

01177



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN INGENIERÍA (INGENIERÍA AMBIENTAL)**

**APLICACIÓN DE LODOS DE UNA PLANTA DE
TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN LA
REHABILITACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN INGENIERÍA (AMBIENTAL)

P R E S E N T A:

ING. GUADALUPE BAUTISTA SALAZAR

DIRECTORA: DRA. ROSARIO ITURBE ARGÜELLES

UNAM
POSGRADO 

MÉXICO, D.F. 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

VOTOS APROBATORIOS

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

DR. WILFRIDO RIVERA GÓMEZ FRANCO

Coordinador del Programa de Posgrado
en Ingeniería, U N A M
Presente

Por este medio comunico a usted que he leído la tesis titulada: **"APLICACIÓN DE LODOS DE UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES EN LA REHABILITACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS"** para obtener el grado de MAESTRA EN INGENIERÍA en el campo del conocimiento **INGENIERÍA AMBIENTAL**, que presenta la alumna **GUADALUPE BAUTISTA SALAZAR**.

Al mismo tiempo me permito informarle mi decisión de otorgar o no el voto aprobatorio.

JURADO		VOTO APROBATORIO	FIRMA	FECHA
PRESIDENTE	DRA. GEORGINA FERNANDEZ VILLAGOMEZ	<input checked="" type="checkbox"/> (NO)	<i>Georgina Villagomez</i>	18/06/04
VOCAL	DRA. ROSARIO ITURBE ARGÜELLES	<input checked="" type="checkbox"/> (NO)	<i>Rosario Iturbe</i>	17/06/04
SECRETARIO	M. EN I. ANA ELISA SILVA MARTINEZ	<input checked="" type="checkbox"/> (NO)	<i>Ana Elisa Silva</i>	18/06/04
SUPLENTE	M. EN C. ROLANDO S. GARCIA GOMEZ	<input checked="" type="checkbox"/> (NO)	<i>Rolando S. Garcia</i>	31/08/04
SUPLENTE	M. EN I. ESPERANZA RAMIREZ CAMPEROS	<input checked="" type="checkbox"/> (NO)	<i>Esperanza Ramirez</i>	27/07/04

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosario Iturbe y al Ing. Carlos Flores por la asesoría y apoyo que me han brindado durante mi desarrollo profesional y por la invaluable calidez humana que he recibido de ellos.

Al Ingeniero Miguel Amador G. superintendente de operación de la planta de tratamiento de Aguas residuales industriales por Earth Tech México. S.A. de C.V. en Madero, Tamaulipas por el apoyo brindado para que se llevara a cabo parte de la experimentación de este trabajo.

A la maestra Esperanza Martínez, la Dra. Georgina Fernández, al maestro Rolando Gómez y en especial a la maestra Ana Elisa Silva, por sus valiosas observaciones y sugerencias en mi trabajo.

En especial a la Ing. Guillermina Pérez y al la Química Adriana Ramírez González por su participación en los análisis determinados en la parte experimental.

A las maestras Isaura Yeñez y Neftalí Rojas por su tiempo y valiosas enseñanzas en el laboratorio.

A Adriana, Guille, Rosy, Ale, Luis, Claudia y Santiago, miembros del Grupo de saneamiento de suelos y acuíferos, por el trabajo y amistad compartida en el Instituto de Ingeniería.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN.....	vii
1.0 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Justificación.....	2
2.0 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Hipótesis.....	4
2.3 Alcances.....	5
2.4 Limitaciones.....	5
3.0 MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 Hidrocarburos totales del petróleo.....	7
3.2 Biorremediación.....	7
3.3 Lodos activados.....	11
3.4 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	13
3.5 Experiencias de tecnologías biológicas aplicadas.....	17
3.6 Legislación Ambiental en México.....	18
3.7 Tecnologías de remediación utilizadas en México.....	20
3.8 Caracterización del suelo.....	21
3.9 Caracterización de lodos.....	27
3.10 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	30
4.0 METODOLOGÍA.....	34
4.1 Ubicación del punto de muestreo.....	34
4.2 Caracterización fisicoquímica del suelo.....	34
4.3 Aclimatación de lodos y parámetros determinados.....	35
4.4 Instalación de charolas experimentales.....	38
4.5 Aplicación de nutrientes.....	41
4.6 Aplicación de tensoactivo.....	41
4.7 Bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	41
6.2 Cuenta heterótrofa de bacterias.....	41
4.7.2 Selección y aislamiento de bacterias	42

	Página
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
5.1 Propiedades fisicoquímicas del suelo.....	45
5.2 Determinación de la concentración de hidrocarburos....	45
5.3 Aclimatación de lodos.....	45
5.4 Primera etapa de experimentación.....	47
5.5 Segunda etapa de experimentación.....	48
5.6 Balance de materia	54
5.7 Cuenta en placa de bacterias.....	55
5.8 Identificación de las bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	58
6.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63
6.1 Conclusiones.....	63
6.2 Recomendaciones.....	65
7.0 BIBLIOGRAFÍA.....	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
3.1	Bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	15
3.2	Interpretación de los contenidos de fósforo por Bray	23
4.1	Parámetros analizados en la caracterización del suelo.....	35
4.2	Parámetros determinados en la aclimatación de lodos.....	38
4.3	Esquema de la primera etapa de experimentación.....	39
4.4	Esquema de la segunda etapa de experimentación.....	40
5.1	Propiedades del suelo.....	45
5.2	Parámetros determinado en la aclimatación de lodos.....	46
5.3	Contenido de fósforo, nitrógeno y UFC's en lodos.....	46
5.4	Concentración de hidrocarburos en la primera etapa de experimentación.....	47
5.5	Concentración de hidrocarburos de la segunda etapa de experimentación.....	49
5.6	Porcentaje de degradación en las charolas de la segunda etapa.....	50
5.7	Balance de materia.....	54
5.8	Cuenta en placa inicial de bacterias en charolas (muestreo 1)).....	55
5.9	Cuenta en placa de bacteria en charolas (muestreo 2).....	55

Tabla	Página
5.10 Cuenta en placa de bacterias en charolas (muestreo 3).....	56
5.11 Cuenta en placa final de bacterias en charolas (muestreo 4).....	56
5.12 Aislamiento de colonias involucradas en el tratamiento del suelo contaminado.....	59
5.13 Identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos.....	60
5.14 Bacterias hidrocarbonoclastas.....	61

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
3.1	Mineralización del petróleo por actividad microbiana.....	14
3.2	Curva de crecimiento microbiano.....	16
3.3	Tecnologías de remediación de suelos utilizadas en México por empresas autorizadas.....	21
3.4	Esquema de realización de un frotis bacteriano.....	31
4.1	Extracción soxhlet de hidrocarburos.....	35
4.2	Esquema del sistema de lodos activados.....	37
4.3	Reactores de lodos activados.....	37
4.4	Instalación de charolas de la primera etapa de experimentación.....	39
4.5	Instalación de charolas experimentales de la segunda etapa en el laboratorio de el Instituto de Ingeniería.....	40
4.6	Sistema BBL Cristal para identificación de bacterias Gram positivas.....	43
4.7	Sistema API para identificación de bacteria Gram negativas.....	43
5.1	Degradación de hidrocarburos en la primera etapa del tratamiento.....	48
5.2	Degradación de hidrocarburos después del tratamiento de la segunda etapa.....	50
5.3	Porcentaje de degradación de hidrocarburos en las charolas de la segunda etapa.....	51

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
5.4	Efecto de los tratamientos con la aplicación de lodos.....	52
5.5	Efecto de la aplicación de lodos y tratamientos del suelo.....	53
5.6	Crecimiento de la población microbiana con el tratamiento de aplicación de lodos.....	56
5.7	Crecimiento de la población microbiana con el tratamiento de aplicación de lodos y nutrientes.....	56
5.8	Crecimiento de la población microbiana con el tratamiento de aplicación de lodos y tensoactivo.....	57
5.9	Crecimiento de la población microbiana con la aplicación de Dosis 1 (sin aplicación de lodos).....	57
5.10	Crecimiento de la población microbiana con aplicación de Dosis 2 de lodos (1L / 3 días).....	57
5.11	Crecimiento de la población microbiana con aplicación de Dosis 3 de lodos (1L / 6 días).....	57
5.12	Cepas puras del tratamiento de suelo contaminado.....	60

RESUMEN

El petróleo constituye una de las principales fuentes de contaminación del suelo ya que la mayor parte de sus componentes son difíciles de biodegradar; sin embargo, algunos microorganismos pueden utilizar hidrocarburos para su crecimiento como única fuente de carbono, estos pueden digerir sustancias orgánicas peligrosas como combustibles o solventes, y descomponer los contaminantes orgánicos en productos inocuos, principalmente dióxido de carbono y agua.

Los microorganismos degradadores de hidrocarburos pueden ser autóctonos o externos al sitio (provenientes de lodos de aguas residuales industriales) y los requerimientos básicos para que estos puedan desempeñar su función, es crear y mantener un ambiente favorable para su crecimiento como es la fuente de carbono, oxígeno y nutrientes (fósforo y nitrógeno) en un ambiente compatible con un pH, temperatura y humedad adecuada.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de remoción de hidrocarburos a nivel laboratorio de un suelo contaminado, mediante la aplicación de lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales de una refinería y aclimatados en un reactor biológico.

Este estudio consistió en la aclimatación en laboratorio de los lodos mediante la adición de sustrato, nutrientes e hidrocarburo, posteriormente los lodos se alimentaron a un reactor y para el control de este, se determinaron periódicamente los parámetros: sólidos totales, sólidos volátiles, oxígeno disuelto (OD), índice volumétrico de lodos (IVL), temperatura, pH y actividad microbiológica.

Una vez aclimatados los lodos en el reactor se inició otra etapa experimental que fue la aplicación de la biomasa producida por el reactor en 9 cajones experimentales con suelo contaminado con hidrocarburos bajo distintos tratamientos con aplicación de lodos.

Se aplicaron 3 tratamientos:

- 1) aplicación de lodos,
- 2) aplicación de lodos y nutrientes,
- 3) aplicación de lodos y un tensoactivo.

Los resultados indican que existe una remoción de los hidrocarburos principalmente en la fracción diesel a las 4 semanas de la aplicación de lodos y tensoactivo obteniendo una eficiencia de remoción de hidrocarburos del 67 al 73 %.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

La industria del petróleo es una de las más importantes en el país. Del petróleo la mayor parte es utilizada como combustible en forma de gasolina, diesel, turbosina, y junto con algunas fracciones volátiles (metano, propano y butano) son la principal fuente de energía, tanto industrial como doméstica. México es un país exportador de petróleo, ya que existen importantes yacimientos en explotación en las zonas del Golfo de México, en el istmo de Tehuantepec y otros más en reserva. Como consecuencia del uso masivo del petróleo como fuente de energía y como materia prima, la contaminación del suelo, agua y aire ha sido evidente debido a la falta de regulación y de control en los últimos 50 años. Esta condición reta a la sociedad de manera global a encontrar medidas efectivas que remedien los efectos negativos del avance tecnológico (Valderrama, 2001).

En México existen diferentes fuentes generadoras de contaminación de suelos y acuíferos, dependiendo de las actividades que se desarrollan en cada zona; sin embargo, la contaminación por hidrocarburos es la distribuida más ampliamente en el país. Al iniciarse el auge de las actividades industriales petroleras, en el manejo y desecho de los hidrocarburos, no se tomó en cuenta la repercusión que causarían estos al infiltrarse en el subsuelo; por ello, en la actualidad es común encontrar pasivos ambientales debido a actividades inadecuadas que han permitido su infiltración en el subsuelo, así como a fugas de hidrocarburos por accidentes o manejo inapropiado en las actividades de extracción, refinación, petroquímica, transporte, distribución, almacenamiento y comercialización (Madrigal, 1998).

Las tecnologías más empleadas para la rehabilitación de suelos y acuíferos contaminados se pueden llevar a cabo tanto en el mismo sitio del problema como fuera de él. Así mismo, las tecnologías se clasifican, de acuerdo con el tipo de proceso aplicado, en físicas, químicas, biológicas y térmicas (Iturbe, 1998).

La mayor parte de los seres vivos terrestres (plantas, animales y protistas) y de los residuos asociados con ellos inevitablemente se incorporan al suelo, por actividad microbiana. Los suelos constituyen una capa muy delgada del material sobre la superficie terrestre. La profundidad del suelo y sus propiedades fisicoquímicas varían de acuerdo con el lugar, pero en general el suelo tiene cinco componentes principales: Partículas minerales inorgánicas, residuos orgánicos, agua, gases, sistemas biológicos. Las bacterias y los hongos constituyen el grupo más grande de microorganismos en los suelos. Las bacterias autótrofas y heterótrofas degradan las complejas sustancias orgánicas e inorgánicas, algunas en condiciones aerobias, y otras en condiciones anaerobias. Los hongos descomponen la celulosa y otros componentes de los tejidos vegetales y, como es de esperar, se les encuentra cerca de la superficie, en donde prevalecen condiciones aerobias (Glyn, 1999). El grado y el tipo de crecimiento microbiano en el suelo dependen de algunos factores importantes destacando los siguientes:

- Presencia de nutrimentos suficientes
- Disponibilidad de humedad
- Aceptor de electrones
- Temperatura y pH idóneos.

1.2 Justificación

Algunos microorganismos pueden utilizar hidrocarburos para su crecimiento como única fuente de carbono, pueden digerir sustancias orgánicas como combustibles o disolventes, y descomponer los contaminantes orgánicos en productos inocuos, principalmente dióxido de carbono y agua (Ercoli, 1998).

La presencia de microorganismos en el suelo y agua pueden afectar la distribución, el movimiento y la concentración de contaminantes a través de un proceso llamado biodegradación. El propósito de éste es remover la materia orgánica disuelta y biodegradable dentro de la gama de tiempos de residencia hidráulica en que económicamente operan los sistemas de tratamiento de aguas. Los microorganismos degradadores de hidrocarburos pueden ser autóctonos o externos al sitio y los requerimientos básicos para que estos puedan desempeñar su función es

1. INTRODUCCIÓN

crear y mantener un ambiente favorable para su crecimiento como es la fuente de carbono, de oxígeno y de nutrientes (fósforo y nitrógeno) en un ambiente compatible con un pH, temperatura y humedad adecuados.

Cada especie de microorganismos tiene una capacidad específica para degradar a los hidrocarburos atando solamente a algunos compuestos en específico y en un grado determinado. Cuando se tiene una mezcla compleja como lo es un suelo contaminado con hidrocarburos de refinería, se recurre al uso combinado de un grupo de especies degradadoras. A estos conjuntos de microorganismos se denominan consorcios microbianos. Es por ello que en esta investigación se ha elegido aplicar un proceso biológico, al problema de suelos contaminados con hidrocarburos provenientes de una refinería, rehabilitándolo mediante la aplicación de lodos de una planta de tratamiento de agua residual industrial, ya que estos constituyen una fuente importante de microorganismos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Disminuir la concentración de hidrocarburos en un suelo contaminado mediante el proceso de biodegradación favorecido por el enriquecimiento con microorganismos provenientes de lodos biológicos de una planta de tratamiento de agua residual industrial.

2.2 Hipótesis

1. La aplicación de los lodos provee una gran cantidad y diversidad de microorganismos que hará más eficiente la biodegradación de hidrocarburos
2. La aplicación de nutrimentos favorecerá el crecimiento de microorganismos y aumentará la eficiencia de biodegradación de hidrocarburos.
3. La aplicación de tensoactivo aumentará la disponibilidad de los hidrocarburos para ser degradados por los microorganismos.

2.2 Alcances

1. Aclimatar lodos activados de una planta de tratamiento de agua residual industrial proveniente de un reactor experimental.
2. Aplicar lodos aclimatados del reactor sobre cajones experimentales con suelo del sitio contaminado, aplicando además un tensoactivo nonilfenol etoxilado y nutrimentos como fósforo y nitrógeno.
3. Probar la eficiencia de degradación de hidrocarburos en el suelo contaminado con hidrocarburos.
4. Comparar la eficiencia de degradación de hidrocarburos con los microorganismos encontrados en el mismo suelo y con los encontrados en la aplicación de lodos, tensoactivo y nutrimentos.
5. Identificar a las bacterias heterótrofas degradadoras de hidrocarburos, mediante las técnicas alternativas de identificación (Analitical Profile Index) API y (Banque Bruxelles Lambert) BBL Cristal para bacterias Gram negativas y Gram positivas respectivamente.

2.3 Limitaciones

1. La eficiencia de degradación se determinará solo en la fracción diesel de los hidrocarburos totales del petróleo.
2. Para la identificación de bacterias sólo se emplearán técnicas alternativas API para bacterias Gram negativas y BBL Crystal para bacterias Gram positivas.
3. La experimentación se lleva a cabo en suelo no estéril.
4. El desarrollo experimental se llevará a cabo en 7 meses.

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Hidrocarburos totales del petróleo

Los productos principales de una refinería son gas LP, gasolina, turbosina, kerosina, gasóleo (ligero y pesado), lubricantes, combustóleo y asfaltos. Las cadenas de las moléculas de carbono van de C_3 a mayores de C_{35} . El término hidrocarburos totales del petróleo (HTP) se emplea para describir a una gran familia de varios cientos de compuestos químicos provenientes del petróleo. Debido a que hay muchos productos químicos diferentes en el petróleo crudo y en otros productos del petróleo, no es práctico medir cada uno de manera separada. Uno de los métodos para determinar la presencia de las mezclas complejas que puedan formar, es el análisis de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) para describir a una gran familia de varios cientos de compuestos químicos derivados del mismo, mediante un método estandarizado y regulado por las normas nacionales e internacionales (EPA 418.1, EPA 8015) (ATSDR, 1999).

