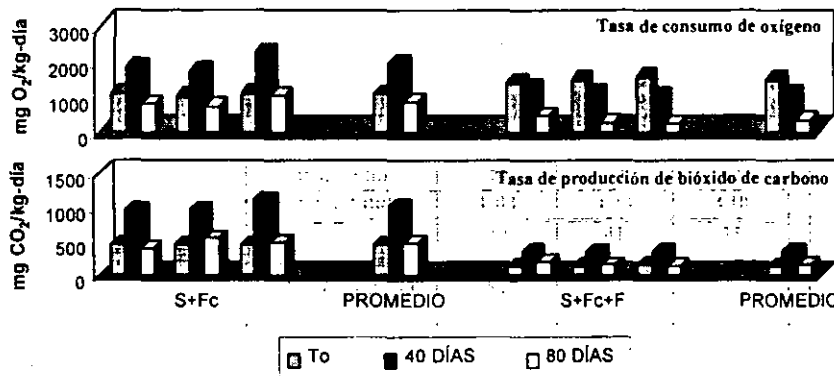


Fig. IV.22. Evolución de la actividad respirométrica de los tratamientos con fibra de coco

Los coeficientes de respiración en estas muestras se presentan en la tabla IV.11, todos los valores estuvieron por debajo del teórico de 0.67, Graham *et al.* (1999) reportan valores esperados de 0.51 a 0.73 para condiciones aerobias. En el tratamiento con fibra de coco sin fertilizantes, no hubo variación en el coeficiente de respiración a lo largo del tiempo. Los valores obtenidos para los tratamientos con fibra de coco y fertilizantes fue aún mucho menor que los obtenidos por estos autores, excepto el obtenido a los 80 días que fue de 0.43. La variabilidad en los CR encontrados indica que las condiciones que pueden permitir esta variación son muchas y muy variadas, Balba *et al.* (1998) mostraron que la tasa de producción de CO₂ no fue indicativa de un aumento en la biodegradación total de los hidrocarburos presentes y observaron una disminución de la fracción orgánica más fácilmente biodegradable.

Tabla IV.11. Coeficiente de respiración de los tratamientos con fibra de coco

MUESTRA	COEFICIENTE DE RESPIRACIÓN (CR)		
	To	40 DIAS	80 DIAS
Suelo+Fibra de coco	0.59	0.54	0.57
Suelo+Fibra de coco+Fertilizantes	0.17	0.29	0.43

El comportamiento observado en presencia de los fertilizantes, que también se observó en la degradación del contaminante, es indicativo de que se presentó una inhibición en la actividad de los microorganismos por un exceso en la concentración de nutrientes, y por el efecto de incremento en el pH que se presenta como consecuencia de la adición de nitrógeno.

Los resultados obtenidos en esta etapa indican que ambos materiales diluyentes, composta y fibra de coco, tienen efectos favorables en la degradación del diesel, siendo la composta la que más la favoreció, ya que la propiedad de sorción que tiene la fibra de coco parece limitar el acceso de los microorganismos al contaminante, y con esto la degradación es más lenta. Por otro lado, la relación de nutrimentos empleada en esta primera etapa, resultó ser inhibitoria para la actividad de los microorganismos.

Con base en estos resultados se planteó para la segunda etapa experimental la mezcla de ambos diluyentes, con el propósito de evaluar su efecto combinado, además, la relación de nutrimentos se redujo para evitar inhibición, y se probó además el efecto de la adición de harina de hueso como fuente de nutrimentos.

c. Efecto del diesel sobre la germinación y crecimiento de semillas

Existen varios estudios ecológicos para determinar la reducción de los niveles de toxicidad de contaminantes en el suelo como resultado de una remediación. Entre estos se encuentran los ensayos con plantas donde se evalúa la germinación de semillas y el crecimiento vegetal. Estos ensayos permiten determinar la concentración del contaminante en el suelo, a la cual puede soportar una cubierta vegetal. Un aspecto importante al evaluar los resultados obtenidos mediante estas pruebas es el hecho de que cada especie vegetal tiene un intervalo de sensibilidad diferente para cada compuesto (Safferman, 1998).

Para evaluar el saneamiento alcanzado con los diferentes tratamientos y considerando además que los suelos habían sido adicionados de materiales ricos en nutrimentos orgánicos se decidió realizar una prueba biológica consistente en determinar el porcentaje de germinación y emergencia de dos especies vegetales, una que es muy resistente a condiciones de estrés como es el alpiste (*Phalaris canariensis*) y otra muy sensible, que es el jitomate (*Lycopersicon esculentum*).

Prueba Testigo. Al final de los 80 días, la prueba testigo mostró una concentración de diesel residual de 55,475 mg/kg, a pesar de esto el porcentaje de germinación de alpiste fue alto, de 84 % del cual el 74 % emergió a la superficie. Estos resultados indican que la concentración de diesel no se encuentra en un nivel tóxico para esta especie, pero sí para el jitomate, el cual tuvo un porcentaje de germinación muy bajo, de 8 % a partir del cual solamente emergió el 1 %. La compactación del suelo provocada por la elevada concentración de diesel en el suelo reduce la disponibilidad de oxígeno para la respiración de la raíz (Foth y Turk, 1975).

Tratamiento con composta. La concentración de diesel al final del tratamiento sin fertilizantes, fue de 8,553 mg/kg y con fertilizantes de 20,481 mg/kg. A pesar de esta diferencia de concentración el porcentaje de germinación de alpiste fue muy similar, del 90 y 88 %, respectivamente, con un porcentaje de emergencia de 80 y 72 %, para cada tratamiento. El porcentaje de germinación del jitomate también fue alto, tanto sin fertilizantes donde germinó el 66 y emergió el 55 %, como con fertilizantes con un porcentaje de germinación y emergencia de 85 y 63, respectivamente (Tabla IV.12).

Tabla IV.12. Porcentaje de germinación y emergencia de semillas de alpiste y jitomate en los tratamientos con composta

MUESTRA	Diesel residual (mg/kg)	ALPISTE		JITOMATE	
		Germinación (%)	Emergencia (%)	Germinación (%)	Emergencia (%)
Suelo+Composta	8,553	90	76	78	70
		91	83	59	43
		89	80	62	52
		Promedio	90	80	66
% Variabilidad	1.07	3.75	10.32	13.33	
Suelo+Composta +Fertilizantes	20,481	90	78	90	71
		87	64	80	54
		84	73	85	63
		Promedio	88	71.58	85
% Variabilidad	1.90	7.01	4.79	8.25	

Tratamiento con fibra de coco. En ausencia de fertilizantes, con una concentración de diesel de 11,893 mg/kg al final del tratamiento, se observó un porcentaje de germinación de alpiste alto, de 88 %, y de emergencia del 82 %, de manera similar al tratamiento con composta. A pesar de que la concentración del diesel fue ligeramente mayor a la que se obtuvo para la composta, la germinación fue más eficiente con fibra de coco, es posible que esto sea un reflejo de los cambios que ocasiona la fibra de coco en algunas de las propiedades físicas del suelo que permite mayor flujo de agua a través de suelo, esto conlleva a un mejor transporte de fertilizantes para su mejor aprovechamiento por las plantas. Los porcentajes de germinación y emergencia del jitomate fueron del 67 y 56 %, respectivamente (Tabla IV.13).

A diferencia de los resultados obtenidos en este estudio, Adam y Duncan (1999) al evaluar el efecto del diesel en 22 especies vegetales de pastos, herbáceas y leguminosas, obtuvieron porcentajes de germinación muy bajos, entre 0 y 50 % a concentraciones de diesel de 50,000 mg/kg, en alpiste fue del 10 %, esto indica que el diesel tuvo un efecto fitotóxico. A bajas concentraciones de diesel, de alrededor de 25,000 mg/kg, el efecto fitotóxico del diesel se reduce y permite un mayor porcentaje de germinación para el alpiste, del 60 %, aunque aseguran que a estas concentraciones la tolerancia de las plantas y su capacidad para germinar en un suelo contaminado con diesel difieren grandemente tanto entre diferentes especies como dentro de las mismas.

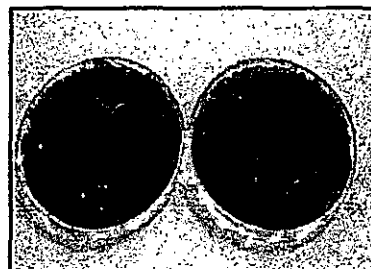
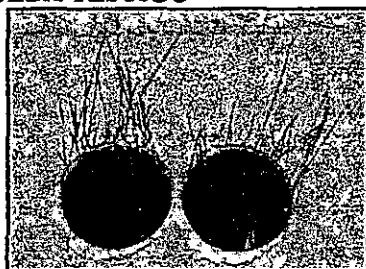
Tabla IV.13. Porcentaje de germinación y emergencia de semillas de alpiste y jitomate en los tratamientos con fibra de coco

MUESTRA	Diesel residual (mg/kg)	ALPISTE		JITOMATE	
		Germinación (%)	Emergencia (%)	Germinación (%)	Emergencia (%)
Suelo+Fibra de Coco	11,893	81	73	72	57
		93	88	68	61
		91	87	61	51
		88	82	67	56
% Variabilidad	6.26	8.34	5.57	5.23	
Suelo+Fibra de coco+Fertilizantes	20,649	85	74	20	7
		98	81	35	8
		95	85	23	9
		93	80	26	8
% Variabilidad	6.67	5.95	8.19	1.33	

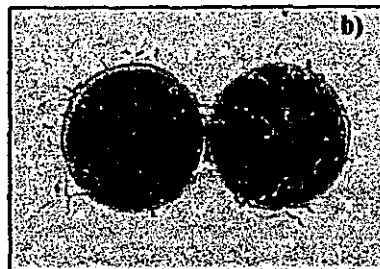
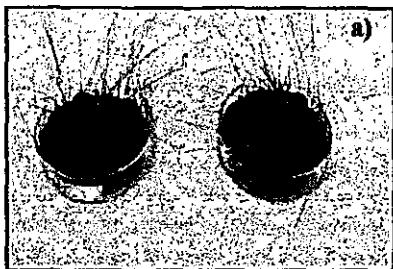
Salanitra *et al.* (1997) obtuvieron porcentajes de germinación del 72 al 88 % con semillas de maíz, trigo y avena a concentraciones de contaminante cercanas a 10,800 mg/kg. En centeno y frijol de soya, a concentraciones menores de 15,000 mg/kg de diesel. Wang y Bartha (1990), obtuvieron porcentajes de germinación de 93 y 89 %, respectivamente. Los efectos dependen en gran medida del tipo y concentración de hidrocarburos, así como de las especies vegetales, tipo de clima y de la naturaleza del suelo.

Fig. IV. 23. Germinación de semillas de a) alpiste (*Phalaris canariensis*) y b) jitomate (*Lycopersicum esculentum*) en suelo contaminado sometido a:

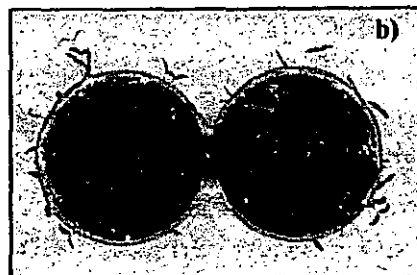
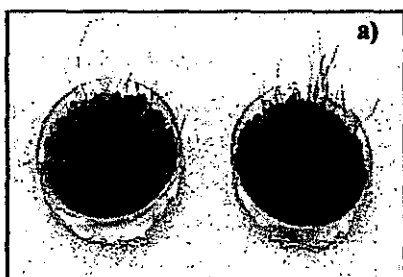
PRUEBA TESTIGO



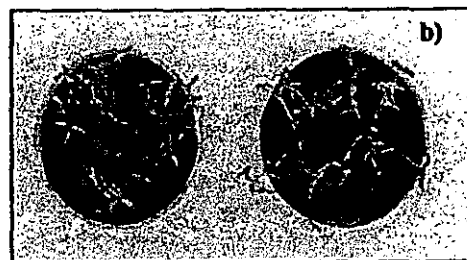
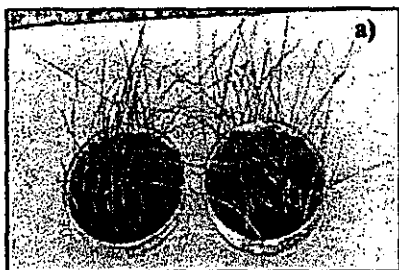
TRATAMIENTO CON COMPOSTA



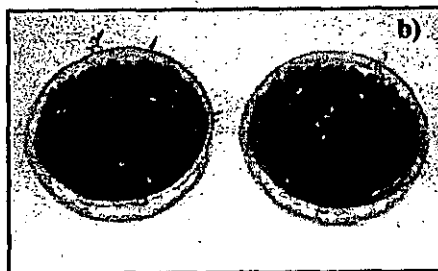
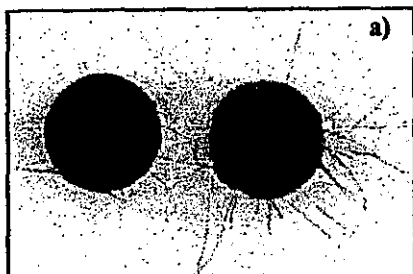
TRATAMIENTO CON COMPOSTA Y FERTILIZANTES



TRATAMIENTO CON FIBRA DE COCO



TRATAMIENTO CON FIBRA DE COCO Y FERTILIZANTES



3. 2ª ETAPA EXPERIMENTAL

Para la 2ª etapa se establecieron las condiciones experimentales tomando como base los resultados obtenidos en la etapa anterior. Se adicionaron composta y fibra de coco en mezcla de acuerdo a la siguiente relación suelo:fibra de coco:composta de 1:0.32:1 para evaluar su efecto combinado. Así mismo, se evaluó el efecto sobre la flora nativa, ya que se adicionaron ambos texturizantes sin esterilizar, para simular las condiciones reales en campo. También se modificó la concentración de fertilizantes para tener una relación C:N-NH₄⁺:P-PO₄³⁻ de 100:10:0.1 y se evaluó el efecto de la adición de harina de hueso como fuente de nutrimentos (Fig. IV.24). En este caso, los diferentes tratamientos se manejaron por cuadruplicado.

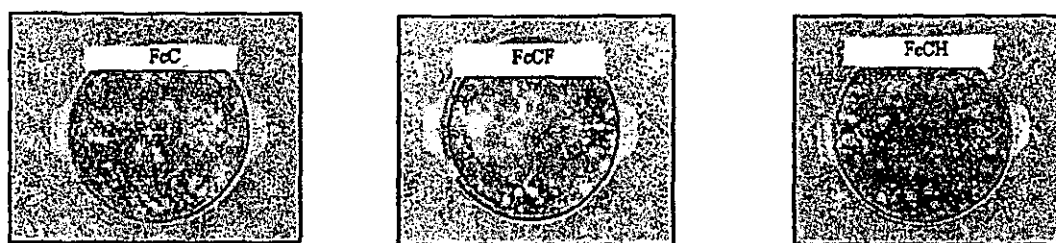


Fig. IV.24. Vista superior de las unidades experimentales correspondientes a la 2ª etapa: suelo/composta/fibra de coco (FcC); suelo/composta/fibra de coco/fertilizantes (FcCF); suelo/composta/fibra de coco/harina de hueso (FcCH)

a. Evaluación de parámetros químicos

En la tabla IV.14 se presentan el pH y humedad de los tratamientos con texturizantes combinados. A pesar de que la proporción de fibra de coco adicionada fue menor que de composta, se requirió mantener la humedad a un nivel cercano al 40 %, con la finalidad de saturar de agua la fibra de coco y evitar la adsorción del diesel, ya que la capacidad de retención de diesel por la fibra de coco cuando está saturada de agua es de sólo 134 ml/kg, con lo que se reduce 27 veces la adsorción. En presencia de ambos diluyentes, el pH se llevó a alrededor de 7.

La adición de fertilizantes como fuente de nitrógeno y fósforo, como en la primera etapa tuvo un efecto en la reacción, sobre todo por la urea, que incrementó el pH del suelo a 7.82, aunque después disminuyó ligeramente y permaneció por arriba de 7, como era de esperarse no se incrementó tanto debido a

que la relación de nutrientes empleada fue menor. La harina de hueso tuvo un mínimo efecto de reacción, por lo que el pH se incrementó más hasta los 80 días y permaneció muy cercano a 7.

Tabla IV.14. pH y humedad de los tratamientos combinados

MUESTRA	%Humedad			pH		
	T ₀	40 DÍAS	80 DÍAS	T ₀	40 DÍAS	80 DÍAS
Suelo+Fibra de coco+Composta	41	40	38	6.74	7.01	7.1
	41	40	38	6.8	7.13	7.20
	41	39	41	6.76	7.13	6.23
	42	39	40	6.84	7.19	7.17
Promedio	41	39	39	6.78	7.11	6.93
% Variabilidad	1.03	1.33	3.10	0.65	1.06	6.73
Suelo+Fibra de coco+Composta +Fertilizantes	42	41	35	7.8	7.11	6.91
	41	38	38	7.78	7.11	6.74
	41	39	33	7.86	7.14	6.71
	42	40	31	7.87	7.13	6.72
Promedio	42	39	34	7.82	7.12	6.77
% Variabilidad	1.77	3.44	8.62	0.56	0.25	1.39
Suelo+Fibra de coco+Composta +Harina de hueso	42.2	38.00	37.12	6.59	7.11	7.10
	41.6	40.55	31.44	6.66	7.13	6.91
	41.5	35.4	42.1	6.66	7.19	7.05
	41.1	32.05	38.76	6.69	7.22	7.13
Promedio	41.6	36.5	37.63	6.65	7.16	7.05
% Variabilidad	1.09	9.96	11.93	0.63	0.71	1.40

La concentración de nitrógeno amoniacal en los tratamientos a los que no se adicionaron nutrientes se incrementó paulatinamente a lo largo del tiempo. El contenido de bacterias amonificantes al inicio se encontraban en el orden de 10⁹ bact./g, que es un valor muy alto, esto puede ser el origen del incremento en la concentración del nitrógeno amoniacal.