La Norma (NOM-EM-138-ECOL-2002) establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, la caracterización del sitio y procedimientos para la restauración, de acuerdo con el uso del suelo. Los científicos han dividido a los HTP en grupos de hidrocarburos de petróleo que se comportan en manera similar en el suelo o en el agua. Estos grupos se llaman fracciones de hidrocarburos del petróleo. Cada fracción contiene muchos productos químicos individuales. Algunas sustancias químicas que pueden encontrarse en los HTP incluyen hexano, combustibles de aviones de reacción, aceites minerales, benceno,

tolueno, xilenos, naftalina y fluoreno, así como también a otros productos del petróleo y de los componentes de gasolina. Sin embargo, es probable que muestras de HTP contengan solamente algunas, o una mezcla de estas sustancias químicas (ATSDR, 2001).

3.2 Biorremediación

La conversión completa de un compuesto orgánico a los productos finales bióxido de carbono y agua se denomina mineralización (Torres, 1997). Un compuesto es biodegradable cuando se convierte a otro compuesto más simple, por medio de microorganismos. La presencia prolongada de los contaminantes en los suelos ha ocasionado que muchos microorganismos presentes hayan desarrollado la capacidad bioquímica para degradarlos. Esta capacidad es precisamente la base de las tecnologías de biorremediación que en los últimos años han surgido como una alternativa muy atractiva para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados. Una de las principales características de la biorremediación es que los contaminantes realmente se pueden transformar en compuestos inocuos al ambiente y no solamente se transfieren de lugar, como sucede en los tratamientos fisicoquímicos. En las tecnologías de biorremediación se explota la capacidad de aclimatación que los microorganismos han logrado desarrollar bajo las condiciones que imperan en un lugar contaminado. Dichas condiciones pueden llegar a ser adversas para su sobrevivencia, sin embargo, las diferentes poblaciones se adaptan entre sí organizando su interacción para actuar de manera sinérgica, con lo cual se logra la degradación del compuesto contaminante.

Según Zehner, 2001, los métodos de biorremediación se pueden aplicar de la siguiente manera: *in situ*, o fuera del sitio. Cualquiera que sea el método de biorremediación que se emplee, requiere de elementos que estimulen a los microorganismos para su crecimiento y capacidad metabólica. Estos elementos son los siguientes: control de la humedad del suelo, temperatura, fuente de oxígeno y pH. Todos estos factores son de gran importancia, mas sin embargo los que deben ser estudiados inicialmente son los aceptores de electrones y los nutrimentos requeridos por ellos. El aceptor final de electrones es el que define la vía metabólica de respiración que utilizan los microorganismos involucrados, por lo que debe asegurarse la presencia de este en las concentraciones requeridas para estimular la actividad degradadora. De acuerdo con el aceptor final de electrones, el metabolismo microbiano debe ser aerobio cuando se lleva a cabo en presencia de oxígeno, o bien anaerobio cuando compuestos inorgánicos oxidados como nitratos, sulfatos o dióxido de carbono actúan en lugar del oxígeno. En términos generales, el metabolismo anaerobio genera menos material celular en comparación con el aerobio, por lo que podría asegurar un menor incremento en la población

microbiana y así evitar alteraciones del ecosistema. Sin embargo, el metabolismo anaerobio ocurre a una velocidad menor.

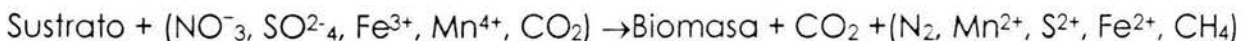
Los aceptores más empleados comúnmente por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; sin embargo, si se emplean los sulfatos o el dióxido de carbono se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio (Maroto, 1997).

De manera general se pueden citar los siguientes ejemplos para la degradación aerobia y la anaerobia.

Degradación aerobia:



Degradación anaerobia:



La concentración y la composición de la comunidad microbiana y la tasa de transformación de contaminantes se encuentra influenciada por diversos factores:

Nutrientes: El metabolismo microbiano se encuentra orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y síntesis. Los macronutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno. Por lo general suele haber en el suelo una concentración suficiente; sin embargo, si estos no se encuentran en la relación óptima C:N:P, 100:10:1 se puede adicionar una mayor cantidad al medio (Bossert y Bartha, 1984).

pH : el pH del suelo afecta significativamente a la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo. La acidificación o la reducción del pH en el suelo se puede realizar adicionando azufre o compuestos del azufre.

Temperatura: generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura bastante reducidos, entre los 15 y los 45 °C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C (Ercoli, 2001).

Humedad: los microorganismos requieren unas condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados (Maroto, 1997).

Estructura química del hidrocarburo: La inherente biodegradabilidad de un hidrocarburo depende, en gran medida, de su estructura molecular. Los parámetros que más la afectan son la halogenación, la existencia de ramificaciones (alcanos ramificados), la solubilidad baja en el agua, compuestos cíclicos, aromáticos y el peso molecular del compuesto (Maroto, 1997).

Adicionalmente, los métodos difieren entre ellos en la aplicación de productos complementarios tales como macro-nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio), micronutrientes (Fe, Mg, Ca, Co, Ni) enzimas, y materiales de estructuración, a fin de proveer condiciones óptimas para la acción de los microorganismos.

Existen dos tipos de biorremediación: 1) La bioestimulación, que consiste en proporcionar a los microorganismos nativos los nutrientes y las condiciones necesarios para su crecimiento y 2) El bioaumento que consiste en la adición de microorganismos adaptados de origen natural, autóctonos o manipulados por ingeniería genética para incrementar o acelerar la degradación de los compuestos tóxicos contaminantes del suelo. Estos métodos son adecuados para la remediación de contaminantes orgánicos, tales como hidrocarburos, al hacer uso de la facultad de algunos microorganismos de degradar a las sustancias orgánicas y aprovecharlas como fuente de energía (Iturbe, 2003).

Condiciones nutrimentales

La degradación microbiana de cualquier sustrato requiere la presencia de nitrógeno (N), Fósforo (P) y potasio (K), además de pequeños niveles de zinc, calcio, magnesio, hierro, sodio y sulfuro para un crecimiento óptimo microbiano. La materia orgánica en los desechos, es el sustrato principal de los microorganismos que realizan la degradación, los compuestos orgánicos contienen carbono que sirven como fuente de energía y de carbono (Iturbe, 2003). El N y el P son limitantes en el suelo (US EPA, 1985). Las cantidades de N y P necesarias para el máximo crecimiento y actividad generalmente se estiman tomando en cuenta el carbono viable en el sistema,

incluyendo el contaminante y considerando una relación adecuada de C/N/P. Los estudios de biodegradabilidad con frecuencia incluyen tratamientos en los cuales los efectos variables de esta relación se determinan comúnmente empleando valores de 100:10:1 ó 120:10:1 y 100:4:1 (Bossert y Bartha, 1984).

Diversos estudios han demostrado que la aplicación de fertilizantes tales como urea-fosfato, triple 17 (N/P/K) y sales de fosfato y amonio aceleran la biodegradación de crudo o gasolina en el suelo y de las aguas subterráneas. Sin embargo, en algunos casos, el empleo de fertilizantes no incrementa la biodegradación, o solo se observa después de algunos meses. Esto se atribuye a la gran variabilidad y composición compleja de los suelos, además de otros factores entre las que destacan las reservas de nitrógeno y la presencia de bacterias fijadoras del mismo (Márquez, 1997).

Biodisponibilidad

La degradación de un contaminante en suelo depende de una serie de factores, entre ellos, actividad de los microorganismos y transferencia de masa desde el suelo hasta el microorganismo. La biodisponibilidad de los hidrocarburos para los microorganismos dependerá del tipo de hidrocarburo y de las propiedades del suelo como la adsorción en la superficie de las partículas del suelo.

La biodisponibilidad llega a ser una limitante a medida que la concentración de los contaminantes se reduce de alta a baja el cual está en función de su estructura química. En el caso del petróleo, primero los compuestos fácilmente degradables ocasionan que otros componentes resulten persistentes, debido a problemas de las limitaciones de transferencia de masa causadas por la difusión de los contaminantes a sitios menos accesibles, además de su difícil degradación (Jonge, 1997). Algunas soluciones a este problema ha llevado al empleo de otros compuestos que ayuden a los hidrocarburos para que pasen de estar adsorbidos a solubilizados, estos incluyen surfactantes, cosolventes y sales inorgánicas (pirofosfatos), (Zegarra, 2000).

Los microorganismos y los contaminantes se encuentran distribuidos entre las tres fases, sólida, líquida y gaseosa del suelo. Muchos contaminantes son hidrofóbicos y tienden a adsorberse en el suelo de manera que solo una pequeña fracción del compuesto permanece en la fase líquida. En un largo período de contacto los compuestos adsorbidos se difunden entre las matrices orgánica e inorgánica y posiblemente se unan más fuertemente. Muchas evidencias indican que la mayoría de los compuestos orgánicos son tomados por las bacterias en la fase líquida. Consecuentemente, un proceso tal como lo es la adsorción o volatilización que reduce la concentración de la solución, tiende a reducir la velocidad de

transformación. Además de la acumulación de los contaminantes en fisuras y cavidades inaccesibles para los microorganismos y sus enzimas (Márquez, 1997).

3.3 Lodos Activados

El tratamiento biológico es una oxidación de la materia orgánica biodegradable con participación de bacterias que se ejecuta para acelerar un proceso natural y evitar posteriormente la presencia de contaminantes y la ausencia de oxígeno en los cuerpos de agua (PUCC, 2004).

Los procesos de tratamiento biológico se pueden dividir según el estado en que se encuentren las bacterias responsables de la degradación. La biomasa bacteriana puede estar soportada sobre superficies inertes tales como rocas, escoria, material cerámico o plástico, o puede estar suspendida en el agua a tratar. En cada una de estas situaciones la concentración de oxígeno en el agua determina la existencia de bacterias aerobias, facultativas o anaerobias. Los procesos aerobios con biomasa suspendida que más se aplican son los de *lagunas aeradas* y los de *lodos activados*. El proceso de lodos activados descrito por Winkler, 1986 probablemente es el de más amplio uso para el tratamiento de aguas residuales, orgánicas e industriales. El principio básico del proceso consiste en que las aguas residuales se pongan en contacto con una población microbiana mixta, en forma de suspensión floculada en un sistema aerado y mezclado. La materia en suspensión y la coloidal se eliminan rápidamente de las aguas residuales por adsorción y aglomeración en los flóculos microbianos. Esta materia y los nutrientes disueltos, se descomponen más lentamente por metabolismo microbiano, proceso conocido como "estabilización". En este proceso parte del material nutritivo se oxida a sustancias simples como bióxido de carbono (CO_2), un proceso denominado "mineralización", y parte de este se convierte en una materia celular microbiana nueva, llamada "asimilación". Parte de la masa microbiana se descompone también de la misma manera, mediante un proceso llamado "respiración endógena". El proceso oxidativo suministra la energía necesaria para la operación de los procesos de adsorción y asimilación. Una vez que se alcanza el grado de tratamiento que se desea, la masa microbiana floculada conocida como "lodo o biomasa", se separa del agua residual por sedimentación, por lo general en un tanque separado. Del sobrenadante de la etapa de separación resulta entonces el agua residual tratada y la cual deberá estar virtualmente libre de lodos. La mayor parte del lodo sedimentado en la etapa de separación, se regresa a la etapa de aeración para mantener la concentración de los lodos en el tanque de aeración al nivel necesario para un tratamiento efectivo y para que actúe como inóculo microbiano. Parte de los lodos se extrae para su descarga, el cual se conoce como "lodos activados desechados o excedentes".

En resumen el proceso se lleva a cabo de la siguiente manera:

Materia Orgánica + Bacterias + O₂ → Lodo biológico + CO₂ + H₂O (nuevas bacterias + residuos). (1)

Las reacciones microbiológicas son autocatalíticas, es decir que la presencia de uno de los productos, organismos adicionales y enzimas, aumenta la rapidez de reacción (Scragg, 1996).

El sistema de lodos activados está constituido básicamente por un tanque de aeración donde el agua residual es estabilizada biológicamente, el ambiente aerobio es debido al empleo de equipos de transferencia de oxígeno (difusores de aire o aeradores superficiales), al igual que el tanque de aeración, existe un sedimentador donde el agua residual y el lodo activado procedente del tanque aerador se sedimentan separando los sólidos suspendidos (lodos activados) y obteniéndose un efluente clarificado, parte de los sólidos que sedimentan se recirculan al tanque de aeración con el propósito de mantener una alta concentración de microorganismos, los lodos en exceso, debido al crecimiento bacteriano se retiran del sistema y se llevan a un tratamiento para su uso o disposición final (scragg,1996).

Aclimatación de Lodos

Existen sistemas de tratamiento biológico en los cuales los microorganismos se encuentran en suspensión, tal como el sistema de lodos activados y sus modificaciones, las lagunas de estabilización y diferentes tipos de digestores anaerobios (Torres, 1997).

En otros sistemas, la biomasa se encuentra inmovilizada sobre soportes fijos o rotatorios, como son los biofiltros, llamados también filtros percoladores y los conectores rotatorios también llamados biodiscos. Los procesos biológicos dependiendo del régimen de flujo, se llevan a cabo fundamentalmente en tres tipos de reactores:

- Batch o en lote
- Continuos de mezcla completa
- De flujo pistón

La aclimatación es la adaptación de un organismo durante su permanencia bajo condiciones diferentes a su medio o entorno propio, por ejemplo condiciones de

laboratorio tales como: temperatura, salinidad, oxígeno disuelto, sustancias tóxicas, entre otras (Zegarra, 2000).

Como se mencionó, la mayoría de los tóxicos orgánicos son biodegradables, si bien algunos lo hacen muy lentamente. Para que la biodegradación ocurra, la biomasa debe ser aclimatada a un compuesto orgánico específico, particularmente cuando se usa inicialmente una biomasa disímil como es el caso de los lodos activados. Cuando se están aclimatando los lodos biológicos a los tóxicos orgánicos, es imperativo observar el umbral de inhibición. Inicialmente cuando el lodo no está aclimatado, la concentración de alimentación del tóxico orgánico debe ser muy baja, ya que no está ocurriendo una biodegradación en el reactor. A medida que ocurre la aclimatación, se obtiene como resultado la biodegradación de tóxicos orgánicos. Aquí la concentración de alimentación puede ser elevada en forma proporcional a la tasa de biodegradación, sin embargo dependiendo del compuesto orgánico considerado, la aclimatación total puede llevarse algo de tiempo.

En algunos casos, se requiere de un co-sustrato como por ejemplo la sacarosa la cual es fácilmente degradable para efectuar una rápida biodegradación de un tóxico orgánico específico. Esto, generalmente, no constituye un problema para la mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales. Algunas sustancias tóxicas orgánicas se degradan muy lentamente en el proceso de lodos activados y por lo tanto, se requieren períodos largos para la retención de lodo (TRL), o tiempo de retención celular y llegar a una reducción aceptable de toxicidad (CEPIS, 1997).

3.4 Bacterias degradadoras de hidrocarburos

Se ha demostrado que la degradación microbiana de crudo ocurre por el ataque a las fracciones de hidrocarburos alifáticos o aromáticos ligeros. Los asfaltenos, resinas y aromáticos de alto peso molecular son considerados como compuestos recalcitrantes. A los compuestos resistentes a la biodegradación, en un sitio bajo condiciones dadas, se les llaman persistentes o recalcitrantes; sin embargo no existen pruebas que demuestren que un producto sea realmente recalcitrante bajo diferentes condiciones ambientales (Grady, 1985).

La biorremediación depende principalmente de la actividad de los microorganismos aerobios, un suministro adecuado de oxígeno al suelo es esencial para la biorremediación (Roldán, 2001). Se requieren aproximadamente una relación de 1:1 a 3:1 de oxígeno e hidrocarburos para asegurar una buena degradación. Cuando los poros del suelo se encuentran ocupados por moléculas de agua, la difusión del oxígeno es menor y se pueden presentar condiciones anóxicas. Para tener una

degradación aerobia adecuada es necesario tener aproximadamente un mínimo de 10% de poros libres en la matriz del suelo (Fahnestock, Wickramanayake, 1998).

La degradación de hidrocarburos depende en gran medida de la estructura molecular del mismo ocurriendo los procesos de degradación de la siguiente manera:

- Los hidrocarburos alifáticos de cadena recta son más fáciles de degradar que los que poseen radicales, ya que el radical dificulta la biodegradación.
- Los compuestos alifáticos de cadena lineal (parafínicos) se degradan fácilmente, pero cuando se incluyen como sustituyentes alcanos de cadena larga, se forman estructuras ramificadas estéricamente inaccesibles para la degradación. De la misma forma, tanto los compuestos alifáticos insaturados como los aromáticos se degradan más lentamente que los saturados (Ercoli, 2001)
- Los hidrocarburos saturados son más fáciles de degradar que los insaturados ya que la presencia del doble o triple enlace dificultan la degradación.
- Las cadenas largas de hidrocarburos son más fáciles de degradar que las cortas, (Atlas, 1991).
- Los compuestos aromáticos simples se degradan por diferentes aperturas del anillo. La incorporación de halógenos disminuye la degradabilidad por estabilización del anillo. Tanto en los compuestos aromáticos policlorados como los policlorobencenos su biodegradabilidad disminuye al aumentar el número de átomos de cloro en la molécula. (Ercoli, 2001)

La actividad biológica altera la estructura molecular del contaminante y el grado de alteración determina si se ha producido biotransformación o mineralización (Ercoli, 2001). La biotransformación es la descomposición de un compuesto orgánico en otro similar no contaminante o menos tóxico, mientras que la mineralización es la descomposición a dióxido de carbono, agua, y compuestos celulares, como se puede apreciar en la Figura 3.1.

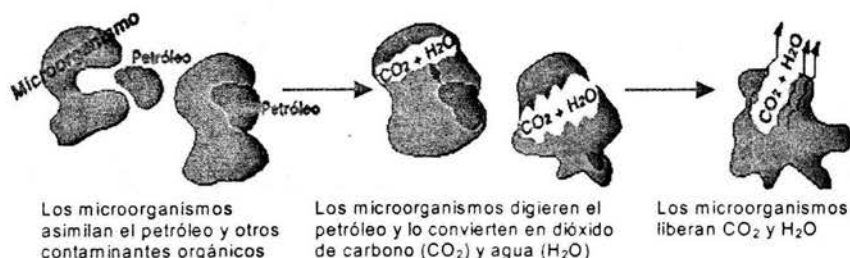


Fig. 3.1 Mineralización del petróleo por actividad microbiana.

3. MARCO TEÓRICO

En la Tabla 3.1 se muestran algunas bacterias identificadas en la degradación de hidrocarburos.

Tabla 3.1 Bacterias degradadoras de hidrocarburos (Valderrama, 2001)

Género	Especie	Compuesto degradado
Acinetobacter	Sp.	n-Alcanos
	baumanii	Hidrocarburos saturados y aromáticos
Achromobacter	calcoaceticus	Bifenilos policlorados
	sp.	Petróleo crudo
Arthrobacter	sp.	Bifenilos policlorados
Alcaligenes	sp.	Hidrocarburos saturados y aromáticos
	faecalis	Petróleo crudo
Bacillus	lentus	Fenol
	mascercans	Bifenilos policlorados
	thuringiensis	Bifenilos policlorados
Beauveria	alba	Hidrocarburos saturados y aromáticos
Candida	tropicalis	Petróleo crudo
	tropicalis	Petróleo crudo
Cellulomonas	flavigena	Petróleo crudo
Comamonas	acidovorans	Bifenilos policlorados
Desulfotobacterium	dehalogenans	o-clorofenol
Desulfococcus	sp.	Alquilbencenos
Flavobacterium	devorans	Bifenilos policlorados
Gordonia	sp.	Dibenzotiofeno
Marinobacter	aquaelolei	Petróleo crudo
Micrococcus	spp.	Petróleo crudo
Microcoleus	sp.	Pireno
Mycobacterium	chthonoplastes	n-alcanos
	sp.	Pireno
	sp.	n-alcanos
Nocardia	sp.	Dibenzotiofeno
Nocardiopsis	sp.	Petróleo crudo
Paenibacillum	spp.	Dibenzotiofeno
Phormidium	corium	N-Alcanos
Penicillium	simplicissimum	Hidrocarburos saturados y aromáticos
Pleorotus	ostreatus	Polinucleo aromáticos
Pseudomonas	sp.	Tolueno
	sp.	Bifenilos policlorados
	sp.	Fenantreno
	sp.	Petróleo crudo
	aeruginosa	Fenol
	fluorescens	Petróleo crudo
	putida	Petróleo crudo
stutzeri	Tetracloroetileno	
Rhizobium	meliloti	Dibenzotiofeno
Rhodococcus	sp.	Dibenzotiofeno
	sp.	Alcanos
	erythropolis	Petróleo crudo
Saccharomyces	sp.	Petróleo crudo
Serratia	sp.	Fenol
	marcescens	Petróleo crudo
	paucimobilis	HPA's
Sphingomonas	sp.	carbazol
	spiritivorum	Hidrocarburos saturados y aromáticos

Fases de crecimiento de una población bacteriana

El crecimiento y reproducción de las bacterias ocurre a medida que nutrientes son procesados e incorporados como nuevo material de célula. El proceso reproductivo de la célula, **fisión binaria**, es una característica del crecimiento bacteriano. Las poblaciones bacterianas pueden alcanzar altas densidades muy rápidamente. Las células individuales se duplican a una tasa característica para cada organismo. Este intervalo se conoce como el tiempo de generación.

El crecimiento de una población bacteriana se compone de una serie de fases. Durante la primera de ellas como se puede apreciar en la Figura 3.2, **fase lag (A)**, las células se ajustan a su nuevo ambiente. Ellas pueden tener deficiencias en ciertas enzimas y coenzimas por lo que durante esta etapa se produce la síntesis de estos materiales. Al final de esta etapa se entra a la **fase exponencial o logarítmica (B)**, en la cual la población se duplica a intervalos regulares. Este es el período de más rápido crecimiento bajo condiciones óptimas. Cuando el número de células que son producidas iguala al número de células que mueren se establece un equilibrio dinámico en el cual no existe un mayor crecimiento. Esta etapa se denomina **fase estacionaria (C)** y se debe a un agotamiento de algún nutriente. La **fase de muerte o declinación (D)** se alcanza cuando la tasa de destrucción supera la tasa de crecimiento como se presenta en la Figura 3.2.

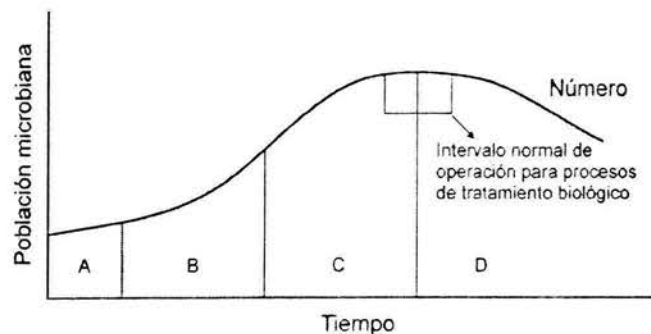


Fig. 3.2 Curva de crecimiento bacteriano

3.5 Experiencias de biorremediación aplicadas en suelos contaminados con hidrocarburos

En este apartado se describen algunos trabajos realizados en distintos sitios contaminados con hidrocarburos donde se ha utilizado con éxito la biorremediación como una alternativa de rehabilitación de suelos:

Caso 1) Saval, 1997, aplicó la técnica de biorremediación en un suelo contaminado con diesel (506.92 mg/kg) en una superficie de 2,625 m² mediante la bioestimulación de la flora microbiana autóctona, aplicando nutrientes, nitrógeno y fósforo en forma de fertilizantes y riego constante, los parámetros analizados durante el tratamiento fueron pH (7.8), los nutrimentos aplicados, cuenta de bacterias y consumo de oxígeno como medida de la actividad biológica del suelo la cual tuvo un valor final de 0.56 mg de O₂/ g de suelo, al final de dos meses de tratamiento, la concentración de diesel se redujo en un 80% alcanzando a los seis meses el 98% de eliminación, quedando una concentración residual en el suelo de 10.24 mg/kg, la determinación de hidrocarburos totales de gasolina y diesel se realizaron mediante el método EPA 8015M por cromatografía de gases con detector de ionización de flama.

Caso 2) Ferrari, *et al.*, 1994, efectuaron pruebas en laboratorio para la biodegradabilidad de lodos de fondos de tanques de almacenamiento de petróleo, empleando comunidades microbianas autóctonas y diferentes niveles y tipos de nutrimentos, los cuales aumentaron la velocidad de degradación logrando una remoción del 40% del residuo entre 30 y 90 días según el tipo de fertilizante empleado, aumentando también la población microbiana degradadora de hidrocarburos. Las variables que se controlaron fueron; la humedad entre el 10 y el 15%, el pH entre 7.0 y 7.6, los fertilizantes que se aplicaron: K₂HPO₄, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄, NH₄NO₃ y triple 15, la enumeración de microorganismos aerobios totales se realizó mediante la técnica de cuenta en placa petri, los mejores valores de degradación se obtuvieron para los ensayos que tenían los siguientes niveles de aplicación de nutrientes: C/N = 10-100, C/P=100-1000 y C/K= 100-2000 relaciones en peso de elemento.

Caso 3) Curci, *et al.*, 1999, aplicaron la técnica de biolabranza para el tratamiento de barros, lodos y sedimentos del petróleo, controlando parámetros críticos que favorecen la degradación de los hidrocarburos: humedad, evolución de nutrimentos y el pH del suelo, logrando obtener una disminución de la concentración de hidrocarburos de un 20 % a 5 %. Se realizó un seguimiento de la relación C/N/P incorporando fosfato diamónico, se determinó la concentración de microorganismos degradadores de hidrocarburos por cuenta en placa.

Caso 4) Ercoli, *et al.*, 1995, seleccionaron microorganismos autóctonos con la capacidad de degradar hidrocarburos sometidos a un proceso de adaptación y se inocularon a un terreno de 10,000 m² al cual se le agregó una cantidad de residuos de hidrocarburos, el cultivo microbiano se produjo en un reactor de 18 L de capacidad y se aplicó 0.5L/m², el suelo fue acondicionado aplicando nitrógeno y fósforo según lo requirió el suelo. En este estudio se logró una degradación del orden del 70%, con una tasa de degradación de 261 kg del residuo por mes.

Caso 5) Jutean, *et al.*, 2003, aplicaron lodos activados a un suelo contaminado con residuos de petróleo de una refinería para formar una biopila de 50 m³ con una aplicación de 6,000 L iniciales de lodo y 3,000, 6,000 y 1,500 L de lodos después de 31, 66 y 98 días respectivamente, el porcentaje de humedad se mantuvo al 10% durante toda la experimentación, el pH varió de 6.6 a 7.6. Sus resultados mostraron una alta degradación de alcanos con un 80% de degradación comparado con un 24% que tuvo al aplicar se solo agua, concluyendo que la aplicación de lodos incrementa la eficiencia de degradación en el tratamiento.

Caso 6) Iturbe, *et al.*, 2002, diseñaron y construyeron una biopila dentro de una refinería para tratar suelo contaminado con hidrocarburos, con una concentración de 53,000 mg/Kg de HTP, logrando obtener una degradación del 82% en 22 semanas. Durante el experimento se mantuvo una relación de 100/15/1 de los nutrientes C/N/P. Las fracciones que lograron ser removidas al cabo de las 22 semanas fueron las de Diesel, y la de Gasolina y la de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAH por sus siglas en Inglés).

Caso 7) Torres, *et al.*, 2003, probaron 3 surfactantes diferentes, aniónicos y no iónicos, para determinar la eficacia en la remoción de hidrocarburos del 52 al 88 %, al utilizar un surfactante no iónico (nonil fenil etoxilado) empleando una concentración de 45 mg/L del tensoactivo.

3.6 Legislación Ambiental en México referente a suelos contaminados con hidrocarburos.

Norma PROY-NOM-138-ECOL-2003 (SEMARNAT, 2000)

El día 20 de agosto de 2002 se publicó en el *Diario Oficial de la Federación* la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-138-ECOL-2002, en donde se establecen fundamentalmente previsiones para establecer:

- Los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por derrame de hidrocarburos;
- Las reglas para llevar a cabo la caracterización del sitio afectado; y

- El procedimiento para la restauración del sitio afectado por derrames de hidrocarburos.

Dicho instrumento jurídico, recoge dos aspectos importantes: 1) La experiencia obtenida desde 1995 en la Procuraduría Federal de la Protección al Ambiente (PROFEPA), la atención de emergencias ambientales generadas por el derrame de diversas sustancias, en particular hidrocarburos y, 2) Las atribuciones que han sido asignadas a las diferentes unidades administrativas de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

La propia norma oficial mexicana, en su apartado de consideraciones o razonamientos que justifican su emisión, señala que las acciones que al respecto desarrollan las distintas unidades administrativas de la SEMARNAT, incluida la PROFEPA, no tienen la fuerza jurídica necesaria, por lo que los particulares y autoridades involucradas no tienen la certeza jurídica requerida para sancionar. Además, expresa que actualmente en nuestro país no se cuenta con un marco jurídico suficiente y transparente que precise los límites máximos permisibles de contaminación de suelos, la metodología para su caracterización y los procedimientos a seguir para atender emergencias ambientales por derrames de hidrocarburos. Aunque limitada en cuanto a sus alcances, la NOM-EM-138-ECOL-2002 llena un vacío importante de nuestra normatividad ambiental, ya que sus previsiones se aplican únicamente en el caso de derrames de hidrocarburos que contaminen o puedan contaminar suelos. La regulación de la prevención de la contaminación de suelos y su restauración, debe tener alcances mucho más amplios; sin embargo, en virtud de lo importante que resulta atender los problemas que se derivan de la contaminación de suelos por derrame de hidrocarburos, indudablemente resultan de mucha utilidad las disposiciones previstas en la Norma. A continuación se describe brevemente el contenido del instrumento jurídico que se comenta:

En primer lugar, como ya se mencionó, se establecen los límites máximos permisibles de contaminación de suelos por hidrocarburos, especificándose los parámetros a considerar en el caso de los distintos productos y materiales asociados (por ejemplo combustóleo, emulsiones, asfalto, parafinas, diesel, etc.)

Un segundo aspecto que se regula en esta norma es el relativo a las peculiaridades que habrán de considerarse en la caracterización de los sitios contaminados por derrames de hidrocarburos. De acuerdo con la Norma, esta actividad deberá contener los elementos que a continuación se indican, con las especificaciones que en cada caso se prevén:

- Estudios de campo del sitio
- Muestreo y caracterización del sitio
- Selección del equipo de muestreo y del recipiente respectivo

- Conservación de muestras
- Número de muestras
- Responsabilidades de la empresa muestreadora
- Identificación de las muestras
- Registro de la información del muestreo

En tercer lugar, establece los procedimientos a seguir para la restauración de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos, lo que será considerado como una emergencia ambiental, de acuerdo con la definición que de ésta establece la Ley General de Equilibrio Ecológico y protección al Ambiente (LGEEPA). En términos generales el procedimiento incluye las siguientes actividades:

- Notificación a la PROFEPA del derrame respectivo.
- Muestreo u caracterización del sitio, notificando de las actividades correspondientes a la PROFEPA y, en su caso a la Comisión Nacional del Agua.
- Restauración del sitio basado en la propuesta respectiva que hubiera sido sometida y validada por la SEMARNAT, a través de su Dirección General de Manejo Integral de Contaminantes.

Liberación del sitio, previa validación de la PROFEPA del cumplimiento de los términos del programa de restauración de sitios que corresponda.

Finalmente, cabe señalar que la NOM-EM-138-ECOL-2002 permite la participación de las unidades de verificación, organismos de certificación y laboratorios de prueba autorizados en términos de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización (Cancino, 2002).

3.7 Tecnologías de remediación utilizadas en México (INE, 2003)

En el mercado ambiental de México, actualmente existen una gran cantidad de empresas que ofrecen diferentes tipos de tecnologías para la remediación de sitios contaminados. Sin embargo, no fue hasta 1997, que las autoridades ambientales establecieron un programa de verificación y certificación de estas empresas. Actualmente para poder realizar un trabajo de remediación es necesario contar con permisos específicos. Esta disposición oficial, ha permitido un mayor control acerca de las tecnologías que se ofrecen para remediar suelos y de las posibilidades reales de éxito que éstas permiten.

De acuerdo con datos proporcionados por la SEMARNAT, todas las tecnologías que ofrecen las empresas que cuentan con permisos para remediar suelos contaminados, están enfocadas exclusivamente a la remediación de sitios contaminados con compuestos orgánicos. De un total de 57 empresas autorizadas, ninguna ofrece servicios para la restauración de suelos contaminados con metales. Dentro de los contaminantes tratados, principalmente se encuentran los

hidrocarburos totales del petróleo e hidrocarburos aromáticos policíclicos, lodos aceitosos, lodos de perforación y recortes de perforación (Volke, 2002).

De acuerdo con datos proporcionados por 40 empresas autorizadas para remediar suelos contaminados con diferentes tipos de contaminantes, la mayoría utilizan métodos biológicos (biorremediación) para el tratamiento. El lavado de suelos, la oxidación química y la separación física constituyen otra parte importante de las tecnologías más empleadas en México. En la Figura 3.3 se observan las tecnologías de saneamiento más usadas en México.

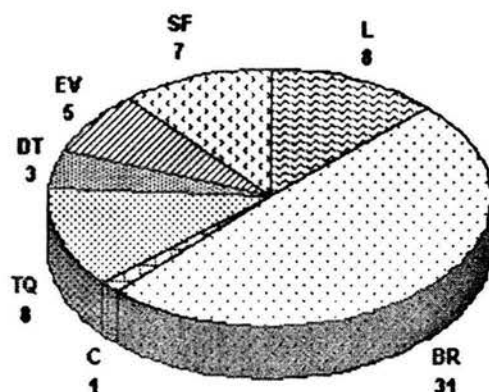


Fig. 3.3 Tecnologías de remediación de suelos utilizadas en México por empresas autorizadas
BR: biorremediación; L: lavado; SF: separación física; EV: extracción de vapores; DT: desorción térmica;
TQ: tratamiento químico; C: centrifugación (Fuente: Volke 2002).

De las empresas que ofrecen servicios de biorremediación, la mayoría utiliza sistemas de composteo y biolabranza. De los tratamientos ofrecidos por estas empresas, el 87.5% se realizan "in situ" y el resto fuera del sitio.

3.8 Caracterización del suelo

La matriz del suelo está formada por cinco componentes principales: minerales, aire, agua, materia orgánica y organismos vivos. Los materiales minerales son los principales componentes estructurales y constituyen más del 50% del volumen total del suelo. El aire y el agua juntos ocupan el volumen de los espacios en la zona no saturada y generalmente conforman de un 25 a un 50% del volumen total. La proporción relativa de aire/agua fluctúa considerablemente con el contenido de agua del suelo. El material orgánico ocupa entre el 3 y el 6% del volumen promedio, mientras que los organismos vivos constituyen menos del 1% (Eweis, 1998).