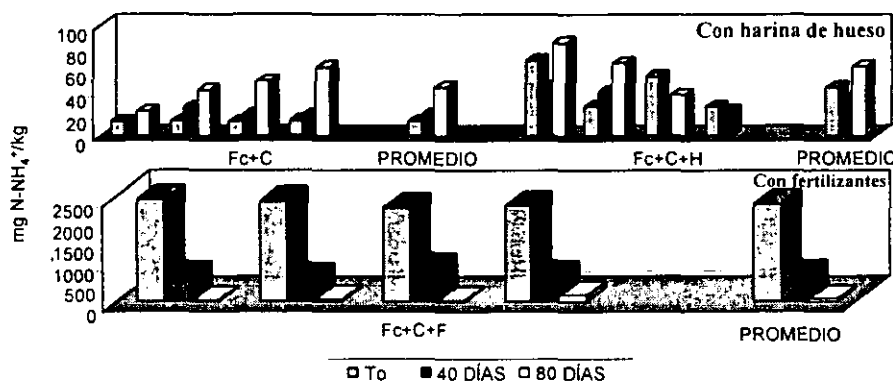


Fig. IV.25. Concentración de N-NH₄⁺ residual en los tratamientos con texturizantes combinados

En el caso de los tratamientos a los que se adicionaron fertilizantes y harina de hueso, a pesar de que la concentración al inicio fue muy elevada, si se observó disminución de nitrógeno amoniacal a través del

tiempo debido a su utilización por parte de los microorganismos, y casi fueron consumidos por completo (Fig. IV.25). Sin embargo, lo anterior no se vio reflejado en la actividad degradadora de los microorganismos, ya que la degradación fue mínima, esto puede ser un reflejo de la utilización del nitrógeno amoniacal por los microorganismos para otros procesos del ciclo biogeoquímico o bien porque se haya combinado en el suelo.

La adición de harina de hueso no incrementó en gran medida la concentración de nitrógeno amoniacal, tanto como lo hicieron los fertilizantes. Su comportamiento fue muy irregular pero tendió a incrementarse. El contenido de bacterias amonificantes en estas pruebas también fue alto de entre 10^8 y 10^9 bacterias/g, de la misma manera que en el caso del tratamiento sin nutrientes. La concentración de nitrógeno total en todos los casos fue muy elevada, y permaneció así durante todo el tratamiento, aunque en presencia de fertilizantes tendió a disminuir ligeramente (Fig. IV.26).

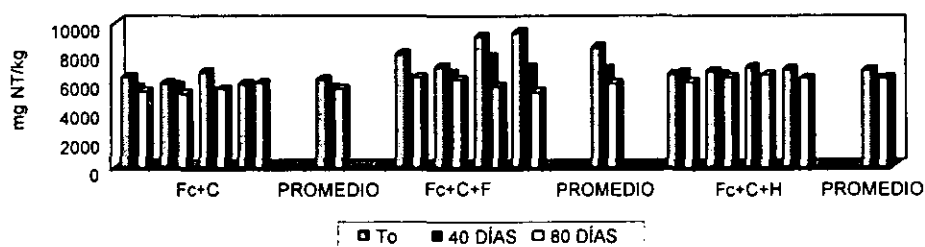


Fig. IV.26. Concentración de nitrógeno total residual en los tratamientos con texturizantes combinados

La concentración de fósforo en los tratamientos sin nutrientes, y en las que se adicionaron los fertilizantes disminuyó a los 40 días y volvió a incrementarse para los 80 días, como se aprecia en la fig. IV.27. El fósforo puede adsorberse a la matriz del suelo y por mineralización puede ser liberado, de ahí que se observe incremento. Además, la producción de CO_2 y ácidos orgánicos por los microorganismos promueve la disolución de los fosfatos de baja solubilidad, por lo que en el caso de los tratamientos con fertilizantes, en el intervalo de los 40 a los 80 días donde se registró una mayor degradación del diesel, se produjo mayor generación de CO_2 y ácidos orgánicos como producto de la degradación. En los tratamientos con harina de hueso la concentración de fósforo tendió a disminuir.

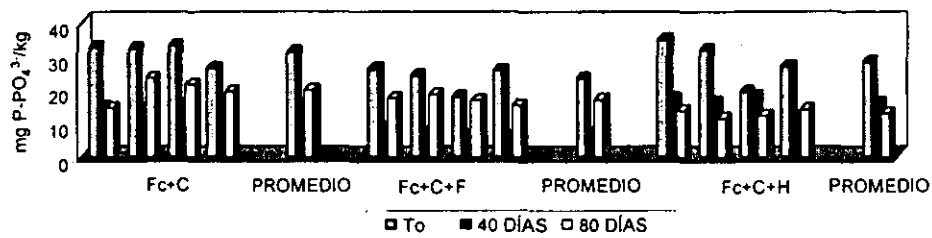


Fig. IV.27. Concentración de P-PO₄³⁻ residual en los tratamientos con texturizantes combinados

b. Evaluación de la biodegradación del diesel

En los tratamientos sin fertilizantes y con harina de hueso, hubo mayor degradación del diesel en el intervalo de los primeros 40 días, 54.06 y 58.29 % respectivamente, que de los 40 a los 80, de 61.61 y 67.49 % de degradación, respectivamente (Figs. IV.28 y IV.29). Este comportamiento que ha sido detectado ya por otros autores (Jorgensen *et al.*, 2000), influye en las comunidades microbianas de manera que al disminuir la concentración de la fuente de carbono disminuye la población de bacterias degradadoras del mismo, por ello disminuye el porcentaje de degradación a los 80 días y, efectivamente, a los 40 días hubo un decremento en la cantidad de bacterias degradadoras, el cual obedece a una disminución muy marcada en la concentración de diesel.

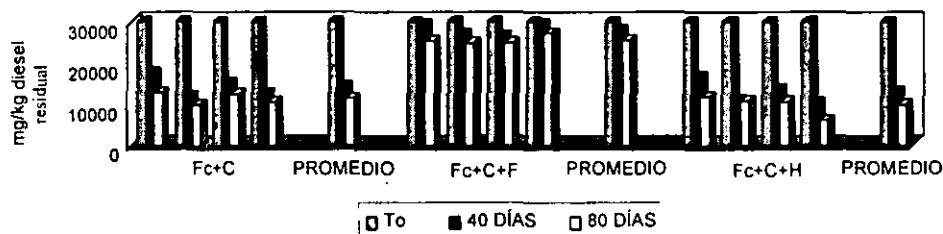


Fig. IV.28. Evolución de la degradación de diesel durante el tratamiento con texturizantes combinados

La degradación del diesel en ausencia de fertilizantes y en los tratamientos a los que se adicionó harina de hueso es muy similar, y no existe diferencia significativa entre los dos tratamientos, lo que indica que la mezcla de ambos diluyentes es una buena opción de tratamiento.

Los tratamientos a los que se les adicionaron fertilizantes presentaron un porcentaje de degradación muy bajo, de 9.79 % a los 40 días y 18.03 % al final del tratamiento, valor que se encuentra por debajo del

testigo. Esto indica que a pesar de que se disminuyó la relación de nutrientes y de que hubo un decremento en la concentración de los mismos, ésta resultó ser inhibitoria para los microorganismos encargados de la degradación del diesel (Tabla IV.15).

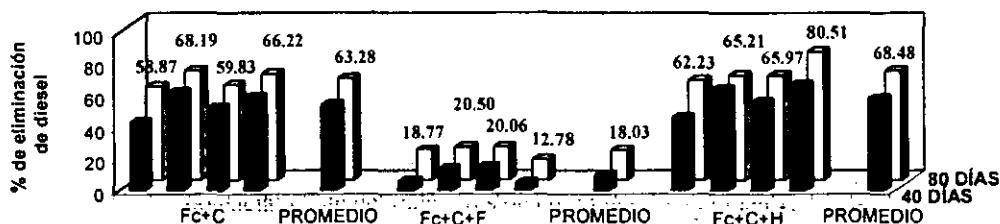


Fig. IV.29. Porcentaje de eliminación de diesel en los tratamientos con texturizantes combinados

Aunque se observó que en este caso en particular no fue necesaria la adición fertilizantes, la adición de nutrimentos en forma más compleja como es la harina de hueso resultó favorable, ya que la liberación de los nutrimentos es paulatina y funciona además como un texturizante, pues evitó la compactación del suelo lo que favoreció el movimiento de agua y gases a través del mismo.