Todos estos factores definen el tipo de suelo, que junto con las condiciones particulares de un sitio, pueden limitar frecuentemente la selección de un proceso de tratamiento en particular. Por otra parte, la posibilidad de usar una tecnología de tratamiento, puede eliminarse en base a la clasificación del suelo u otras características propias de éste. A continuación se describen algunos de los datos del suelo, que pueden obtenerse con relativa facilidad y que controlan la eficiencia de una tecnología de remediación (INE, 2002):

- pH
- Fósforo disponible
- Nitrógeno total
- Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)
- Contenido de Agua
- Densidad aparente y real
- Fracción de carbono orgánico

Determinación de pH

El valor de pH se utiliza para conocer el grado de acidez, neutralidad y basicidad del suelo. Es una herramienta que permite entender y explicar, en muchos casos, aspectos de la biología y ecología de especies vegetales y animales, ya que el índice de acidez o basicidad de los suelos determina en buena medida la disponibilidad de nutrientes, su asimilación por parte de las plantas y, como consecuencia, el crecimiento y desarrollo de éstas. El método para determinarlo es el método AS-02 de la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. El pH se mide con un potenciómetro calibrado con soluciones amortiguadoras en pH 4 y 7, en el sobrenadante de la suspensión de una mezcla de relación suelo: agua 1:2.

Fósforo disponible

La determinación de fósforo en el suelo es de gran importancia, ya que constituye un indicador de la cantidad de nutrientes con los que cuenta el suelo y que los microorganismos pueden emplear.

El fósforo se encuentra en toda célula viva y es esencial en la nutrición, tanto vegetal como animal. Desempeña una función primordial en las transformaciones energéticas de las plantas, en la síntesis de proteínas y en el proceso de reproducción celular.

En el suelo, el fósforo se encuentra en forma orgánica e inorgánica. El fosfato presente en la solución de suelo muestra la siguiente dinámica:

3. MARCO TEÓRICO

- (1) Se absorbe por las plantas o los microorganismos
- (2) Se precipita en forma de sales apenas solubles en presencia de calcio, hierro o aluminio
- (3) Se adsorbe por los sitios de intercambio aniónico
- (4) Se lixivia a partir de la rizósfera

El fósforo del suelo puede proceder de diversas fuentes:

- 1) Aplicación de fertilizantes comerciales
- 2) Estiércoles de granja
- 3) Residuos vegetales
- 4) Minerales presentes en el suelo, como la fluorapatita, el carbonato, los fosfatos cálcicos, etc.

La técnica a aplicar para su determinación es el método Bray I para suelos ácidos a neutros.

El método Bray I, es empleado para suelos ácidos como un índice del fósforo (P) disponible en los suelos. El fósforo extraído con una solución de fluoruro de amonio (NH_4F) ácida (HCl) y diluida, tiene como finalidad remover las formas de fósforo fácilmente solubles en medio ácido, así como gran parte de los fosfatos de calcio y una porción de los fosfatos de aluminio y de hierro, debido a la formación de un ión complejo con estos iones metálicos cuando se encuentran en solución ácida. La determinación de la concentración de fósforo disponible, es obtenida mediante el trazo una curva patrón en donde se grafica la concentración en ppm y la transmitancia e interpolando en la misma los valores de absorbancia de las muestras analizadas a las cuales previamente se les ha restado el valor promedio de los blancos o por medio de una regresión simple.

La interpretación del resultado obtenido se basa en la Tabla 3.2:

Tabla 3.2 Interpretación de los contenidos de fósforo, obtenidos para el Bray I (Reyes, 1996)

Concentración de Fósforo (ppm)	Clase
< 15	Bajo
15-30	Medio
> 30	Alto

Nitrógeno total

El ciclo del nitrógeno representa sólo una parte del ciclo total en la naturaleza. La disponibilidad de este elemento es indispensable para las plantas, que lo absorben, principalmente en forma de nitratos (NO_3^-) y amonio (NH_4^+), para utilizarlo en síntesis de proteínas y de otros compuestos orgánicos vegetales. Cuando los restos vegetales y animales vuelven al suelo, son objeto de numerosos procesos de transformación en su mayoría de carácter biológico.

Comúnmente el nitrógeno orgánico (Reyes, 1996) presenta entre el 85 y 95% del nitrógeno total. El nitrógeno en forma inorgánica en el suelo se presenta como óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO), dióxido (NO_2^-) y amoníaco (NH_3), en cantidades mínimas casi no detectables; además, se encuentra como amonio (NH_4^+), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Por lo general, estas formas inorgánicas constituyen solo del 2-5% del nitrógeno total del suelo.

El método a emplear es el Nitrógeno Total Kjeldahl (Es la suma de los nitrógenos amoniacal y orgánico presentes en la muestra, conocido como nitrógeno Kjeldahl).

A través de este método, el nitrógeno orgánico y amoniacal se convierte a sulfato de amonio, el cual se destila en ácido bórico y se titula con ácido sulfúrico o clorhídrico, utilizando como indicador verde de bromocresol – rojo de metilo.

Cálculo en por ciento del nitrógeno total

$$\%N_{total} = \frac{T - B}{M} * N(\text{H}_2\text{SO}_4) * 1.4 \quad \dots\dots\dots (2)$$

T = volumen de H_2SO_4 gastados en la muestra

B = volumen de H_2SO_4 gastados en el blanco

N = Normalidad del H_2SO_4

M = Peso de la muestra

1.4 = Miliequivalente de nitrógeno x 100 para relacionar el nitrógeno a por ciento

Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)

Debido a que hay muchos compuestos diferentes en el petróleo crudo y en otros productos de petróleo, no es práctico medir cada uno en forma separada, por lo que generalmente se determinan todos los hidrocarburos presentes en una muestra

de la que se desconoce con precisión la fuente contaminante (diesel, gasolina, crudo, benceno, etc).

La determinación de HTP se realiza mediante una extracción por Soxhlet como lo señalado en el método del proyecto de norma Proy-NOM-138-SEMARNAT-2003.

El sistema de extracción por Soxhlet, se basa en la solubilización de los componentes extractables, se efectúa a través del disolvente frío (hexano) que cae desde el refrigerante. En consecuencia, una extracción completa requiere de varias horas.

Contenido de agua

El agua que contiene un suelo es un factor importante para la elección de la tecnología a emplear. Un alto contenido de agua puede impedir el movimiento de aire a través del suelo, lo que afecta los procesos de biorremediación, así como provocar problemas durante la excavación y transporte, o aumentar el costo en el uso de métodos térmicos.

Esta técnica se basa (NOM-021-RECNAT-2000) en la determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene una muestra de suelo seca. La determinación de la masa de agua se realiza por la diferencia de peso entre la masa de suelo húmedo y la masa de suelo seco. Se considera como suelo seco aquél secado en estufa a 105 °C por 24 horas.

Cálculos:

$$\theta_g = \frac{(PB + Psh) - (PB - Pss)}{(PB + Pss) - PB} * 100 \dots\dots\dots(3)$$

Donde:

θ_g = Contenido de agua expresado en porcentaje

PB= Peso del recipiente con tapa (g)

Psh= Peso de suelo húmedo (g)

PB + Psh = Peso del recipiente más peso del suelo húmedo (g)

PB + Pss= Peso del recipiente más el peso del suelo seco (g)

Densidad aparente

La densidad aparente (DA) es la masa por unidad de volumen del suelo, en estado natural, y se expresa en g/cm³. La diferencia entre esta densidad y la densidad real radica en que la densidad aparente comprende tanto las partículas como los espacios del suelo, mientras para la densidad real se consideran únicamente las

partículas del suelo. Por esta razón, el valor de la densidad aparente es menor que la de la densidad real.

El valor de la densidad depende de la textura, la estructura, la macroporosidad y microporosidad, así como de la composición mineral y orgánica.

En la determinación de densidad aparente se aplicará la técnica de la probeta (Domínguez, 1997).

La densidad aparente de una muestra de suelo se calcula a partir del conocimiento de dos parámetros la masa del suelo y el volumen total, es decir el volumen de los sólidos y el volumen ocupado por el espacio poroso. En caso de la masa, esta se conoce pesando la muestra después de haber dado 10 golpes suaves en la probeta de volumen conocido. La densidad aparente, es el peso del suelo por unidad de volumen, es importante considerar que el suelo está compuesto por sólidos y espacios llenos de agua y/o aire (Volke, 2002).

Densidad Real

La densidad de las partículas del suelo, conocida también como densidad real se define como la masa (peso) de los sólidos del suelo por unidad de volumen. La densidad se expresa g/cm^3 . Los valores de densidad encontrados son variables y dependen de la composición del suelo. En la mayoría de los suelos minerales, su valor no debe de exceder de $2.65 g/cm^3$.

La materia orgánica, así como algunos vidrios volcánicos que existen en el suelo, repercuten en los valores de densidad, originando valores tan bajos como $1.2-1.5 g/cm^3$.

Cálculo de la densidad real o densidad de partículas (DP)

$$DP = \frac{S}{S + A - (S - a)} = \dots g/cm^3 \dots \dots \dots (4)$$

donde:

S= Peso de la muestra de suelo

A= Peso del agua sin el picnómetro

S+a= Peso del suelo + peso del agua (sin peso del picnómetro)

Materia orgánica

La materia orgánica (MO) contenida en un suelo es un índice del nivel de fertilidad natural. Constituye una reserva de nutrientes que son liberados en forma gradual

por medio del proceso de la mineralización. Entre estos nutrimentos destacan el nitrógeno, el fósforo y el azufre, así como otros elementos esenciales menores, que las plantas necesitan para su crecimiento y desarrollo.

Con respecto a las propiedades químicas del suelo, la materia orgánica favorece la retención de cationes debido a su elevada capacidad de intercambio catiónico, con lo cual se evita la pérdida de nutrimentos por lavado; la MO actúa además como agente quelante y como amortiguador. Por otra parte, los compuestos de carbono provenientes de la MO son fuente de energía por los organismos del suelo, cuya cantidad y diversidad se encuentran en función de los niveles de la materia orgánica presentes.

Esta determinación se realiza por el método de Walkley y Black de acuerdo al método AS-07, de la norma mexicana NOM-021-RECNAT-2000.

La técnica desarrollada por Walkley y Black, es un procedimiento indirecto por medio del cual se determina el carbono (C) de la materia orgánica, por ser un elemento relativamente constante en ella. En la cuantificación del carbono orgánico por combustión húmeda se emplea como oxidante el ácido crómico que resulta de la reacción del dicromato de potasio con el ácido sulfúrico. Debido a la oxidación de la materia orgánica se libera CO_2 . El porcentaje de carbono (C) se determina dividiendo el porcentaje de MO entre el coeficiente 1.724 el cual corresponde a el factor de Van Benmelen para estimar la materia orgánica a partir de carbono orgánico, el cual resulta de la suposición de que la materia orgánica contiene un 58% de C, $\frac{1}{0.58} = 1.724$

3.9 Caracterización de lodos

La caracterización de lodos es un factor importante para mantener la estabilidad de los lodos activados, por lo cual es necesario controlar algunos parámetros que indicaran crecimiento bacteriano en los reactores, los parámetros fueron los siguientes:

- pH
- Temperatura
- Oxígeno Disuelto

- Sólidos**
- Índice Volumétrico de Lodos**
- Nitrógeno Total**

A continuación se describirán brevemente cada uno de ellos.

pH

El pH debe mantenerse en un intervalo favorable para los microorganismos que intervienen en este proceso. Los microorganismos tienden a crecer en un intervalo limitado de 4 a 8 y aún dentro de este intervalo frecuentemente cambian su metabolismo como resultado de un cambio de incluso 1-1.5 unidades de pH. La obtención de este parámetro se realizó mediante un medidor calibrado de pH Chackemate Modular Testing System (Scragg, 1996).

Temperatura

Como en todas las reacciones químicas el crecimiento microbiano se afecta por la temperatura. Los microorganismos están divididos arbitrariamente en tres clases dependiendo de la temperatura óptima de su crecimiento. Estas clases son psicrófilos (< 20), mesófilos (20-37 °C) y termófilos (> 38 °C).

Este parámetro se determinó con un termómetro de vidrio (Scragg, 1996).

Oxígeno Disuelto

El crecimiento de un organismo aerobio en el cultivo sumergido requiere de oxígeno disuelto en el medio. El oxígeno debe ser aportado continuamente ya que es escasamente soluble en una solución acuosa. La transferencia de oxígeno del gas hacia los microorganismos se lleva a cabo en varias etapas. Primeramente el oxígeno debe viajar a través del gas hacia la interfase gas-líquido, después a través de la interfase a través del líquido y, finalmente, hacia el organismo. El proceso completo es impulsado por la diferencia entre la concentración del oxígeno en el gas y en el organismo (Scargg, 1996).

La solubilidad del oxígeno atmosférico en el agua dulce varía desde 14.6 mg/L a 0°C, hasta aproximadamente 7 mg/L a 35 °C a 1 atmósfera de presión. El oxígeno disuelto se determinó mediante un electrodo de membrana "Yellow Springs Instruments Co., Inc"(YSI) modelo 5775, calibrado a la presión atmosférica de la ciudad de México (Sawyer, 2001).

Sólidos.

La determinación del contenido de sólidos totales y volátiles son importantes en el análisis de lodos frescos y digeridos y su análisis fue realizado de acuerdo a la norma mexicana del sector NMX-AA-034-1981. Debido a que es imposible medir con pipetas muestras de lodos frescos y digeridos, es usual pesar las muestras en cápsulas de porcelana previamente preparadas a peso constante.

- **Sólidos totales**

Análíticamente se define el contenido de sólidos totales como la materia que se obtiene como residuo después de someter el agua a un proceso de evaporación. No se define como sólido aquella materia que se pierde durante la evaporación debido a su alta presión de vapor. La definición usual de sólidos se refiere a la materia que queda como residuo después de la evaporación y el secado entre 103 y 105 °C. Llamados también residuo de la evaporación, pueden clasificarse en filtrables o no filtrables (sólidos en suspensión), haciendo pasar un volumen conocido de líquido por un filtro (Semarnat, 2001).

- **Sólido sedimentables**

Se definen como aquellos que sedimentan en el fondo de un recipiente en forma cónica (cono Imhoff) en el transcurso de 60 min. Los lodos sedimentables, expresados en unidades de volumen ml/L constituyen una medida aproximada de la cantidad de lodo que se obtendrá en la decantación primaria del agua residual. También se definen como materiales que se depositan en el fondo de un recipiente debido a la operación de sedimentación.

- **Sólidos suspendidos volátiles**

Son los sólidos constituidos por sólidos sedimentables, sólidos en suspensión y sólidos coloidales, capaces de volatilizarse por el efecto de la calcinación a 823 K (550° C) en un tiempo de 15 a 20 minutos.

A esta temperatura la fracción orgánica se oxidará y desaparecerá en forma de gas, quedando la fracción inorgánica en forma de cenizas. De ahí que se empleen los términos "sólidos volátiles" y "sólidos fijos" para hacer referencia, respectivamente a los componentes orgánicos e inorgánicos (o minerales) de los sólidos en suspensión. La temperatura de 550 °C ± 50, la descomposición de sales inorgánicas se limitan al caso de carbonato de magnesio, que se descompone en óxido de magnesio y dióxido de carbono al alcanzar la temperatura de 350 °C. De las sales inorgánicas, la más frecuente y preponderante es el carbonato de calcio, que se mantiene estable hasta una temperatura de 825 °C. El análisis de sólidos volátiles se determina habitualmente para determinar la estabilidad biológica de lodos de aguas residuales. La determinación de estos parámetros se realizó de

acuerdo con la Norma Mexicana NMX-AA-034-SCFI-2001 Análisis de Agua - Determinación de sólidos. Analysis of Water - Determination for Residue.

Índice volumétrico de Lodo (IVL)

Se define como el volumen en mL, ocupado por 1 g del licor mezclado del tanque de aireación, después de 30 minutos de sedimentación. Se toma 1L de muestra del tanque de aireación y se vierte en una probeta graduada, se deja sedimentar por 30 min. Posteriormente se mide el volumen (en mL) ocupado por el material sedimentado. Se expresa como mL/L.

$$\text{IVL (mL/g)} = \frac{\text{Volumen sedimentado después de 30 min (mL/L)} \times 1000}{\text{Concentración de sólidos totales del licor mezclado (mg/L)}} \dots\dots\dots (5)$$

Nitrógeno Total Kjeldahl

Los procesos de tratamiento biológico dependen de la reproducción de los microorganismos por eso es necesario saber si el lodo contiene suficiente nitrógeno para los microorganismos, si no es así, se debe corregir cualquier deficiencia suministrándolo de fuentes externas. Para obtener esta información generalmente se realizan determinaciones de nitrógeno orgánico y amoniacal.

Este parámetro fue determinado aplicando la norma NMX-AA-026-SCFI-2001

3.10 Bacterias degradadoras de hidrocarburos

La degradación de las diferentes clases de hidrocarburos se lleva a cabo por distintos géneros de microorganismos del ecosistema. Existen gran variedad de especies de bacterias, hongos, actinomicetos, levaduras y algas que muestran la capacidad de degradar hidrocarburos. Los microorganismos degradadores son ubicuos y particularmente en ambientes expuestos crónicamente a hidrocarburos.

Para evaluar los microorganismos encargados de tomar al hidrocarburo como sustrato y convertirlos en sustancias inocuas, se llevará a cabo la selección, aislamiento, purificación e identificación de cepas bacterianas degradadoras de hidrocarburos (hidrocarbonoclastas).