Tabla IV.15. Concentración y degradación de diesel durante el tratamiento con texturizantes combinados

MUESTRA	DIESEL RESIDUAL (mg/kg)			DEGRADACIÓN DE DIESEL (%)	
	T ₀	40 DIAS	80 DIAS	40 DIAS	80 DIAS
Suelo+Fibra de coco+Composta	31,205	17,650	12,835	43,44	58,87
		11,997	9,926	61,55	68,19
		15,068	12,535	51,71	59,83
		12,628	10,550	59,53	66,22
	Promedio	14,336	11,459	54,06	63,28
% Variabilidad	17,97	12,59	15,27	7,31	
Suelo+Fibra de coco+Composta +Fertilizantes	31,205	29,377	25,349	5,86	18,77
		26,917	24,807	13,74	20,50
		26,666	24,944	14,55	20,06
		29,637	27,216	5,02	12,78
	Promedio	28,149	25,579	9,79	18,03
% Variabilidad	5,59	4,36	51,54	19,83	
Suelo+Fibra de coco+Composta +Harina de hueso	31,205	16,882	11,785	45,90	62,23
		11,165	10,856	64,22	65,21
		13,634	10,618	56,31	65,97
		10,378	60,81	66,74	80,51
	Promedio	13,015	9835	58,29	68,48
% Variabilidad	22,49	25,96	16,09	11,95	

c. Evaluación de parámetros microbiológicos

En todas las mezclas la concentración inicial de bacterias degradadoras de diesel, fue del orden de 10^7 ufc/g, sin embargo, a los 40 días disminuyó en 2 órdenes de magnitud en los tratamientos sin fertilizantes y a los que se adicionó harina de hueso, y 3 órdenes de magnitud en los que se adicionaron fertilizantes, para los 80 días se incrementó en todos los casos nuevamente hasta por arriba de 10^6 ufc/g (Fig. IV.30). Ambos diluyentes, y en particular la composta, aportan al suelo un gran número de microorganismos benéficos (bacterias, hongos) que son capaces de extraer nutrimentos de la fracción mineral del suelo, y pueden ser potencialmente degradadores de cualquier contaminante.

El contenido de bacterias amonificantes al inicio se encontraba por arriba de 10^9 bacterias/g en los tratamientos sin fertilizantes y además con harina de hueso, estas bacterias transforman el nitrógeno que se encuentra en forma orgánica (proteínas) en amonio, de ahí el incremento del nitrógeno amoniacal. En el caso de la adición de fertilizantes, las bacterias amonificantes estuvieron en el orden de 10^7 , disminuyendo ligeramente a lo largo del tratamiento. En este caso no hubo incremento en el nitrógeno amoniacal, por el contrario, hubo un consumo por parte de los microorganismos. Esto provocó un decremento en el pH del suelo, lo que favoreció las condiciones para que se llevara a cabo la degradación del contaminante aunque esta fue mínima. Tal vez como ocurrió en la primera etapa experimental, la concentración de nitrógeno amoniacal resultó inhibitoria para los microorganismos degradadores, o bien el nitrógeno se aprovechó para otros procesos o se fijó en el suelo.

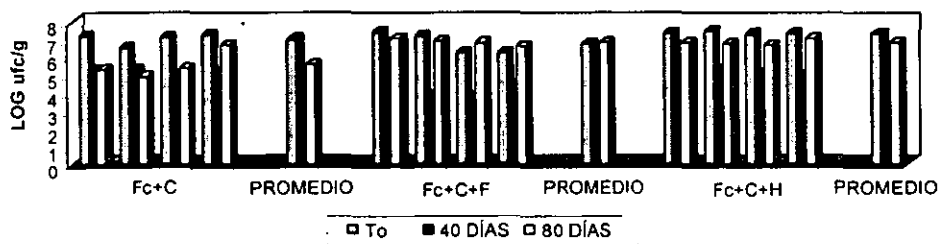


Fig. IV.30. Concentración de bacterias degradadoras de diesel en los tratamientos con texturizantes combinados

La cantidad de hongos al inicio fue del orden de 10^6 ufc/g de suelo en los tratamientos sin fertilizantes y en los que se adicionó la harina de hueso, y en ambos casos tendió a disminuir a lo largo del tiempo. En el caso de los tratamientos con fertilizantes al inicio fue del orden de 10^5 ufc/g, a pesar de que el

pH del suelo se encontraba muy cercano a 8. La cantidad de levaduras al inicio fue del orden de 10^6 ufc/g en los tratamientos con y sin fertilizantes, en presencia de harina de hueso fue del orden de 10^7 ufc/g, y en todos los casos tendió a disminuir (Fig. IV.31).

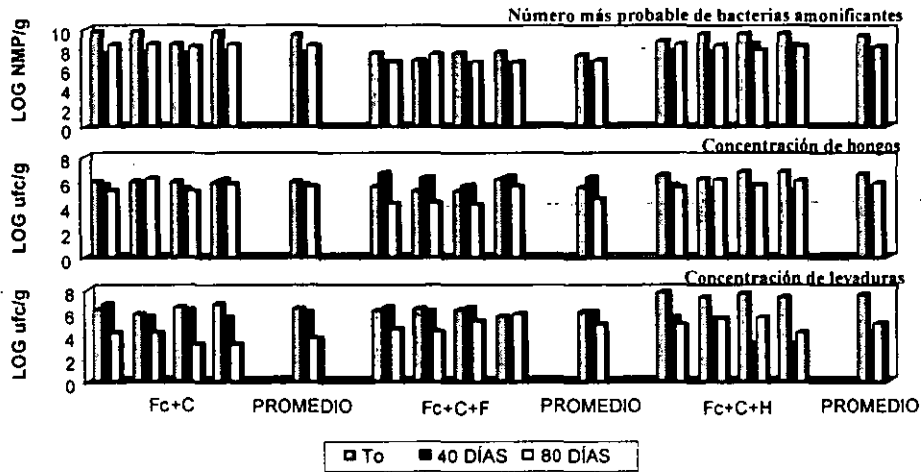


Fig. IV.31. Microorganismos presentes en los tratamientos con texturizantes combinados

La evolución de la actividad respirométrica se presenta en la fig.IV.32. El consumo de oxígeno al inicio fue mayor para los tratamientos sin fertilizantes, de 7,205 mg/kg, con fertilizantes fue de 3,049.83 y con harina de hueso de 4,377. 62 mg/kg. A lo largo del tiempo que duró el tratamiento disminuyó de manera similar en todos los casos. La producción de CO_2 tuvo un comportamiento parecido.

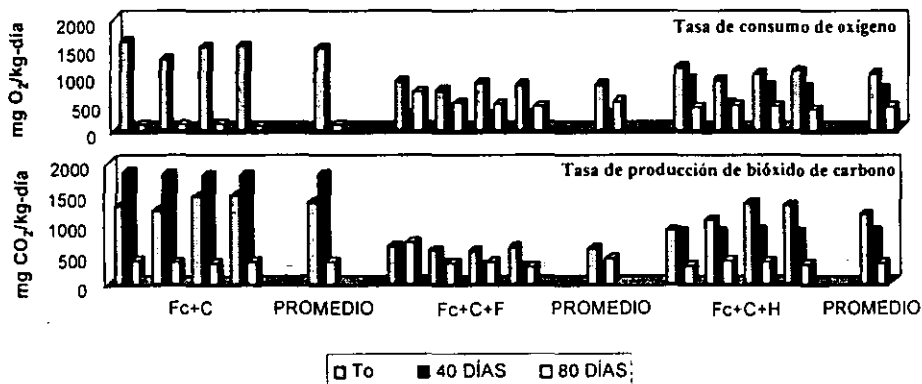


Fig. IV.32. Evolución de la actividad respirométrica de los tratamientos con texturizantes combinados

Este comportamiento no puede relacionarse directamente con la degradación del diesel, ya que en el caso de los tratamientos a los que se adicionaron los fertilizantes la degradación fue muy baja, incluso menor que la de la prueba testigo. sin embargo, es posible que los microorganismos utilicen para sobrevivir otras fuentes de carbono como la proveniente de la materia orgánica ó de fuentes abióticas como los carbonatos (Frankenberger, 1992; Aelion *et al.*, 1997) y por ello se observa actividad respirométrica. Zegarra (2000) reportó también esta ausencia de relación entre la degradación de los contaminantes y la actividad respirométrica, utilizando el mismo suelo contaminado. Es posible que las poblaciones no degradadoras de diesel tengan requerimientos nutricionales diferentes a las degradadoras (Smith *et al.*, 1998), por lo que el efecto del aporte de nitrógeno y fósforo no produce una respuesta en el consumo de oxígeno y producción de CO₂ equivalente al de la biodegradación.

En la tabla IV.16 se muestran los coeficientes de respiración de los tratamientos, todos se encuentran muy por arriba del teórico, y algunos aún por arriba de los indicados en la literatura, aunque estos corresponden a pruebas realizadas bajo condiciones muy distintas a las empleadas en este estudio.

Se puede deducir que el suelo utilizado no requiere la adición de fertilizantes, incluso su adición causó inhibición de la actividad de los microorganismos. En el caso de la harina de hueso agregado como nutrimento si fue favorable para la degradación, ésta suministra una mayor cantidad de fósforo que de nitrógeno. lo que sugiere que este suelo requiere fósforo más que nitrógeno. de ahí que el tratamiento con este material haya sido muy efectivo. Por otra parte, la harina de hueso funcionó como texturizante, ya que mejoró la estructura del suelo evitando su compactación. esto favoreció la difusión de gases y agua a través del mismo lo que incrementó la actividad microbiana.