Identificación según su morfología y tipo de pared celular

La identificación morfológica se realiza mediante una prueba tintorial de un frotis de la bacteria, la cual puede ser observada mediante microscopios ópticos según su coloración de las bacterias después de realizar la tinción. El frotis se realizó siguiendo 3 etapas como se muestra en la Figura 3.4:

- 1) extendido del material en un porta objetos transparente
- 2) Secado
- 3) Fijación

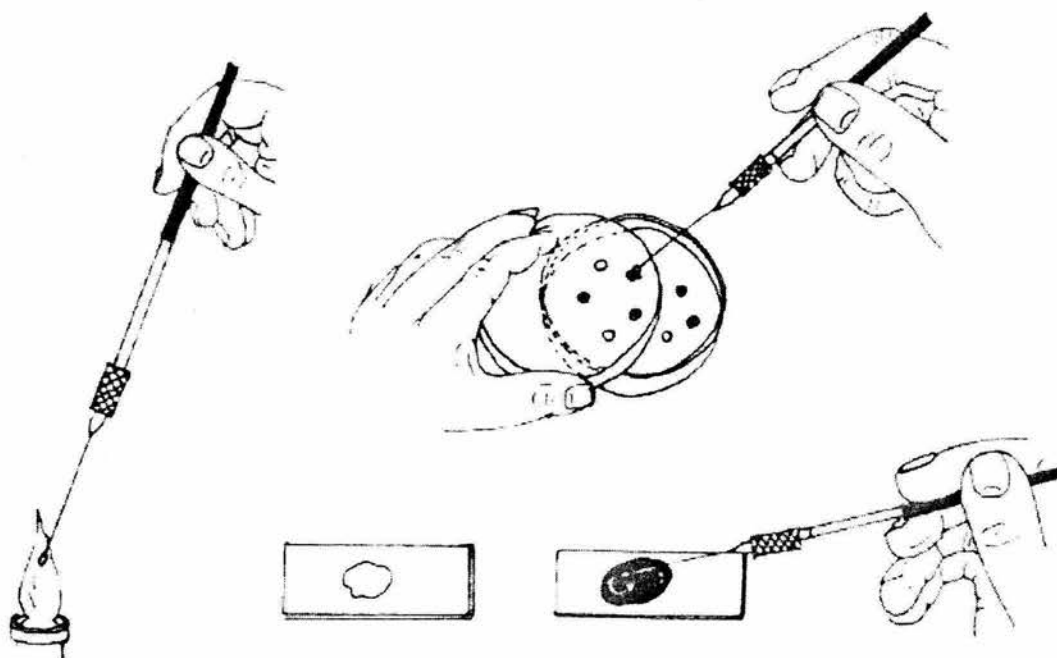


Fig. 3.4 Esquema de la realización del frotis bacteriano

Aunque existen muchas especies de bacterias diferentes, los organismos individuales presentan una de las tres formas generales siguientes:

- Elipsoidal o esférica (cocos)
- Cilíndrica o en forma de bastón (bacillus)
- Espiral o helicoidal

Para lograr la identificación de bacterias fue necesario realizar una tinción de gram para determinar que tipo y forma de bacteria es. La tinción de gram, la más empleada en bacteriología, es una tinción diferencial. Por este método se clasifican

las bacterias en dos grupos: gram positivos (Gram +, que en general poseen paredes gruesas de peptidoglucano) y las Gram negativas (Gram -), que contienen una fina capa de peptidoglucano), en función de su reacción frente a la coloración

Los dos grupos bacterianos que distinguen a esta técnica difieren en el color con el que finalmente aparecen. Las bacterias Gram (+) se tiñen de azul por el cristal violeta y no perderán esta coloración durante los pasos sucesivos. Las bacterias Gram (-) perderán la coloración inicial del cristal violeta en los siguientes pasos y se teñirán de rosa debido a la safranina.

Aplicación de técnicas alternativas de identificación de bacterias

La identidad de una especie requiere que se conozca de manera detallada su actividad bioquímica, porque otras características no son suficientemente distintivas o diferenciales. En general, el microorganismo se cultiva en medios que contienen una sustancia nutritiva específica o sustrato y después de la incubación el cultivo se examina para ver los cambios químicos que han ocurrido.

Las técnicas alternativas que se eligieron para la identificación de bacterias son API 20E (Analytical Profile Index) y BBL (Banque Bruxelles Lambert) Cristal para bacterias gram negativas y positivas respectivamente.

- **Sistema API**

El sistema de identificación API para bacterias Gram negativas, es una metodología rápida como estandarizada y miniaturizada de pruebas bioquímicas que se utilizan para la identificación de enterobacterias. Consiste de una tira de microtubos de material plástico, que contiene medios de cultivo deshidratados en los que se llevan a cabo 20 reacciones bioquímicas y seis pruebas complementarias. Los medios se rehidratan al inocular los microtubos con una suspensión bacteriana. Se incuban de 18 a 24 horas para que los microorganismos utilicen los sustratos y produzcan los metabolitos que permitan la identificación por cambios de coloración, que en algunas pruebas se desarrollan mediante la adición de reactivos. La identificación se obtiene a partir del perfil numérico, sumando los valores de las pruebas positivas. Para cada grupo se obtienen 7 cifras que corresponden a un perfil numérico el cual se encuentra en una lista de perfiles de la base de datos "Analytical Profile Index".

- **Sistema BBL Crystal**

El sistema BBL Crystal para la identificación de bacterias Gram positivas es un método de identificación en miniatura que utiliza sustratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos modificados. En general varios de los procedimientos

3. MARCO TEÓRICO

del equipo BBL crystal son modificaciones de métodos clásicos, incluyendo pruebas para la fermentación, oxidación, degradación y la hidrólisis de varios sustratos. El sistema BBL Crystal contiene 29 sustratos deshidratados y un control fluorescente, el inóculo de la prueba rehidrata los sustratos secos e inicia las reacciones de las pruebas. Después de un período de incubación de 18 a 24 horas, a una temperatura de 35 a 37 ° C se examinan las reacciones para determinar cambios de color o presencia de fluorescencia que resultan de las actividades metabólicas de los microorganismos. Las series de reacciones bioquímicas y enzimáticas de los 29 sustratos están almacenados en una base de datos electrónica.

4.0 METODOLOGÍA

La experimentación consistió en la instalación de 9 charolas con suelo contaminado con hidrocarburos y la aplicación de lodos provenientes de dos reactores alimentados con lodos de una planta de tratamiento Earth Tech México S.A. de C.V. que trata las aguas residuales de una refinería.

4.1 Ubicación del punto de muestreo

El suelo contaminado empleado en el experimento proviene de una zona de la Refinería Francisco I. Madero en Cd. Madero, Tamaulipas, en el Patio Norte de los tanques de almacenamiento. Los lodos que se utilizaron y aclimataron, provienen de la planta de tratamiento.

4.2 Caracterización fisicoquímica del suelo

Se definieron los siguientes parámetros que fueron determinados de acuerdo con normas aceptadas en el país, como se muestra en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Parámetros analizados para la caracterización del suelo

Parámetro	Método de Análisis
pH	AS-02 de la norma oficial mexicana NOM-021-RECNAT-2000
Fósforo disponible	Bray I para suelos ácidos a neutros AS-11, NOM-021-RECNAT-2000
Nitrógeno total	Kjeldahl norma mexicana del sector NMX-AA-024-1984
Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)	Extracción por soxhlet, Proy-NOM-138-SEMARNAT-2003
Contenido de Agua	AS-02 de la norma oficial mexicana NOM-021-RECNAT-2000
Densidad aparente	Método de la probeta (Domínguez, 1997)
Densidad real	Pícnómetro AS-04, NOM-021-RECNAT-2000
Fracción de carbono orgánico	Walkley & Black AS-07, NOM-021-RECNAT-2000

Determinación de la concentración de hidrocarburos

El análisis cuantitativo de Hidrocarburos Totales del Petróleo se obtuvo mediante una extracción del hidrocarburo por Soxhlet como se muestra en la Figura 4.1, con hexano como disolvente extractante durante 4 horas, y el residuo fue analizado mediante un cromatógrafo de gases, empleando el método EPA-8015 para fracción Diesel.

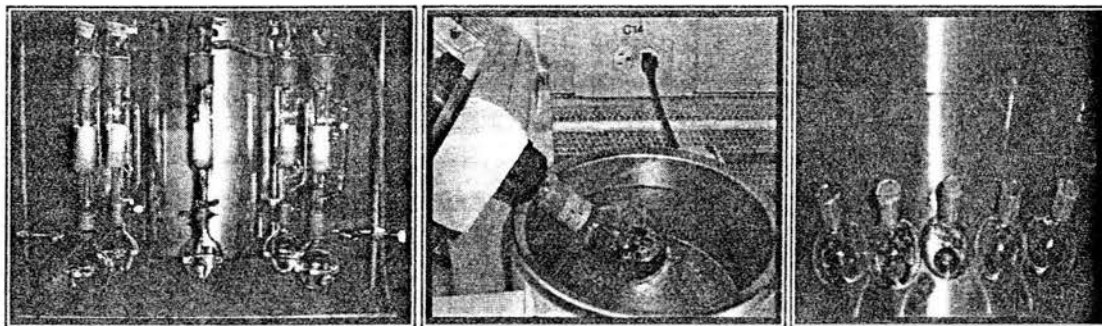


Fig. 4.1 Extracción soxhlet de hidrocarburos

4.3 Aclimatación de lodos y parámetros determinados

Para el trabajo experimental, se trasladaron lodos de la planta de tratamiento que trata las aguas residuales de la refinería Francisco I. Madero, al laboratorio del Instituto de Ingeniería. Los lodos se almacenaron en un contenedor de 50 L, las aguas residuales domésticas tienen un gran aporte de elementos como nitrógeno y fósforo, pero muchos residuos industriales son deficientes en uno y algunas veces en ambos elementos. Debido a estas limitaciones se empleó el agua de dilución, que es

utilizada en los análisis de DBO la cual compensa las deficiencias de los nutrientes necesarios para la actividad microbiana. El pH del agua de dilución puede variar entre 6.5 y 8.5 sin afectar la actividad de las bacterias heterótrofas. Se amortigua la solución mediante un sistema de fosfato a un pH aproximado de 7. Las sales de potasio, sodio, calcio y magnesio se agregan para dar capacidad de amortiguación y condiciones osmóticas adecuadas, también sirven para proporcionar a los microorganismos estos elementos que son necesarios para su crecimiento y metabolismo. El cloruro férrico, sulfato de magnesio y el cloruro de amonio aportan los requerimientos de azufre, hierro y nitrógeno. El sistema de amortiguamiento de fosfato suministra el fósforo que se pueda necesitar.

El agua de dilución se airea para saturarla con oxígeno antes de su aplicación y una solución de sacarosa con una concentración de 1 g/L como co-sustrato a fin de mantener vivos a los microorganismos.

Una semana después se colocaron dos reactores intermitentes (batch) como se puede observar en la Figura 4.2, con una capacidad de 10L, fabricados en material acrílico de 0.25x0.15x0.30 m de dimensiones, alimentados con los lodos del contenedor, en una dosis de 1 L cada 24 horas, en cada uno. En ambos reactores se instaló una entrada de aire continua controlada. Así mismo, se instalaron dos sedimentadores de 3 L de capacidad, uno para cada reactor, de los cuales se tomaron los lodos sedimentados para la experimentación en las charolas.

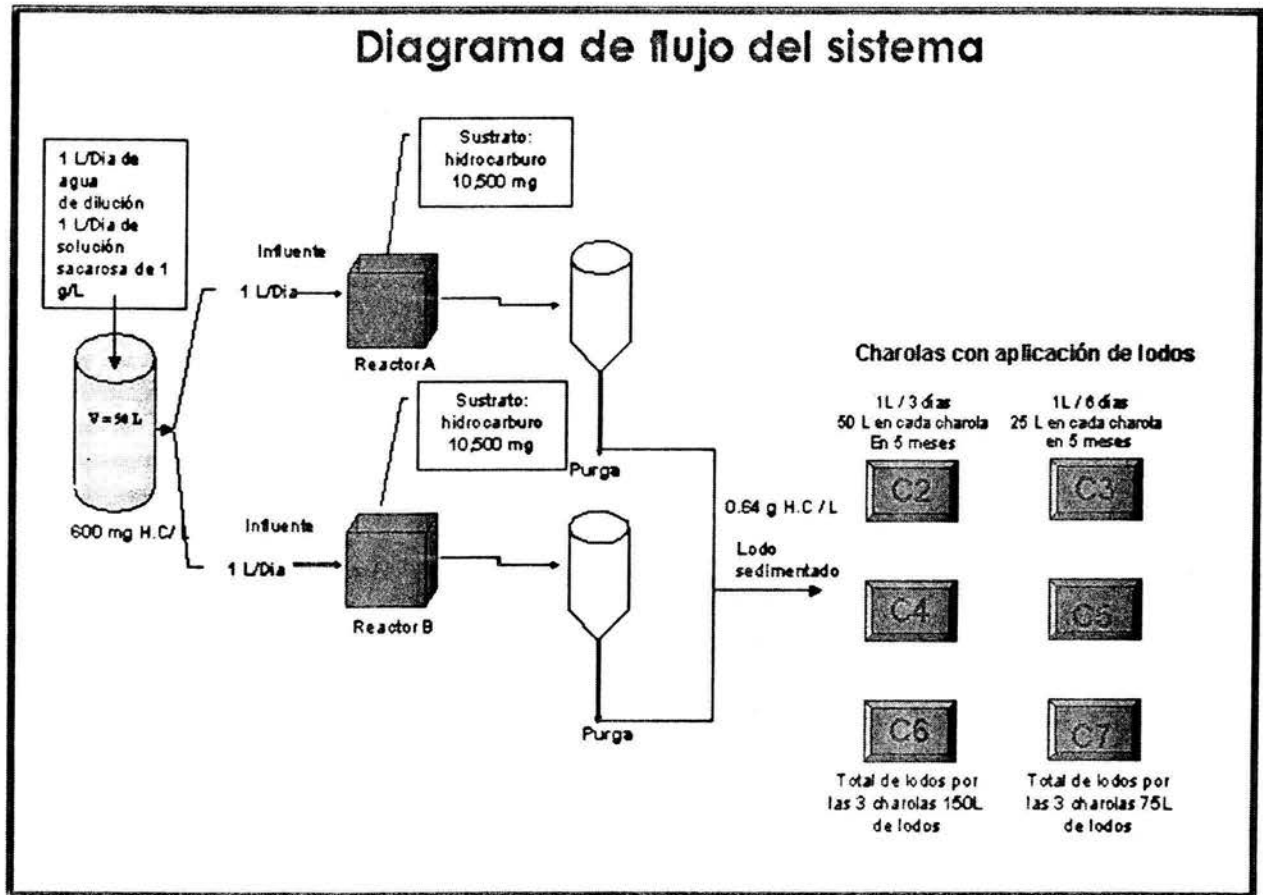


Figura 4.2 Esquema del sistema

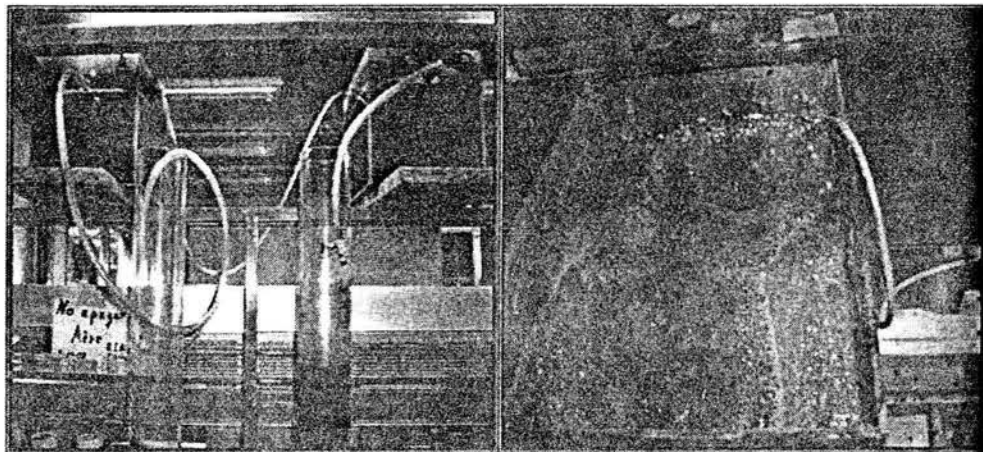


Figura 4.3 Reactores de lodos activados

A los reactores (Figura 4.3) se les aplicó además 200 g del mismo suelo contaminado al inicio de la aclimatación con el fin de adaptar los lodos con el residuo de hidrocarburo, se mantuvieron con un tiempo de retención celular de 72 horas.

También se aplicó agua de dilución diariamente y una solución de sacarosa 12 mg/L cada 72 horas, el cual es fácilmente biodegradable.

Los parámetros que se determinaron durante la aclimatación en los reactores fueron los siguientes:

Tabla 4.2 Parámetros determinados en la aclimatación de lodos

Parámetro	Frecuencia de análisis	Método de análisis
pH	Diario	NMX-AA-008-SCFI-2000
Temperatura	Diario	NMX-AA-007-SCFI-2000
Oxígeno disuelto	Diario	Electrodo de membrana (YSI)
Sólidos totales, totales volátiles	Diario	NMX-AA-034-SCFI-2001
Índice volumétrico de lodos	Diario	Método 230 C del Standard methods for the examination of water and wastewater, 1989

4.4 Instalación de charolas experimentales

Primera etapa

La primera etapa de la instalación de charolas experimentales, tuvo como finalidad probar si los lodos producidos en los reactores a partir de la alimentación con lodos de la planta de tratamiento eran capaces de degradar a los hidrocarburos del suelo contaminado. Esta prueba se realizó en tres charolas como se puede observar en la Figura 4.4, con 5 kg de suelo cada una, con una aplicación de 1L de lodos cada 72 horas, durante 18 días.