Tabla IV.16. Coeficiente de respiración de los tratamientos con texturizantes combinados

MUESTRA	COEFICIENTE DE RESPIRACIÓN (CR)		
	To	40 DÍAS	80 DÍAS
Suelo+Fibra de coco+Composta	0.82	3.43	0.83
Suelo+Fibra de coco+Composta+Fertilizantes	0.73	1.25	0.71
Suelo+Fibra de coco+Composta+Harina de hueso	1.14	2.34	0.80

La simple dilución del suelo contaminado con los dos texturizantes dio buenos resultados. Esto se debe a los beneficios que aporta cada uno de los sustratos. La composta proporciona una matriz orgánica que suministra un hábitat para los microorganismos presentes, esta matriz es un reservorio de nutrimentos los

cuales son asimilados por los microorganismos de acuerdo con sus necesidades, además, incorpora al suelo microorganismos benéficos. Por otro lado se suman las ventajas que proporciona la fibra de coco, como es el mejoramiento de las propiedades físicas del suelo con lo que se incrementa el flujo de gases y agua a través del mismo.

d. Efecto del diesel residual sobre la germinación de semillas y crecimiento vegetal

De la misma manera que en la 1ª etapa se evaluó el efecto de la concentración del diesel residual sobre la germinación de alpiste (*Phalaris canariensis*) y jitomate (*Lycopersicon esculentum*) al final del tratamiento.

En los tratamientos sin fertilizantes la concentración de diesel residual fue de 11.459 mg/kg. El porcentaje de germinación del alpiste fue del 78 % y 67 % de emergencia, mientras que el porcentaje de germinación de semillas de jitomate fue de 64 % con un 25 % de emergencia.

En el tratamiento al que se adicionaron fertilizantes, el porcentaje de germinación de alpiste fue del 85 % del cual el 93 % emergió. Estadísticamente, no existe diferencia significativa entre este valor y el obtenido en el tratamiento sin fertilizantes. Sin embargo, el porcentaje de germinación del jitomate fue muy bajo, del 13 % y ninguno emergió. La ausencia de efectos benéficos en el crecimiento vegetal producidos por la biorremediación se deben más que por efectos ecotóxicos directos, al hecho de que los hidrocarburos residuales causan cambios significativos en las propiedades físicas del suelo, especialmente la capacidad del suelo para absorber y mantener agua (Li *et al.*, 1997). La concentración de diesel residual al final del tratamiento fue en promedio de 25,579 mg/kg, mucho más alta que la obtenida en los demás tratamientos, es posible que esta concentración resulte tóxica para esta especie en particular. Salanitro *et al.* (1997) obtuvieron, a concentraciones de diesel cercanas a 25.000 mg/kg, porcentajes de germinación muy similares a los obtenidos en este trabajo en alpiste; de 84 a 96 %; en semillas de maíz, trigo y avena, éstos porcentajes son cerca de un 20% más alto a los que se obtuvieron en este trabajo, con semillas de jitomate.

En el tratamiento con harina de hueso la concentración final de diesel fue de 9.835 mg/kg. El porcentaje de germinación de alpiste fue del 86 %, de éste, sólo el 7 % no emergieron. El porcentaje de germinación de jitomate fue del 59 %, muy cercano al obtenido con el tratamiento sin fertilizantes, sin que existe diferencia significativa entre ellos y, aunque la concentración del diesel en presencia de harina de hueso fue menor que sin fertilizantes, el porcentaje de emergencia fue de 41 % (Tabla IV.17).

Tabla IV.17. Porcentaje de germinación y emergencia de semillas de alpiste y jitomate en los tratamientos con texturizantes combinados

MUESTRA	Diesel residual (mg/kg)	ALPISTE		JITOMATE	
		Germinación (%)	Emergencia (%)	Germinación (%)	Emergencia (%)
Suelo+Fibra de coco+Composta	11,459	66	66	57	27
		88	65	72	23
		79	69	62	27
		85	66	68	28
		Promedio	78	67	64
% Variabilidad	9.57	2.04	6.37	2.30	
Suelo+Fibra de coco+Composta+Fertilizantes	25,579	80	81	11	0
		89	94	17	0
		86	81	12	0
		84	84	12	0
		Promedio	85	85	13
% Variabilidad	3.66	6.18	2.95	0	
Suelo+Fibra de coco+Composta+Harina de hueso	9,835	84	75	57	33
		89	87	59	49
		84	72	62	40
		98	86	65	45
		Promedio	86	78	59
% Variabilidad	6.67	7.62	3.66	6.91	

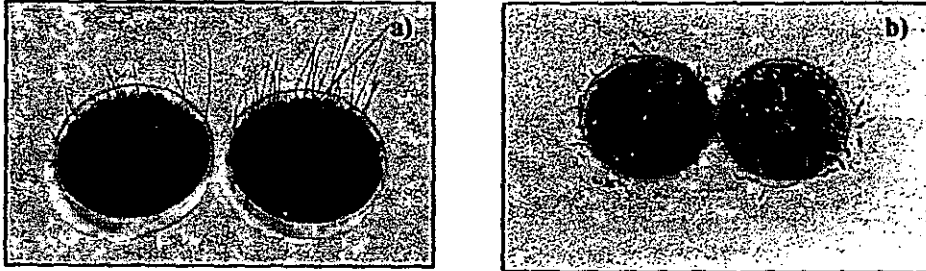
Salanito *et al.* (1997) obtuvieron porcentajes de germinación de maíz, trigo y avena de 73, 72 y 88 %, respectivamente, a una concentración de HTP's de 10, 800 mg/kg, ésta concentración es muy cercana a la que se tenía en los tratamientos sin fertilizantes y cuando se adicionó el harina de hueso, los porcentajes de germinación obtenidos por estos autores fueron también muy similares. Wang y Bartha (1990) en estudios de germinación y crecimiento de semillas de soya y centeno obtuvieron, después de 14 semanas de tratamiento de un suelo contaminado con diesel, porcentajes de germinación del 93 y 89 %, respectivamente.

En la mayoría de los tratamientos aplicados en este estudio, el porcentaje de germinación y emergencia para el caso del alpiste fue muy elevado, a pesar de las diferentes concentraciones de diesel que se tenían al final de cada tratamiento. Adam y Duncan (1999) observaron que los pastos son muy importantes para evitar la erosión de los suelos que han sido sometidos a biorremediación, además de que son especies muy resistentes a los efectos fitotóxicos de los hidrocarburos.

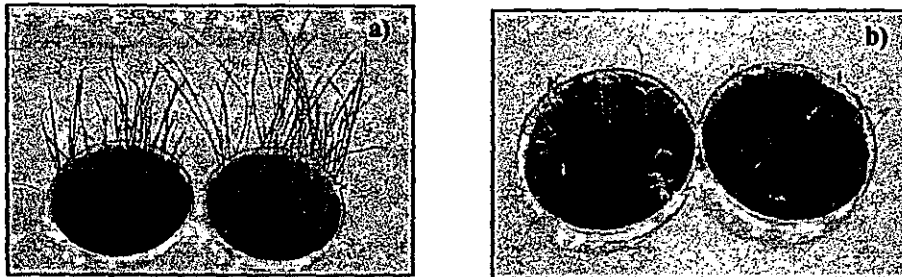
La biorremediación restablece completa o parcialmente la capacidad del suelo para promover la germinación de semillas y el crecimiento vegetal (Wang y Bartha, 1990). En un suelo que fue sometido a biorremediación, los hidrocarburos incluso tienen un efecto estimulante en el crecimiento vegetal (Adam y Duncan, 1999).

Fig. IV.33. Germinación de semillas de a) alpiste (*Phalaris canariensis*) y b) jitomate (*Lycopersicon esculentum*) en suelo contaminado sometido a:

TRATAMIENTO CON TEXTURIZANTES COMBINADOS



TRATAMIENTO CON TEXTURIZANTES COMBINADOS Y FERTILIZANTES



TRATAMIENTO CON TEXTURIZANTES COMBINADOS Y HARINA DE HUESO



4. COMPARACIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS

En la tabla IV.18 se presenta un resumen de los porcentajes promedio de degradación de diesel para cada uno de los tratamientos evaluados en las 2 etapas experimentales. De acuerdo al análisis estadístico (ver anexo) se puede observar que la utilización de composta y fibra de coco como único diluyente, la mezcla de composta y fibra de coco, así como la adición de harina de hueso a la mezcla de composta y fibra de coco, resultaron ser las mejores opciones para favorecer la degradación del diesel, ya que no existe diferencia significativa en el porcentaje de degradación obtenido en dichos tratamientos. No obstante, considerando los

porcentajes de degradación obtenidos en todos los casos, el empleo de composta como único diluyente se presenta como la mejor de todas las opciones planteadas.

Tabla IV.18. Comparación de los porcentajes de eliminación de diésel en los diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	ELIMINACIÓN DE DIESEL (%)
Testigo	21.25
Suelo/Composta	72.25
Suelo/Composta/Fertilizantes(100:15:0.1)	33.55
Suelo/Fibra de coco	60.69
Suelo/Fibra de coco/Fertilizantes(100:15:0.1)	31.75
Suelo/Composta/Fibra de coco	63.28
Suelo/Composta/Fibra de coco/Fertilizantes(100:10:0.1)	18.03
Suelo/Composta/Fibra de coco/Harina de hueso	68.48

En el tratamiento con fibra de coco como único diluyente, a pesar de que se obtuvo un alto porcentaje de degradación al final del tratamiento, no se considera un buen tratamiento, ya que se observó que la fibra de coco adsorbe el contaminante, lo que dificulta su degradación.

Por lo que respecta al desarrollo de semillas, en la tabla IV.19 se presenta un resumen de los porcentajes de germinación y emergencia de semillas de alpiste (*Phalaris canariensis*) y de jitomate (*Lycopersicum esculentum*). El alpiste resultó ser una especie poco sensible al diésel, los porcentajes tanto de germinación como de emergencia fueron similares en todos los casos. Según el análisis estadístico (ver anexo) no existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos en los porcentajes de germinación y emergencia, independientemente de la concentración del diésel residual, y se encuentran por arriba del 83 % de germinación y por arriba del 66 % de emergencia.

De manera contraria, las semillas de jitomate fueron muy sensibles a concentraciones de diésel superiores a 20,000 mg/kg, por ello, en el testigo y en los tratamientos en los que la concentración de diésel fue superior a este valor, que corresponden al tratamiento con fibra de coco y fertilizantes, y al tratamiento con texturizantes combinados y fertilizantes, presentaron porcentajes de germinación y emergencia muy bajos, menores al 26 %.

Tabla IV.19. Comparación de los porcentajes de germinación y emergencia de semillas en los diferentes tratamientos

TRATAMIENTO	ALPISTE		JITOMATE	
	Germinación (%)	Emergencia (%)	Germinación (%)	Emergencia (%)
Testigo	84	74	8	1
Suelo/Composta	90	80	66	55
Suelo/Composta/Fertilizantes(100:15:0.1)	88	72	85	63
Suelo/Fibra de coco	88	82	67	56
Suelo/Fibra de coco/Fertilizantes(100:15:0.1)	93	80	26	8
Suelo/Composta/Fibra de coco	78	67	64	25
Suelo/Composta/Fibra de coco/Fertilizantes(100:10:0.1)	85	85	13	0
Suelo/Composta/Fibra de coco/Harina de hueso	86	78	59	41

El tratamiento con composta y fertilizantes presentó los más altos porcentajes de germinación y emergencia, del 85% y 63 %, respectivamente, a pesar de la concentración del contaminante, de 20,480 mg/kg, debido al aporte de nutrimentos por parte de la composta y los fertilizantes adicionados. Los tratamientos con composta y fibra de coco como únicos diluyentes, con texturizantes combinados, y con texturizantes combinados y harina de hueso, presentaron porcentajes de germinación similares, pero mas bajos que el tratamiento con composta y fertilizantes, y estadísticamente no hay diferencia significativa entre ellos. Esto indica que a concentraciones de diesel residual menores a 20,000 mg/kg, el diesel ya no es tóxico para esta especie vegetal en particular.

Lo anterior sugiere que si se desea únicamente una reducción en la concentración de diesel, un tratamiento con composta sería suficiente, pero si se pretende promover la vocación natural del suelo tratado, será conveniente agregar fertilizantes al momento de sembrar las semillas.

V. CONCLUSIONES

- El suelo contaminado presentó una población autóctona bien adaptada, con gran potencial de degradación, lo que permitió un 21.25 % de degradación de diesel a los 80 días, en la prueba testigo. Este resultado es una medida de la capacidad de atenuación natural.
- La experimentación permitió comprobar que la dilución del suelo con texturizantes orgánicos mejoró las propiedades físicas del mismo, promoviendo un ambiente favorable para la actividad microbiana degradadora del diesel.
- El tratamiento con adición de composta dio los mejores resultados para estimular la degradación del diesel, ya que registró el más alto valor, del 72.25%, entre todos los tratamientos evaluados.
- El tratamiento con fibra de coco favoreció algunas propiedades físicas del suelo, como la porosidad y una alta humedad, sin embargo, el hecho de adsorber el diesel es una desventaja ya que dificulta la degradación del mismo.
- La adición de fertilizantes permitió simular condiciones reales de trabajos que en la práctica se realizan a gran escala, pero en este caso particular no favoreció la degradación del diesel en ninguna de las combinaciones experimentales.
- La adición de composta y fibra de coco en mezcla resultó ser un buen tratamiento para el suelo en estudio, ya que registró un porcentaje de degradación cercano al obtenido con el tratamiento con composta, de 63.28 %.
- La adición de harina de hueso como una fuente de nutrimentos fue una buena opción, ya que registró un porcentaje de degradación al final del tratamiento de 68.48 %. Sin embargo, esta cifra no fue muy superior al tratamiento sin adición, que fue de 63.28 %.

- La variación en las concentraciones de diesel en los diferentes tratamientos no afectó a las comunidades microbianas, manteniendo sus poblaciones relativamente altas a lo largo del tiempo de experimentación.
- Las semillas de alpiste (*Phalaris canariensis*) germinaron eficientemente a concentraciones de 55,000 mg/kg de diesel, lo que indica que son muy resistentes a altas concentraciones de hidrocarburos. En cambio, las semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum*) resultaron muy sensibles a concentraciones superiores a 20,000 mg/kg de diesel.
- La variabilidad promedio obtenida en los diferentes tratamientos en general fue menor al 10 %, esto indica una buena reproducibilidad en los resultados, los cuales pueden considerarse confiables.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

VI. RECOMENDACIONES

Para complementar este trabajo se recomienda continuar las investigaciones en el laboratorio, sobre los siguientes aspectos:

- Complementar la caracterización microbiológica del suelo con la medición de la capacidad de hongos y levaduras para degradar diesel, y con ello evaluar su posible implicación en los experimentos realizados.
- Evaluar la capacidad de intercambio iónico del suelo en condiciones naturales y en mezcla con texturizantes, para entender los fenómenos que se presentan durante el intercambio de nutrimentos en el suelo, así como en la adsorción del contaminante a la materia orgánica.
- Se recomienda el uso de semillas de jitomate (*Lycopersicon esculentum L.*) como indicador de la presencia de concentraciones superiores a 25,000 mg/kg de diesel, debido a que en este estudio se observó su sensibilidad a concentraciones superiores a ésta. Sin embargo, será necesario buscar otras semillas más sensibles al diesel, por ejemplo a concentraciones menores a 10,000 mg/kg.

Por otro lado, tomando como base que el interés de este trabajo es llevarlo a escala de campo se recomienda lo siguiente:

- Llevar a cabo el tratamiento del suelo, en biopilas, de manera que se permita tanto el mezclado del suelo con el texturizante de manera homogénea como también una buena aireación, para favorecer la biodegradación del diesel.
- Considerar que las fluctuaciones de temperatura en las diferentes épocas del año pueden afectar directamente la humedad del sistema, por lo que se tendrán que realizar los ajustes necesarios para el éxito de la biorremediación, de la misma forma que se controló esta variable durante el estudio a nivel laboratorio.

- Se propone que para devolver su vocación natural a un suelo tratado mediante biorremediación, se adicionen fertilizantes en una relación C:N-NH₄⁺:P-PO₄³⁻ de 100:15:0.1, esto promoverá el desarrollo vegetal. Los fertilizantes que se recomiendan son urea y superfosfato triple.

BIBLIOGRAFÍA

- Adam G. and Duncan H. J., 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health* 21: 353-357.
- Aelion M. C., Kirtland B. C., and Stone P. A., 1997. Radiocarbon Assessment of Aerobic Petroleum Bioremediation in the Vadose Zone and Groundwater at an AS/SVE Site. *Environ. Sci. Technol.* 31 (12): 363-337.
- Aguilera N. H., 1989. Tratado de Edafología de México. Tomo I, Laboratorio de Investigación de Edafología. Depto. de Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, México, pp 96.
- Alef K., and Nannipieri P., 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. USA. pp.576.
- Alexander M., 1980. Introducción a la microbiología del suelo. 2ª. Edición. Libros y Editoriales. S.A., México, D.F.
- Alexander M., 1994. Biodegradation and bioremediation. Academic Press..U.S.A.
- Allison L. E., Berenstein L., Bower C. A., Brown J. W., Fireman M., Hatcher J. T., Hayward H. E., Pearson G. A., Reeve R. C., Richards L. A., y Wilcox L. V., 1985. Diagnóstico y Rehabilitación de Suelos Salinos Sódicos. Editorial Limusa, México. Editado por Richards L.A. 6ª. Edición.
- Atlas R. M., 1981a. Fate of oil from two major oil spills: role of microbial degradation in removing oil from the Amoco Cadiz and Ixtoc spills. *Environment International*. 5: 33-38.
- Atlas R. M., 1981b. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45: 180-209.
- Atlas R. M., and Bartha R., 1998. Microbial Ecology. 4a ed. The Benjamin/Cummings Publication. California, USA.
- Bailey S. E. and Ollis D. F., 1986. Biochemical engineering fundamentals. 2n. Ed. Mc.Graw Hill. New York, USA.
- Balba M. T., Al-Awadhi N, and Al-Daher R., 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *J. Microbiol. Methods* 32 (2): 155-164.
- Bartha R., and Pramer D., 1965. Feature of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil* 100(1): 68-70.