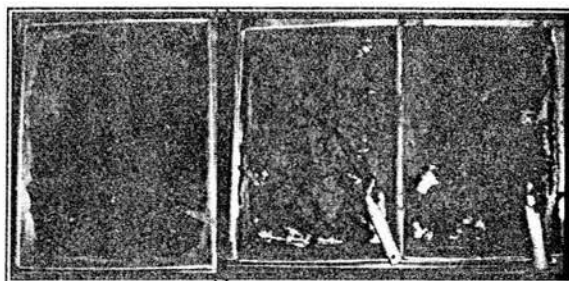


Fig. 4.4 Primera etapa de experimentación

Tabla 4.3 Esquema de primera etapa de experimentación

	TESTIGO	LODOS (1L / 72h)	
Suelo contaminado	Ch1	Ch2	Ch3
Conc. De hidrocarburos Inicial (mg/kg)	14,000	14,000	14,000

Las 3 charolas se instalaron previamente a la de las 9 charolas experimentales, siguiendo el esquema anterior de la Tabla 4.3, se nombraron las charolas como Ch1, Ch2 y Ch3 donde:

Ch1 es la charola del suelo testigo,

Ch2 y Ch3 son las charolas a las que se les aplicó 1 L de lodo cada 72 horas,

Los lodos aplicados a las charolas fueron extraídos de los sedimentadores de los reactores. Las charolas fueron aeradas manualmente con palas jardineras, para mantener oxigenados los lodos.

Los resultados que se obtuvieron en esta prueba, muestran una eficiencia de degradación alta, por lo que se decidió emplear la misma dosis e una segunda etapa de experimentación la cual consta de 9 charolas experimentales con 2 diferentes aplicaciones de lodos.

Segunda etapa

Para la instalación de la segunda etapa de experimentación de charolas, se pesaron 5 kg de suelo y se identificaron como C1 al C9, como se muestra en la Tabla 4.4 y se observa en la Figura 4.5

Tabla 4.4 Esquema de segunda etapa de instalación de charolas

suelo	Aplicación de lodos		
	Dosis 1 (sin lodos)	Dosis 2 1L / 3 días	Dosis 3 Lodos 1L / 6 días
suelo contaminado	C1	C2	C3
Contaminado + Nutrimentos	C4	C5	C6
Contaminado + Tensoactivo	C7	C8	C9

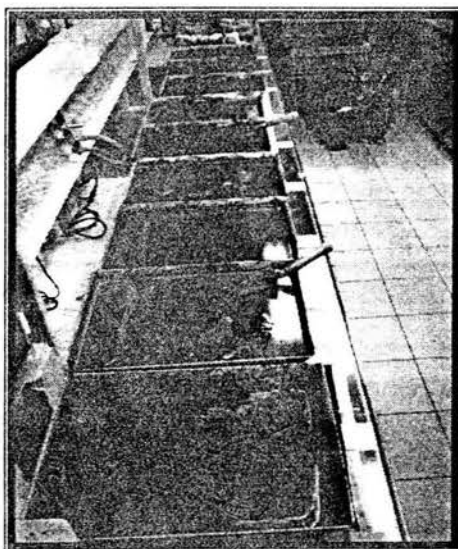


Fig. 4.5 Instalación de charolas experimentales en el laboratorio del Instituto de Ingeniería

Las charolas experimentales se alimentaron con tres dosis de lodos de la siguiente forma:

Dosis 1: Suelo sin adición de lodo

Dosis 2: Suelo al que se aplicó 1 L de lodo cada 3 días

Dosis 3: Suelo al que se aplicó 1 L de lodo cada 6 días

Y se les aplicó los siguientes tratamientos :

Suelo testigo (C1)

Suelo contaminado con lodos (C2, C3)

Suelo contaminado con nutrientes (C4, C5, C6)

Suelo contaminado con tensoactivo (C7, C8, C9)

La dosis 3 se eligió considerando la mitad del volumen de la dosis 2 con el objeto de observar si esta proporcionaba la misma eficacia al tratamiento, y así aplicar un volumen menor de lodos.

4.5 Aplicación de nutrientes

Con base a la relación de C/N/P en la relación correspondiente 100:10:1 y con los resultados del análisis de las cantidades presentes de estos nutrientes en el suelo que se trató, se calcularon los requerimientos de ellos, el 80% de hidrocarburo como base de carbono y el nitrógeno y fósforo fueron proporcionados mediante la aplicación de Sulfato de Amonio y Triple 17 así nombrado por la proporción del 17% de los compuestos de N total, P_2O_5 (superfosfato) y potasio en (K_2O), aplicando 10.3 g de Triple 17 en las charolas C4, C5 y C6 y 72 g de Sulfato de amonio.

4.6 Aplicación de tensoactivo

El tensoactivo se seleccionó de acuerdo con los resultados del estudio de Torres, et al., en el cual se obtuvo una eficiencia de remoción de hidrocarburos del 80 % en el suelo. Fué evaluado según sus propiedades de balance hidrofílico-lipofílico (BHL) y su concentración micelar crítica (CMC). Dicho tensoactivo es un nonil fenol etoxilado con nombre comercial de emulgin-W600 con un BHL de 11 y una CMC de 30.03 mM. Para la aplicación de tensoactivo se preparó una solución de 1L al 0.4% y se aplicó a las charolas al inicio de la experimentación en charolas C7, C8 y C9.

Todas las charolas experimentales fueron aeradas manualmente mediante palas jardineras.

4.7 Bacterias degradadoras de hidrocarburos

4.7.1 Cuenta heterótrofa de bacterias

La cuenta de bacterias se realizó de la siguiente manera:

Se prepara agua de dilución con 1 gr de peptona de caseína en 1L de agua estéril, para realizar una serie de 10 diluciones por cada muestra, se toma 1 g de muestra

de suelo y se inocula en un tubo de ensaye que contiene 9 mL de agua de dilución. De esta primer dilución (10^{-1}) se tomó 1 mL con una pipeta estéril y se transfirió a otro tubo con 9 ml de agua de dilución (10^{-2}), se continuó haciendo diluciones decimales hasta una concentración de 10^{-9} . De cada serie de diluciones se inoculó 0.1 mL de cada dilución (10^{-1} – 10^{-9}) en cajas petri con medio "cuenta en placa" mediante la técnica de diseminación en placa, la cual consiste en dispersar uniformemente el inóculo sobre el medio sólido con una varilla de vidrio estéril en forma de "L". Posteriormente se incubaron en forma invertida a 27 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo, se realizó el conteo en placa, determinando así las unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g) de bacterias, según la ecuación siguiente (SSSA, 1994):

$$\text{UFC/g}_{\text{suelo}} = \frac{\text{No.Colonias}}{\text{Dilución} * \text{Volumen de muestra añadido}} \dots\dots\dots (6)$$

4.7.2 Selección y aislamiento de bacterias degradadoras de hidrocarburos

El aislamiento de microorganismos hidrocarbonoclastas se efectuó a partir de las colonias obtenidas por dilución en placa. Para ello se seleccionaron las colonias más representativas, es decir, las que se formaron en mayor número sobre las placas.

Se tomaron cada una de las colonias seleccionadas y se identificaron según sus características tales como, forma, tamaño, color, margen, elevación, superficie y consistencia. Estas fueron sembradas en repetidas ocasiones para lograr su purificación.

Una vez que se obtuvieron cultivos puros, se procedió a su caracterización mediante una tinción de Gram, la cual nos permitió clasificar las bacterias en Gram positivas y Gram negativas. La identificación se realizó mediante las técnicas alternativas de identificación BBL cristal para bacterias Gram positivas y API 20E para bacterias Gram negativas, como se puede apreciar en las Figuras 4.6 y 4.7.

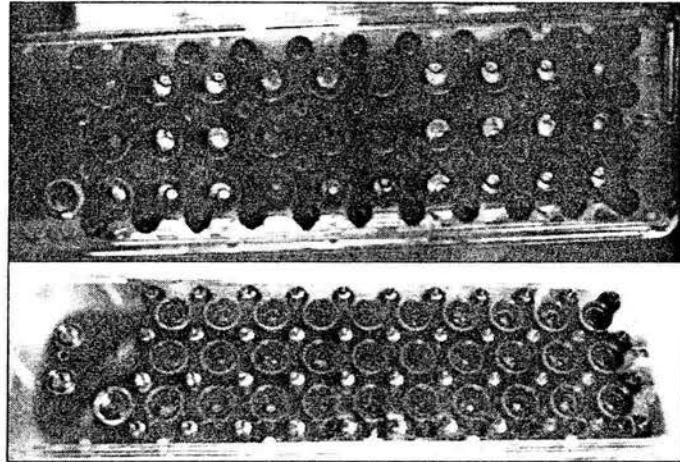


Fig. 4.6 Sistema BBL Cristal para identificación de bacterias Gram positivas

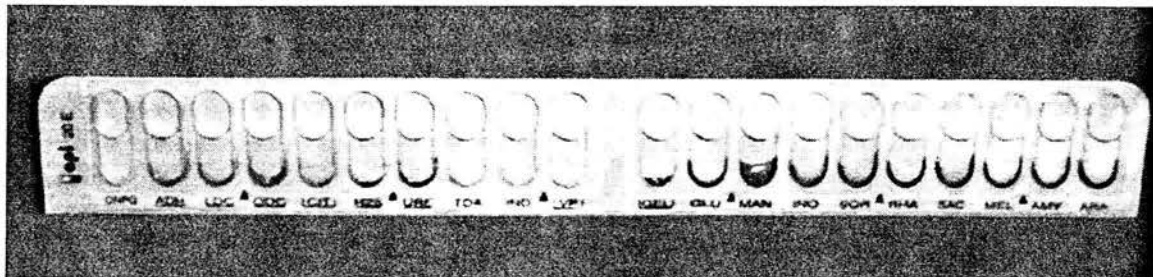


Fig. 4.7 Sistema API para identificación de bacterias Gram negativas

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Propiedades fisicoquímicas del suelo

En la Tabla 5.1 se aprecian los resultados de los parámetros medidos del suelo cuya caracterización tuvo como finalidad conocer los requerimientos del mismo, y así obtener las condiciones adecuadas para su tratamiento. El pH adecuado para el trabajo eficiente de los microorganismos es cercano al neutro por lo que no hubo necesidad de ajustarlo. En la determinación de nutrimentos no se detectó presencia de nitrógeno, lo cual se relaciona con el porcentaje de materia orgánica que fue de 1.13 el cual es un porcentaje bajo, y es indicativo de que el suelo se encuentra intemperizado. No obstante sucede lo mismo con el fósforo disponible, en el que se obtiene un valor de 88 mg/kg y es considerado alto para suelos fértiles (Reyes, 1996).

El contenido de agua para un tratamiento biológico sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrimentos son movilizados, en este caso el valor es 8.7% el cual es adecuado ya que según Barry (1992), menciona que el contenido de agua óptimo para la biorremediación debe encontrarse entre un 10 y un 20 por ciento.

Tabla 5.1 Propiedades del suelo

Parámetro	Valor
pH	7.1
Densidad Real	2.30 g/cm ³
Densidad Aparente	0.7021g/cm ³
Fósforo Disponible	88 mg/Kg
Nitrógeno Total	207 mg/kg
% carbono Orgánico	0.6569
% Materia Orgánica	1.13
Contenido de Agua	8.7%
HTP fracción diesel	12 , 000 mg/kg
UFC/g	1200

5.2 Determinación de la concentración de hidrocarburos

La concentración inicial de hidrocarburos fracción diesel que se obtuvo fue de 14,000 mg/kg. La norma NOM-EM-138-ECOL-2002 establece como límite permisible 2,000 mg/kg, para un suelo industrial, por lo cual se puede apreciar el grado de contaminación del sitio de estudio.

5.3 Aclimatación de lodos

Para mantener los lodos en actividad, se realizó su caracterización, empleando para ello las pruebas que se muestran en la Tabla 5.2, en la cual los resultados representan los valores mínimos y máximos de 150 datos de haber realizado diariamente los análisis.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5.2 Parámetros determinados en la aclimatación de lodos

Muestra	pH	Temp. °C	Sólidos Totales mg / L	IVL mL/g
Alimentación	6-7	16 -20	12 000 – 12 900	80.8 - 75
Reactor A	6 - 7	16 -20	11 700 – 12 000	83.7-81.6
Sedimentador A	6 - 7	16 -20	9 000-11900	
Reactor B	7 – 7.5	16 -20	11, 700- 12,000	84.6-82.5
Sedimentador B	6.5-7.5	16 -20	9 000-11900	
Muestra	SSV mg/L	OD mg/L	UFC/g	
Alimentación	4000-5000	5.5	1.90E+06	
Reactor A	4500-5400	6.0	3.00E+08	
Reactor B	4700-5780	6.0	4.00E+07	
Sedimentador	6000		1.02E+09	

Donde:

SSV = Sólidos suspendidos volátiles mg/L

OD = Oxígeno disuelto mg/ L

UFC/ g= Unidades formadoras de colonias por gramo

Tabla 5.3 Contenido de fósforo, nitrógeno y UFC's en lodos

Parámetro	Valor
Fósforo total	6 mg/L
Nitrógeno total	90 mg/L
UFC/ml	9.0 E10 ⁶
Concentración de hidrocarburos en lodos	600 mg/kg

Así mismo el pH se mantuvo cercano a la neutralidad por ser una condición para el crecimiento microbiano. Las bacterias generalmente pueden desarrollarse en un intervalo óptimo de temperatura. En este caso, se mantuvieron a una temperatura ambiente que osciló entre los 16 y los 29 °C. Es importante señalar que a temperaturas inferiores y cuando se trata de la presencia de hidrocarburos, estos, tienden a ser menos solubles y por lo tanto su biodisponibilidad se reduce.

La producción de biomasa fue constante, de tal forma que al ser aplicados en las charolas experimentales, se presentaran valores similares con el objeto de no tener una variable más para la degradación en cada experimento. Los lodos formados en los reactores biológicos contribuyeron en el valor de sólidos y en el índice

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

volumétrico de lodos. Estos factores como ya se ha mencionado, son importantes, ya que representan una medida de la estabilidad de microorganismos presentes en los reactores, como se aprecia en la Tabla 5.2.

En cuanto a los valores de oxígeno disuelto, estos fueron adecuados, ya que durante la operación de los reactores, se suministró aire en forma continua, de tal manera que el oxígeno disuelto fuera suficiente para que se llevara a cabo el proceso aerobio por las bacterias en un valor de 5.5 mg / L.

El análisis de conteo en placa de bacterias heterótrofas en los lodos, se realizó antes de la aplicación en el suelo contaminado a tratar, y se obtuvieron valores favorables para la biodegradación del hidrocarburo de 9.0 E⁶ UFC/ml.

5.4 Primera etapa de experimentación

En la Tabla 5.4 se pueden apreciar los resultados, que indican la existencia de una remoción de hidrocarburos considerable.

La primer etapa de experimentación, fue de utilidad para la aplicación de lodos en las siguientes 9 charolas, en las cuales se consideraron dos dosificaciones de lodos y condiciones estimulantes a la degradación del contaminante.

Tabla 5.4 Concentración de Hidrocarburos en la primer etapa de tratamiento

	Concentración hidrocarburos (mg/kg)		
	Testigo	Adición Lodos 1L/3 d	
SUELO contaminado	Ch1	Ch2	Ch3
CONC. INICIAL	14,000	14,000	14,000
15 DIAS	10,668	3,607.6	5,884
18 DIAS	7,800	3,523	5,464

Donde:

Ch1= Charola 1 ; Ch2= Charola 2; Ch3= Charola 3

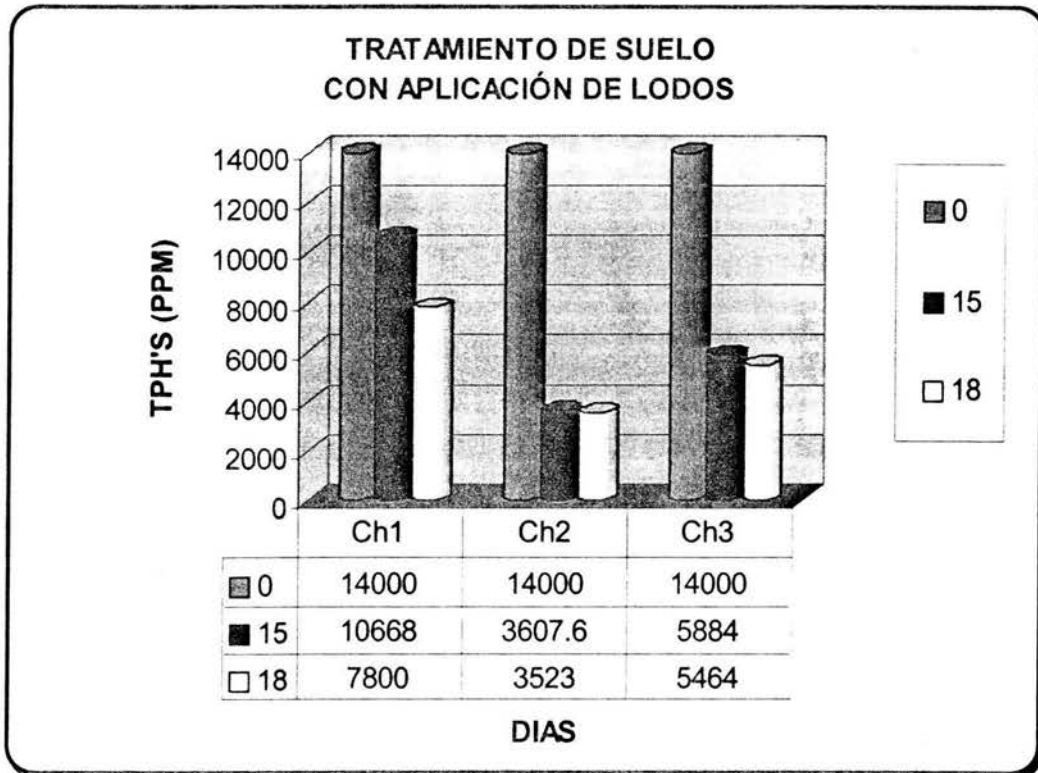


Fig. 5.1 Degradación de hidrocarburos en la primera etapa de tratamiento

Los resultados de esta prueba muestran una eficiencia de degradación del 42 al 72 por ciento al aplicar los lodos con una dosis de 1L cada 3 días, debido a este resultado se tomó la decisión de instalar la segunda etapa de experimentación aplicando la misma dosis probada en la experimentación anterior.

5.5 Segunda etapa de experimentación

En la Tabla 5.3 se presentan los datos de los nutrientes que se obtuvieron del análisis de los lodos para la determinación de nitrógeno y fósforo, con la finalidad de proporcionar los nutrientes faltantes en las charolas experimentales ya que los valores obtenidos fueron 6 mg/L de P y 90 mg/L de N los cuales no fueron suficientes para la aplicación en las charolas según la relación (100:10:1) de carbono, nitrógeno y fósforo, se realizó el cálculo para agregar dicho faltante de nutrientes con la aplicación de Sulfato de Amonio y Triple 17, los cuales contienen el 23% de N y 17% de Fósforo respectivamente.

Cálculo para la aplicación de nutrimentos

Carbono total = 45,000 mg/kg (0.8) = 36,000 mg/kg
 Relación C:N:P = 100:10:1
 N necesario = (36,000mg/kg) x (10/100) = (3600 – 300) mg/kg = 3300 mg/kg
 P necesario = (36,000mg/kg) x (1/100) = (360 – 6)mg/kg= 354 mg/kg
 Contenido de suelo = 5 kg
 Fuente de fósforo = Triple 17 (17% P)
 Fuente de nitrógeno = Sulfato de Amonio (23% N)

 Fósforo requerido = 354 mg/kg x 5 kg suelo = 1770 mg * (100/17)=**10,411 mg**
 Nitrógeno requerido = 3300 mg/kg x 5 kg suelo = 16500mg * (100/23) = **71,739 mg**

La aplicación de estos nutrimentos se efectuó en las charolas C4, C5 y C6.

El proceso de degradación tuvo una duración de 5 meses, obteniendo los resultados que se aprecian en la Tabla 5.5 y donde se muestran una considerable reducción del contaminante en sus distintos tratamientos y dosis de lodos aplicados.

Tabla 5.5. Concentración de hidrocarburos de la segunda etapa de experimentación

Suelo (5 kg)	Dosis 1	Dosis 2(1L/ 3 días)	Dosis 3 (1 L/6días)
	Concentración de Hidrocarburos en la fracción diesel (mg/kg)		
+ contaminado 14,000 ppm	9050	4167	4866
+ Nutrimentos relación (100:10:1)	7246	5214	5782
+ Tensoactivo 0.4 %	3755	3971	4571

Con el objeto de observar la existencia de una mayor degradación con el tiempo, el experimento de la segunda etapa fue considerablemente más grande que en la experimentación de la primera y comparando los resultados, en ambas se llegan a concentraciones similares por lo que se puede expresar que la prolongación del tratamiento no tiene efecto significativo.

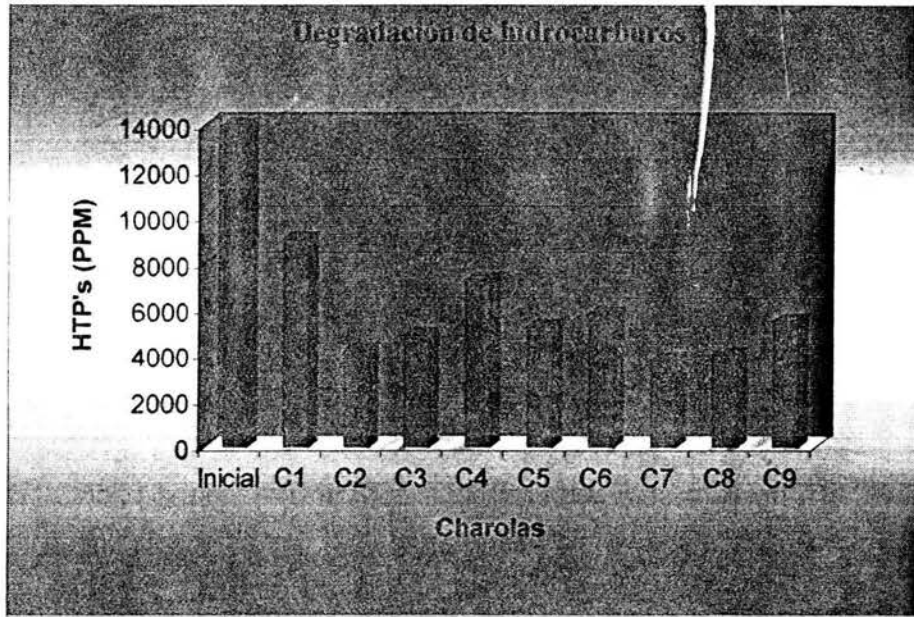


Fig. 5.2 Degradación de hidrocarburos después del tratamiento de la segunda etapa

Los porcentajes de degradación obtenidos con respecto a la concentración inicial son los mostrados en la Tabla 5.6, el orden en que aparecen en la tabla son las charolas del mejor al menor resultado que se obtiene al tratamiento aplicado.

Tabla 5.6 Porcentaje de degradación en las charolas de la segunda etapa

Charola	Porcentaje de degradación	Características
C7	73	Dosis 1 (sin lodos)+ tensoactivo
C8	72	Dosis 2 lodos+tensoactivo
C2	70	Dosis 2 lodos
C9	67	Dosis 3 lodos+tensoactivo
C3	65	Dosis 3 lodos
C5	63	Dosis 2 lodos+nutrimentos
C6	50	Dosis 3 lodos+nutrimentos
C4	48	Dosis 1 (sin lodos)+nutrimentos
C1	35	Dosis 1 sin lodos (testigo)

Donde:

Dosis 1 = sin aplicación de lodos y no se le aplica ningún tratamiento (testigo)

Dosis 2 = aplicación de lodos 1L /3 días

Dosis 3 = aplicación de lodos 1L / 6 días

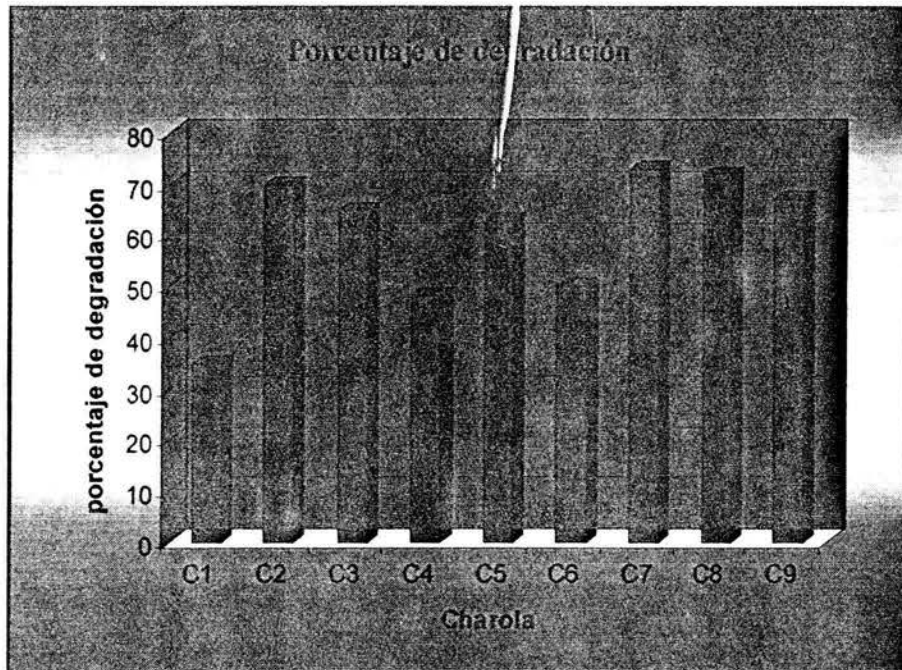


Fig. 5.3 Porcentaje de degradación de hidrocarburos en las charolas

Los resultados de la Figura 5.3 indican que en la charola testigo C1 a la cual no se le aplicaron lodos y únicamente permaneció con aireación, tuvo la menor eficiencia de remoción (35 %) como era de esperarse. Asimismo se observa que cuando no se aplicaron lodos y solamente se aplicó tensoactivo (C7), se obtuvo la mayor remoción de hidrocarburos (73 %), es decir, que la biodegradación es llevada a cabo con los microorganismos nativos del suelo contaminado. En las charolas en las que se les aplicó lodos y tensoactivo (C8 y C9) también tienen una mejor remoción de hidrocarburos del 67 y 72% siendo este el mejor tratamiento, aquí el tensoactivo está ayudando a biodisponer el contaminante a los microorganismos para efectuar la degradación.

Respecto a la aplicación de lodos en las diferentes dosis aplicadas, la remoción fue ligeramente mayor cuando la concentración es la de la dosis 2 (1L/ 3 días) que para la dosis 3 (1L / 6 días); es decir, la frecuencia de aplicación de lodos cada 3 días presenta mejores resultados mas sin embargo no son significativas.

Un tensoactivo, puede ser utilizado en forma preliminar o simultánea a los procesos de remediación y es recomendable para la desorción de hidrocarburos en altos niveles de concentración. Dependiendo de la formulación química particular, los tensoactivos pueden provocar una movilización física de los contaminantes, por un mecanismo de solubilización, por esta razón, al aplicar el tensoactivo a las charolas

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

C7, C8 y C9 el comportamiento fisicoquímico del suelo se ve afectado mejorando la biodisponibilidad del contaminante al haber sido solubilizado.

El objetivo de este trabajo fue el probar si la aplicación de lodos disminuían la concentración de hidrocarburos, lo cual se logró, sin embargo; considerando los resultados de la experimentación de la primer etapa en donde se muestra que en 18 días de aplicación la disminución del contaminante había logrado más del 50 % se puede decir que la aplicación de lodos como una alternativa de biorremediación resulta efectiva.

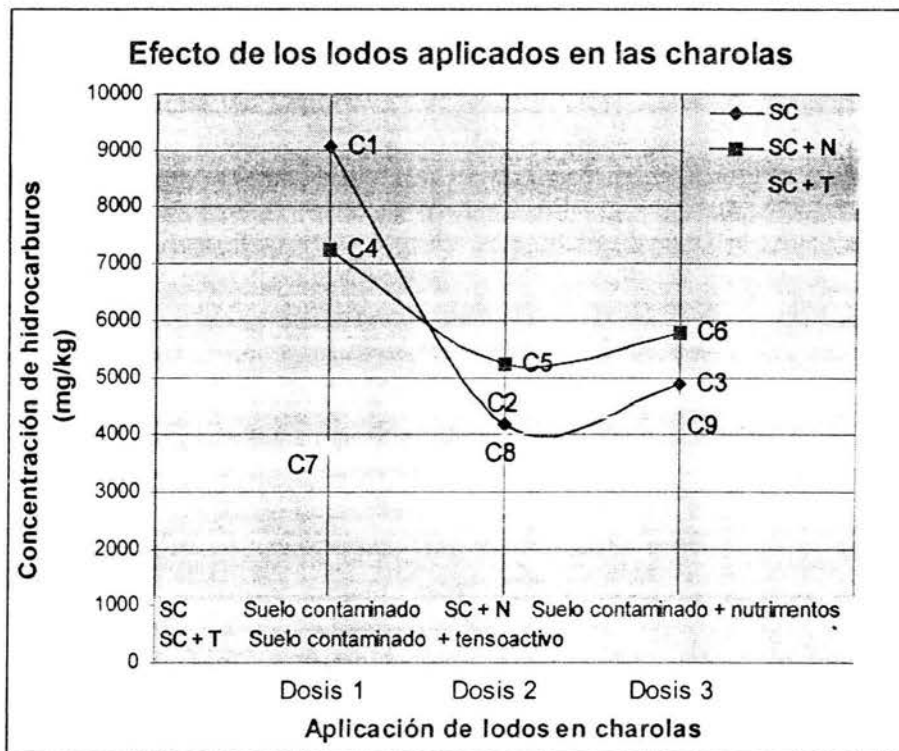


Fig.5.4 Efecto de los tratamientos con la aplicación de lodos

La comparación de los bloques de la Tabla 5.5, es decir las filas con las columnas del sistema de experimentación realizado, es muy importante ya que de esta forma podemos establecer la efectividad de los tratamientos, así como de la aplicación de los lodos. Dado que los resultados de la concentración de hidrocarburos son del mismo orden de magnitud la comparación siguiente se basa en las Figuras 5.4 y 5.5.

En la Figura 5.4 se muestra el resultado del efecto de la aplicación de lodos en las tres dosis, como se puede apreciar, en las charolas C1, C4 y C7 representa la aplicación de dosis 1 la cual sirvió para mantener las charolas como testigos de la

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

aplicación de lodos, mostrando de esta forma la eficacia de los lodos aplicados, de esta manera, el bloque que mejor resultado tuvo respecto a la menor concentración de hidrocarburos fue la dosis 2 con aplican de 1L / 3 días en las charolas C2, C5 y C8 con una concentración de 4167, 5214, 3971mg de hidrocarburo / kg de suelo.

En la Figura 5.5 se puede apreciar la comparación de los tratamientos, las charolas C1, C2 y C3 representan los testigos (blancos) de la aplicación de nutrientes y tensoactivo.

El mejor bloque en esta comparación es el tratamiento en el que se aplicó tensoactivo en las charolas C7, C8, y C9 las que representan la menor concentración de hidrocarburos por kilogramo de suelo (3755, 3971, 4571 mg/kg) como se puede ver en la Figura 5.5.

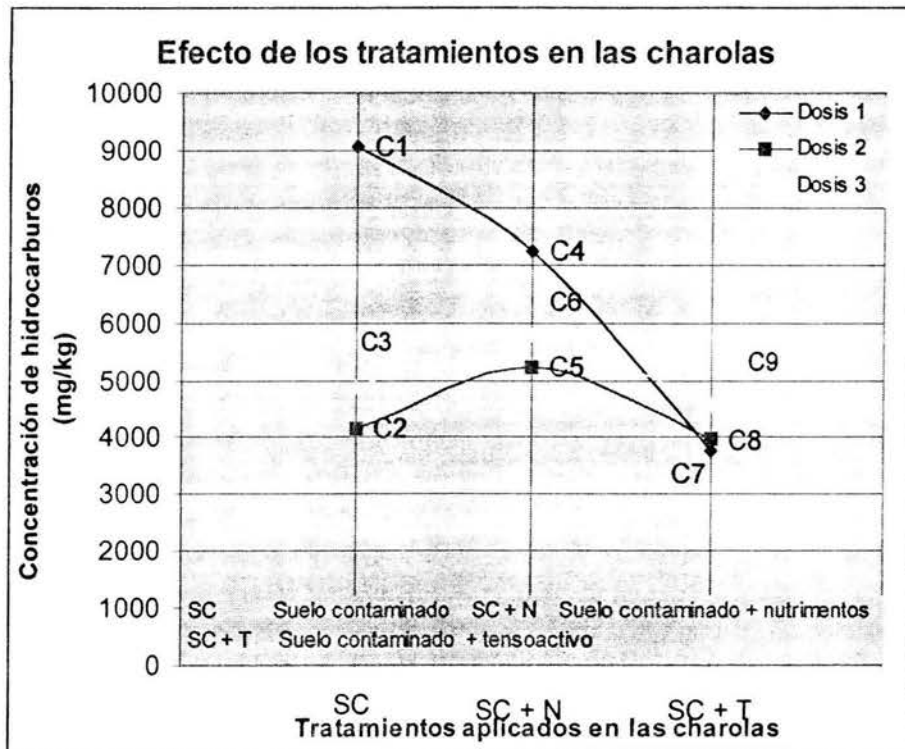


Fig. 5.5 Efecto de la aplicación de lodos y tratamientos del suelo

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.6 Balance de materia de hidrocarburos en el sistema

Tabla 5.7 Balance de materia de hidrocarburos en el sistema.