- Biddlestone A. and Gray K., 1994. Composting. In *Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*. Murray Moo-Young (ed.).
- Black C. A., 1965. *Methods of soil analysis. Part 2. Physical and mineralogical properties*. American Society of Agronomy, Inc. Publishers, USA.
- Block R., Allworth N. and Bishop M., 1991. Assessment of diesel contamination in soil. In *Hydrocarbon Contaminated Soils. Volumen I. Remediation Techniques Environmental Fate. Risk Assessment Analytical Methodologies. Regulatory Considerations*. E.J. Calabrese and P.T. Kostecki (eds.). Lewis Publishers, Michigan, USA. p. 135-147.
- Block R. N., Clark T. P., and Bishop M., 1989. Biological treatment of soils contaminated by petroleum products. In *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater. Vol 2*. P.T. Kostecki, and E.J. Calabrese, (eds.). Lewis Publishers.. Michigan, USA.
- Bonaventura C. and Johnson F. M., 1997. Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. *Environmental Health Perspectives*. 105(1): 5-20.
- Bossert I., and Bartha R., 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. In *Petroleum microbiology*. R. M. Atlas, (ed.). Macmillan Publishing Company, New York, USA.
- Britton L. N., 1984. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In *Microbial Degradation of Organic Compounds*. D.T. Gibson (ed). Microbiology Series 13: 89-129.
- Brown K. W., Donnell K. C., and Devel L. E. Jr., 1983. Effects of Mineral Nutrients, Sludge Application Rate, and Application Frequency on Biodegradation of Two Oily Sludges. *Microbiol. Ecol.* 9: 363-373.
- Burés S., 1997. Sustratos. Ediciones Agrotécnicas, S. L., España. pp. 341.
- Cabrera M. L., Kissel D. E. and Bock B. R., 1991. Urea hydrolysis in soil: effects of urea concentration and soil pH. *Soil Biol. Biochem.* 23(12): 1121-1124.
- Carter M., 1993. *Soil Sampling and methods of analysis*. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Cole G. M., 1994. *Assessment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites*. Lewis Publishers London.
- Cole M. A., 1998. Remediation of soils contaminated with toxic organic compounds. In, *Beneficial Co-utilization of Agricultural, Municipal and Industrial By-products*. S Brown, S.S. Angel and L. Jacobs (eds). Kluwer Academic Publishers Printed, The Netherlands. pp. 175-194.
- Cookson J., 1995. *Bioremediation Engineering Design and Application*. McGraw-Hill, EE.UU.
- DeJong E., 1980. The effect of a crude oil spill on cereals. *Environ. Pollut (Ser. A)*, 22: 187-196.

- Deni J., and Pennincky M. J., 1999. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (9): 4008 - 4013.
- Dibble J. T., and Bartha R., 1979. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 (4) : 729-739.
- Dineen D., 1992. Remediation options for diesel-contaminated soil. En: Contaminated soils. Diesel Contamination. E. J. Calabrese and P. T. Kostecki (eds). Association of American Railroads. Lewis Publishers, Michigan, USA, p. 181-191.
- Fattah Q. H., and Wort D. J., 1970. Effect of light and temperature on stimulation of vegetative and reproductive growth of bean plants by naphthenates. *Agron. J.* 62: 576-577.
- Foth H.D., 1981. Fundamentos de la ciencia del suelo. Cía. Editorial Continental, S.A., de C.V., México.
- Frankenberger Jr. W. T., 1992. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In Hydrocarbon Contaminated soils and groundwater. Vol. 2. E. J. Calabrese and P. T. Kostecki (eds.). Lewis Publishers. Boca Raton, USA.
- Frankenberger Jr. W. T., 1988. Use of urea as a nitrogen fertilizer in bioreclamation of petroleum hydrocarbons in soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40:66-68 USA.
- Freeze R. A., and Cherry J. A., 1979. Groundwater. Prentice- Hall. New Jersey. EE.UU.
- Freijer J.I., de Jonge H., Bouten W., and Verstraten., 1996. Assessing mineralization rates of petroleum hydrocarbons in soils in relation to environmental factors and experimental scale. *Biodegradation.* 7: 487 - 500.
- Geerdink M. J., Van Loosdrecht M. C. M. and Luyben K. Ch. A. M., 1996. Biodegradability of diesel oil. *Biodegradation* 7: 73-81.
- Gibson D.T and Subramanian V., 1984. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In Microbial Degradation of Organic Compounds. D.T. Gibson (ed). Microbiology Series 13:181-252.
- Gordon A. H. III, DeLaune R. D., Patrick: Jr. W. H., 1980. Effect of Estuarine Sediment pH and Oxidation-Reduction Potential on Microbial Hydrocarbon Degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (2): 365-369.
- Graham D. W., Smith V. H., Clealand D. D. and Law, K.P., 1999. Effects of nitrogen and phosphorus supply on hexadecane biodegradation in soil systems. *Water Air Soil Pollut.* 111: 1 - 18.
- Gray T. R. and Williams T. S., 1971. Soil microorganisms. Longman Inc. New York. USA.
- Gruiz K., and Kriston É., 1995. In Situ Bioremediation of Hydrocarbon in Soil. *J. Soil Contam.* 4 (2): 163-172.
- Grundmann R., and Rehm J. H., 1991. Biodegradation of Diesel-Fuel. *Sci. Technol.* 44 (14): 149-150.
- Guzmán L. A., 2001. Pruebas de biotratabilidad de suelos y agua subterránea contaminados con mezclas de diesel y gasolina. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.

- Huesemann M. H., 1994. Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils. *J. Soil Contam.* 3(3): 299-318.
- Huntjens J. L. M., de Potter H. and Barendrecht J., 1986. The degradation of oil in soil. In Contaminated soil. J.W. Assink and W.J. van der Brink. (Eds.) Dordrecht, Martinus Nijhoff Publishers, Holanda.
- Jackson J. D., 1990. Bioremediation of diesel contaminated soils. Proceedings of 3rd Annual Symposium of the Arizona Hydrological Society, Casa Grande, Arizona. pp.309-316.
- Jackson M. L., 1982. Análisis químicos de suelos. Ediciones Omega, 4a edición, Barcelona, España.
- Jorgensen K.S., Puustinen J. and Suortti A.M., 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles. *Environ. Pollut.* 107: 246-254.
- Joergensen R. G., Shmaedeke F., Windhoast K. and Meyer, B., 1995. Biomass and activity of microorganism in a fuel oil contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* 27(9):1137-1143.
- Juma N. G., 1998. The pedosphere and its dynamics: soil texture, structure and color. 3.3.3 Bulk density of mineral soils. En http://www.soils.r.ualberta.ca/Pedosphere/content/section03/page03_03.cfm.
- Kästner M. and Mahro B., 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44:668-675.
- Kästner M., Lotter S., Heerenklage J., Brever-Jammali M., Stegmann R., and Mahro B., 1995. Fate of ¹⁴C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured oil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43:1128-1135.
- Katznelson H., 1946. The rhizosphere effect of mangles on certain groups of soil microorganisms. *Soil Sci.* 62:343-354.
- Klute A., 1986. Laboratory Methods. In Methods of Soil Analysis Part I. Physical and Mineralogical Methods. A. Klute (eds.) American Society of Agronomy. Inc, USA.
- Korda A., Santas P, Tenente A. and Santas A., 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48: 677 - 686.
- Leahy J. G. and Colwell R. R., 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbial Reviews.* 54 (3): 305 – 315.
- Li X., Feng Y. and Sawatsky N., 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils I. Plant Growth. *Plant and Soil.* 192: 219-226.
- Lim D., 1998. Microbiology. 2n. Edition. WCB. McGraw-Hill, USA. pp. 720.
- Margesin R. and Schinner F., 1997. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 462 - 468.

- Mendelsohn I. A., Hester M. W., Sasser C. and Fischel M., 1990. The effect of a Louisiana crude oil discharge from a pipeline break on the vegetation of a southeast Louisiana brackish marsh. *Oil and Chem. Pollut.*, 7: 1-15.
- McAllister P.M., Chiang C. Y., Salatino J. P., Dortch I. J. and Williams P., 1995. Enhanced Aerobic Bioremediation of Residual Hydrocarbon Sources. In *Intrinsic Bioremediation (Bioremediation, 3(1))*. R. E. Hinchee, J. T. Wilson and D. Douney (eds.). Portland, Or. Battelle, USA.
- McGill W. G., Rowel M. J. and Westlake D. W., 1981. In *Soil Biochemistry, Vol. V*. E.A. Paul and J.N. Ladd (eds), Marcel Dekker, New York, pp. 229-296
- Milcic-Terzic J, López-Vidal Y, Vrvic M.M. and Saval S., 2000. Biodegradation potential assessment of microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil. *Wat. Sci. Technol.* 42 (5-6): 403-406.
- Morgan P. and Watkinson R. J., 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. *Crit. Rev. Biotech.*, 8 (4): 305-333.
- Nely R., 1990. Fate and transport of organic chemicals in the environment. Government Institutes, Maryland. pp. 302.
- Odu C. T. I., 1972. Microbiology of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. I. Extent of contamination and some soil and microbial properties after contamination. *J. Petrol. Inst.* 58 (562): 201 - 208.
- Paul E. A. and Clark F. E., 1996. Soil microbiology and biochemistry. 2n. Edition. Academic Press. San Diego. USA., pp. 339.
- Pelczar M. J., Reid R. and Chan E. C., 1982. Microbiología. 2ª edición. McGraw-Hill. México.
- Porta C. J., López-Acevedo R. M. y Roquero de Laburu C. 1994. Edafología para agricultura y el medio ambiente. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Rainwater K., Mayfield M. P., Heintz C. and Claborn B. J., 1993. Enhanced in situ biodegradation of diesel fuel by cyclic vertical water table movement: preliminary studies. *Water Environ. Res.* 65(6): 717-725.
- Rangel J. I, Leal H., Palacios S., Sanchez S. and Sanchez R., 2001. Coconut fiber as casing material for mushroom productions (*Agaricus sp.*). En prensa.
- Raymond C. L., 1992. Bioremediation of PAH Compounds in Contaminated Soil. In *Hydrocarbon Contaminated soils and groundwater, Vol. 2*. E. J. Calabrese and P. T. Kostecki (eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Raymond R. L., Hudson J. O. and Jamison V. W., 1976. Oil degradation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 522-535.
- Rhykerd R.L, Creus B., McInnes K.J. and Weaver R. W., 1999. Impact of bulking agents forced aeration and tillage on remediation of oil-contaminated soil. *Bioresource Technology* 67: 279-285.

- Romantschuk M, Srand I., Petänen T., Peltola R., Jonsson-Vihanne M., Koivula T., Yrjälä K. and Haahtela K., 2000. Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches. *Environmental Pollution* 107: 179-185.
- Rogers J. A., Tedaldi J. D. and Kavanaugh M. C., 1993. A screening protocol for bioremediation of contaminated soil. *Environ. Prog.* 12 (2): 146-156.
- Safferman S. I., 1998. Fundamentals of bioremediation/Tratability studies. In: Bioremediation: Principles and Practice Vol. I. Fundamentals and Applications. S. Sikdar and R. I. Irvine (eds). Technomic Publishing Co. Inc. pp. 765.
- Salanitro J. P., Dorn, P. B., Huesemann M. H., Moore K. O., Rhodes I. A., Rive L. M., Vipond T. E. Western M.M. and Wisniewski H. L., 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1764-1776.
- Saval S., 1995. Remediación y Restauración. En PEMEX:-Ambiente y Energía. Instituto de Investigaciones Jurídicas - Universidad Nacional Autónoma de México / Petróleos Mexicanos.
- Saval S., 1997. Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. *Ingeniería y Ciencias Ambientales* No.33 (julio-septiembre).
- Saval S., 2000. Biorremediación: Clean up biotechnologies for soils and aquifers. In Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses. E. J. Olguin, G. Sanchez and E. Hernandez (eds.) Taylor and Francis Limited, pp. 155-166.
- Sims J. L., Sims R. C. and Matthews J. E., 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. *Hazardous Waste and Hazardous Materials.* 7 (2): 117-149.
- Smith V. H., Graham D. W. and Clealand D. D., 1998. Application of Resource-Ratio theory to hydrocarbon biodegradation. *Environ. Sci. Technol.* 32 (21): 3386 - 3395.
- Song H. G. and Bartha R., 1990. Bioremediation Potential of Terrestrial Fuel Spills. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (3): 646-651.
- Song H-G, Wang X. and Bartha R., 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (3): 652-656.
- Stevenson F. J., 1966. Lipids in soils. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 43: 203-210.
- Stevenson F. S., 1980. Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulphur, and micronutriments. Mc.Graw Hill, John Wiley and Sons, New York, USA.
- Stevenson F. S., 1986. Cycles of soil. Mc.Graw Hill, John Wiley and Sons, New York, USA.
- Tavera S. G., 1985. Criterios para la interpretación y aprovechamiento de los reportes de laboratorio para las áreas de asistencia técnica. Serie: Temas didácticos. Publicación No. 3. Sociedad de la Ciencia del Suelo. México.
- USEPA, 1991a. Understanding bioremediation: A guidebook for citizens.

- USEPA. 1991b. Guide for conducting tratability studies under CERCLA: Anaerobic biodegradation remedy screening. Office of Research and Development, Washington, D.C.
- USEPA. 1996a. Environmental Protection Agency. Seminar series on bioremediation of hazardous waste sites: practical approaches to implementation. EPA/625/k-96/001.
- USEPA. 1996b. SW- 846 Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods. Tercera Revisión. Washington.
- USEPA. 1997. United States Environmental Protection Agency: Federal Remediation Technologies Roundtable DataBase. En <http://www.frtr.gov/>
- USEPA. 1998. An analysis of composting as an environmental remediation technology, Solid Waste and Emergency Response.
- Vázquez A. A. y Bautista A. N., 1993. Guía para la interpretación de análisis químico de suelo y agua, Dépto. Suelos. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Wang X. and Bartha R., 1990. Effects of bioremediation on residues, activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. *Soil Biol. Biochem.*, 22: 501-505.
- Walker J. D., Colwell R. R. and Petrakis L., 1976. Biodegradation rates of components of petroleum. *Can J. Microbiol.* 22:1209-1213.
- Walworth J. L., Woolard C. R., Braddock J. F. and Reynolds C. M., 1997a. The Role of soil nitrogen concentration in biorremediation. En *In situ and On-Site Bioremediation: Memorias del Fourth International in situ and on-site bioremediation Symposium*. New Orleans.
- Walworth J. L., Woolard C. R., Braddock J. F. and Reynolds C. M., 1997b. Enhancement and inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of fertilizer nitrogen: an approach to determining optimum levels. *J. Soil Contam.* 6 (5): 465-480.
- Walworth J. L. and Reynolds C. M., 1995. Bioremediation of a petroleum-contaminated crycic soil: effects of phosphorus, nitrogen, and temperature. *J Soil. Contam.* 4(3): 299-310.
- Zegarra M. G. y Saval B., 1998. Optimización de la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, AIDIS, Lima, Perú.
- Zegarra M. G., 2000. Optimización de la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ingeniería Ambiental. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería, UNAM.

ANEXO

A. DEGRADACIÓN DE DIESEL

ANÁLISIS DE VARIANZA

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-cal	nivel de significancia
Entre tratamientos	11962.895	7	1708.9849	13.90	0.0000
dentro tratamientos	2335.051	19	122.8974		
Total (corregido)	14297.946	26			

Nivel de confianza: 95 %

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE

TRATAMIENTO	REPLICAS	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGÉNEOS
F+C+N	4	18.028787	X
TESTIGO	3	21.250899	X
S+F+N	3	31.748164	XX
S+C+N	3	33.546745	XX
S+F	3	60.669785	XX
F + C	4	63.278061	X
F-C+H	4	63.432606	X
S+C	3	72.247842	X

B. GERMINACIÓN Y EMERGENCIA DE SEMILLAS DE ALPISTE

ANÁLISIS DE VARIANZA. % DE GERMINACIÓN

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-cal	nivel de significancia
Entre tratamientos	398.41421	7	56.916315	1.286	0.3089
Dentro de tratamientos	840.62597	19	44.243472		
Total (corregido)	1239.0402	26			

Nivel de confianza: 95 %

ANALISIS DE VARIANZA. % DE EMERGENCIA

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-cal	nivel de significancia
Entre tratamientos	944.21030	7	134.88719	3.184	.0210
Dentro de tratamientos	804.90276	19	42.36330		
Total (corregido)	1749.1131	26			

C. GERMINACIÓN Y EMERGENCIA DE SEMILAS DE JITOMATE

ANALISIS DE VARIANZA. % DE GERMINACIÓN

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-cal	nivel de significancia
Entre tratamientos	19251.702	7	2750.2432	81.124	.0000
dentro tratamientos	644.129	19	33.9015		
Total (corregido)	19895.831	26			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE. % DE GERMINACIÓN

TRATAMIENTO	REPLICAS	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGÉNEOS
TESTIGO	3	7.536667	X
F+C+N	4	12.967500	XX
S+F+N	3	26.063830	X
F+C+H	4	60.837500	X
F + C	4	64.827500	X
S+C	3	66.134752	X
S+F	3	67.021277	X
S+C+N	3	85.106383	X

ANALISIS DE VARIANZA. % DE EMERGENCIA

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F-cal	nivel de significancia
Entre tratamientos	15343.130	7	2191.8757	58.660	.0000
dentro tratamientos	709.951	19	37.3658		
Total (corregido)	16053.081	26			

PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE. % DE EMERGENCIA

TRATAMIENTO	RÉPLICAS	PROMEDIO	GRUPOS HOMOGÉNEOS
F+C+N	4	.000000	X
TESTIGO	3	.386667	X
S+F+N	3	7.973723	X
F + C	4	25.932500	X
F+C+H	4	41.885000	X
S+C	3	54.76234	XX
S+F	3	56.382979	XX
S+C+N	3	62.583652	X