Concentración de hidrocarburos en los lodos del contenedor	600 mg H.C / L
Concentración de hidrocarburos en el suelo tratado	14,000 mg / kg
Volumen total de lodos empleado en la aplicación de charolas	225 L
Kilogramos de suelo en cada charola experimental	5 Kg
Concentración de hidrocarburos en los reactores 3 aplicaciones de 250 g de suelo con hidrocarburos 0.750 kg suelo * 14 000 mg / kg hidrocarburos aportados por lodos del contenedor 600 mg H.C / L * 225 L lodos	750 g suelo 10 500 mg de H.C 135 000 mg de H.C
Total de hidrocarburos en los reactores	145 000 mg de H.C
Concentración de hidrocarburos total 145 g de H.C / 225 L lodos	0.6444 g de H.C / L
Volumen total aplicados en las charolas experimentales C2, C5 y C8 Dosis 2 (1 L / 3 días) * 150 días de experimentación Concentración de hidrocarburos 0.64g H.C x 50 L Gramos de hidrocarburos en las charolas 14 g H.C /suelo x 5 kg Total de hidrocarburos por cada charola en la entrada	50 L 32 g de H.C 70 g de H.C 102 g de H.C
Volumen total aplicados en las charolas experimentales C3, C6 y C9 Dosis 3 (1 L / 6 días) * 150 días de experimentación Concentración de hidrocarburos 0.64g H.C x 25 L Gramos de hidrocarburos en las charolas 14 g H.C /suelo x 5 kg Total de hidrocarburos por cada charola en la entrada	25 L 16 g de H.C 70 g de H.C 86 g de H.C

	Concentración de hidrocarburos al final del proceso					Hidrocarburo removido por los tratamientos		
	mg/kg	kg de suelo	=	mg H.C	g H.C final	g H.C inicial	g H.C removido	% H.C removido
Dosis 2								
C2	4167	5	=	20835	20.835	102	81.165	79.57
C5	5214	5	=	26070	26.07	102	75.93	74.44
C8	3971	5	=	19855	19.855	102	82.145	80.53
Dosis 3								
C3	4866	5	=	24330	24.33	86	61.67	71.70
C6	5782	5	=	28910	28.91	86	57.09	66.38
C9	4571	5	=	22855	22.855	86	63.145	73.42

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resumen de la tabla anterior mostrado, se trata de un balance de materia de los hidrocarburos aplicados en las charolas experimentales, del cual se obtiene la masa de hidrocarburos removidos en el sistema aún con la aportación de los lodos provenientes de la planta de tratamientos, también muestra los porcentajes de remoción para las charolas a las que se les aplicó lodos como tratamiento, de este resultado se confirma nuevamente la eficacia del tratamiento de la dosis 2 de lodos aplicada como es el caso de las charolas C2, C5 y C8 que tuvieron un porcentaje de remoción del 79.5, 74.4 y 80.53 respectivamente.

5.7 Cuenta en placa de bacterias

Se realizó cuenta heterótrofa en el suelo de las 9 charolas, se realizaron 4 muestreos durante el tratamiento, la primera fue al iniciar el tratamiento, el segundo muestreo se efectuó a la primer aplicación de lodos, el siguiente a la mitad del proceso y el cuarto al final del mismo.

Los resultados se pueden apreciar en las tablas siguientes:

Tabla 5.8 Cuenta en placa inicial de bacterias en charolas (muestreo 1)

Cuenta en placa inicial de bacterias UFC/g			
Tratamiento	Dosis 1	Dosis 2 (1L / 3 d)	Dosis 3 (1L/6d)
Suelo	1200	1200	1200
Suelo+Nutrimentos	1200	1200	1200
Suelo+Tensoactivo	1200	1200	1200

Tabla 5.9 Cuenta en placa de bacterias en charolas (muestreo 2)

Cuenta en placa muestreo 2 de bacterias UFC/g			
Tratamiento	Dosis 1	Dosis 2 (1L / 3 d)	Dosis 3 (1L/6d)
Suelo	6.00E+05	8.00E+05	2.00E+05
Suelo+Nutrimentos	9.30E+04	7.00E+06	4.00E+05
Suelo+Tensoactivo	9.00E+06	2.60E+06	6.70E+06

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5.10 Cuenta en placa de bacterias en charolas (muestreo 3)

Cuenta en placa muestreo 3 de bacterias UFC/g			
Tratamiento	Dosis 1	Dosis 2 (1L / 3 d)	Dosis 3 (1L/6d)
Suelo	5.00E+09	1.24E+09	7.00E+08
Suelo+Nutrientes	1.00E+07	6.00E+06	3.00E+06
Suelo+Tensoactivo	5.00E+07	5.00E+06	3.00E+07

Tabla 5.11 Cuenta en placa final de bacterias en charolas (muestreo 4)

Cuenta en placa final (muestreo 4) de bacterias UFC/g			
Tratamiento	Dosis 1	Dosis 2 (1L / 3 d)	Dosis 3 (1L/6d)
Suelo	3.97E+06	8.02E+07	8.13E+05
Suelo+Nutrientes	1.98E+03	2.19E+06	2.52E+05
Suelo+Tensoactivo	2.09E+03	7.24E+06	6.56E+04

Los resultados de las Tablas 5.8 a la 5.11 presentan el crecimiento bacteriano en cada muestreo durante el tratamiento del suelo contaminado, los cuales nos servirán como herramienta de análisis mostrándolos gráficamente.

Se realizó un gráfico por tratamiento y por aplicación de dosis de lodos, en la Figuras 5.6, 5.7 y 5.8 se observa el grafico de los diferentes tratamientos aplicados en el suelo, y en las Figuras 5.9, 5.10 y 5.11 son las diferentes aplicaciones de lodos.

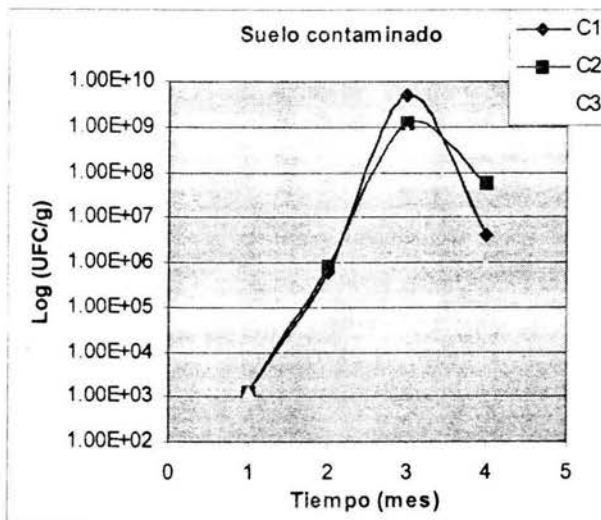


Fig. 5.6 Crecimiento de la población microbiana Con el tratamiento de aplicación de lodos

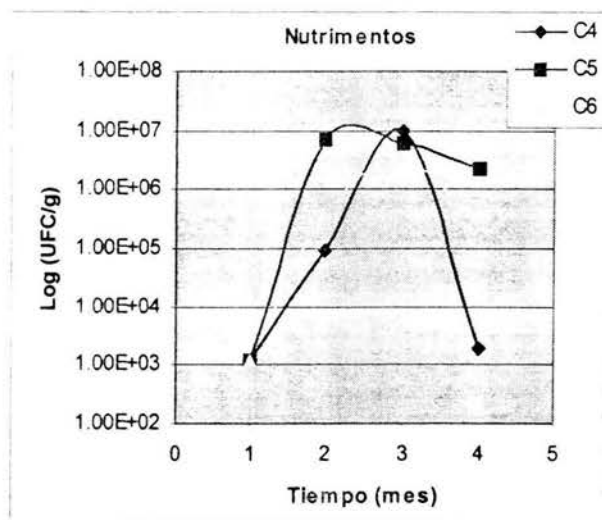


Fig. 5.7 Crecimiento de la población microbiana Con el tratamiento de aplicación de nutrientes y lodos

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

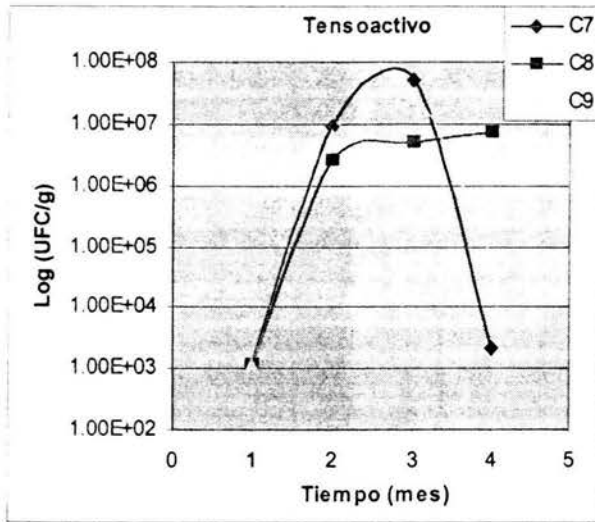


Fig. 5.8 Crecimiento de la población microbiana con el tratamiento de aplicación de lodos y tensoactivo

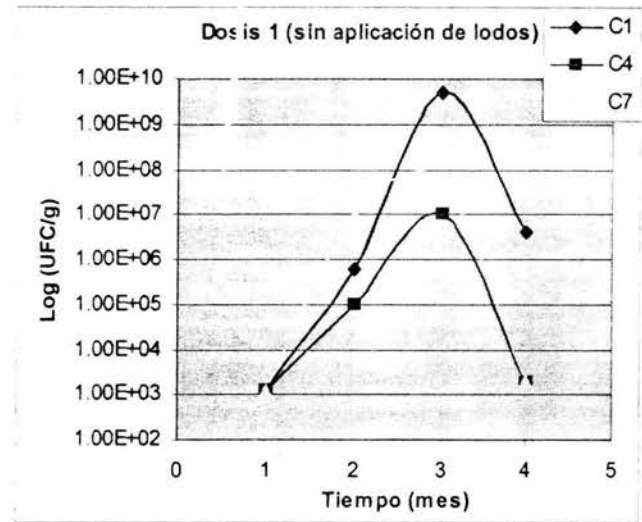


Fig. 5.9 Crecimiento de la población microbiana con aplicación de Dosis 1 (sin aplicación de lodos)

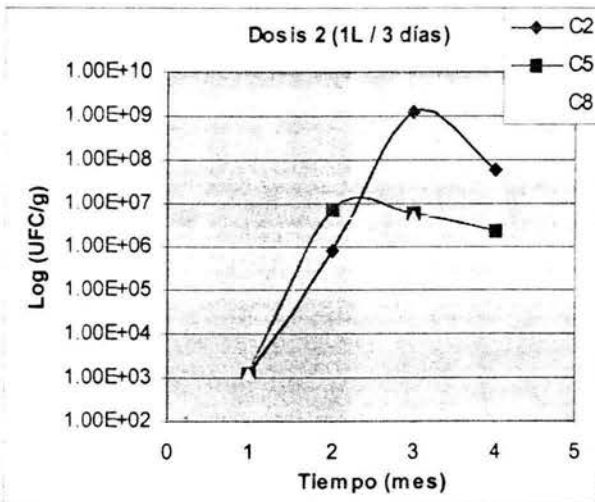


Fig. 5.10 Crecimiento de la población microbiana con el tratamiento de aplicación de Dosis 2 de lodos (1L / 3 días).

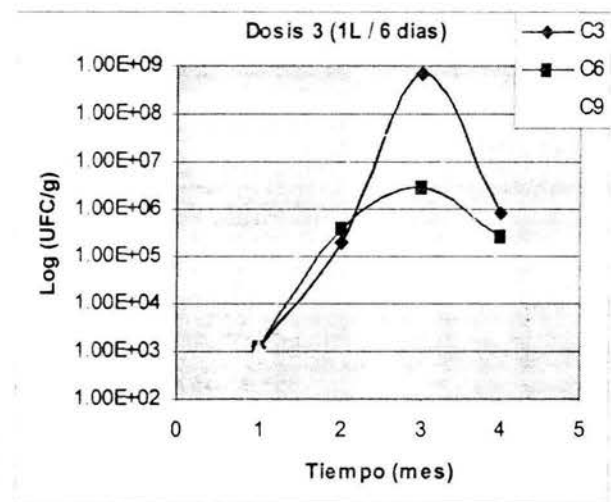


Fig. 5.11 Crecimiento de la población microbiana con el tratamiento de aplicación de Dosis 3 de lodos (1L / 6 días).

Como se puede apreciar en los gráficos, en todos los tratamientos presentan un crecimiento bacteriano notable e incluso en las charolas en que no se les aplicó lodos, como era de esperarse en los muestreos 2 y 3 en los cuales la mayor cantidad

de microorganismos se presentan debido a la adaptación del sustrato en el suelo, en el último muestreo las posibilidades de crecimiento fueron menores y esto se debe a que se dejó de aplicar las dosis de lodos al igual que fue perdiéndose humedad en las charolas.

En la Figuras 5.6 y 5.8 que corresponden a los tratamientos de aplicación de tensoactivo y suelo contaminado con aplicación de lodos, son los datos graficados que muestran mejor crecimiento de microorganismos el cual justifica la mayor remoción de hidrocarburos con la aplicación de tensoactivo como se mostró en la Figura 5.5 y el caso contrario en que se tuvo menor crecimiento bacteriano que en el tratamiento en el que se le aplicó nutrimentos (charolas C4, C5 y C7).

5.8 Identificación de las bacterias degradadoras de hidrocarburos

Después de someter el suelo contaminado con hidrocarburos al tratamiento con la aplicación de lodos, se tomaron muestras de cada charola y se realizó una cuenta viable como se muestra en la Tabla 5.11, en donde se seleccionaron colonias para su identificación morfológica (Tabla 5.12) de las bacterias seleccionadas previamente. En este caso, se numeraron las bacterias distintas entre ellas, es decir y como se aprecian en la Figura 5.12 fueron seleccionadas por su forma, consistencia, color, tamaño, etc. de estas se seleccionaron 14 colonias.

Los resultados muestran la actividad existente en el suelo, y por lo que se puede observar se tuvo la suficiente cantidad de microorganismos para que se llevara a cabo la biodegradación, ya que la cantidad de bacterias requeridas para una buena degradación de compuestos orgánicos presentes en el suelo debe ser mayor de 10^4 UFC/g (SSSA, 1994).

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 5.12 Aislamiento de colonias involucradas en el tratamiento del suelo contaminado

Colonia													
Característica	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Forma	Irregular	Circular	Circular	Circular	Irregular muy grande	circular	Puntiforme	Rizoide (arrugada)	Puntiforme	Circular	Puntiforme	Puntiforme	circular
Elevación	Elevada	Plana	pulvinada	convexa	plana	Umbonada	plana	umbonada	Convexa	convexa	Plana	Plana	convexa
Margen	Ondulado	Entero	Entero	Entero	lobulado	entero	entero	lobulado	Entero	undulado	Entero	Entero	entero
Color	Blanco	Amarillo (fluorescente)	Crema transparente	Crema Poco Fluorescente	crema	crema	Amarilla Fluorescente	blanco	Crema cafésita fluorescente	Crema Transparente	Crema fluorescente	Blanco cremoso	Cremoso transparente
Consistencia	Cremosa opaca	Cremosa brillante	Seca (chiclosa) opaca	Cremosa poco brillante	Cremosa opaca	Cremosa poco brillante	Cremosa brillante	Seca opaca	Cremosa Poco brillante	cremosa	Cremosa	Cremoso	Cremoso pequeña
Gram	Negativo	Negativo	Azules (positivo)	Negativo	Positivo	Positivas	Negativo	Positivo	Negativo	positivo	negativo	Negativo (variable)	Positivo
Morfología	Racimos (cocos)	Bacilo	bacilos	Cocos	Bacilos	Bacilos	cocos	bacilos	Bacilos	racimos	bacilos	Coco-bacilos	Racimos

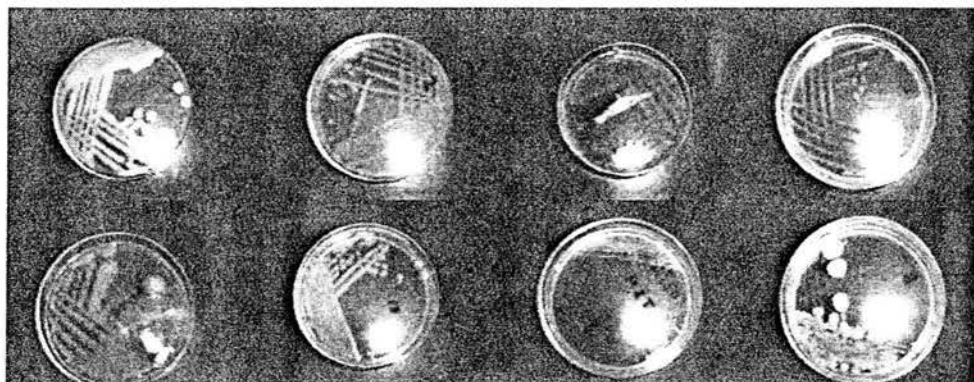


Figura 5.12 Cepas puras del tratamiento del suelo contaminado.

Después de la identificación morfológica, se realizó una tinción de Gram para conocer si la colonia era Gram positiva o negativa y después de conocerlo su morfología microscópica, se aplicaron las técnicas alternativas de identificación. Los resultados se aprecian en la Tabla 5.13 y 5.14.

Tabla 5.13 Identificación de bacterias degradadoras de hidrocarburos

No. Colonia	Gram	Bacteria	Morfología
1	Negativa	No identificada	Cocos
2	Negativa	No identificada	Bacilos
3	Positiva	Bacillus subtilis	Bacilos
4	Negativa	No identificada	Cocos
5	Positiva	Bacillus cereus	Bacilos
6	Positiva	Bacillus cereus	Bacilos
7	Negativa	Sphmon paucimobilis	Cocos
8	Positiva	Bacillus subtilis	Bacilos
9	Negativa	Pseudomona Spp	Bacilos
10	Positiva	Aerococcus viridianis	Cocos
11	Negativa	Pseudomona Spp	Bacilos
12	Negativa	No identificada	Cocobacilos
13	Negativa	Pseudomona Spp	Bacilos
14	Positiva	Aerococcus viridianis	Cocos

De las 14 colonias seleccionadas se identificaron 6 colonias debido a que algunas colonias fueron las mismas y otras más no se identificaron por estos métodos alternativos de identificación.

Así como en el suelo tratado, se realizó una identificación del suelo inicial, es decir antes del tratamiento como se muestra en la Tabla 5.14 y comparando con las del suelo tratado, las bacterias son iguales, por lo cual podemos decir que las bacterias autóctonas del suelo son bioestimuladas mediante la aplicación de los diferentes tratamientos en el suelo.

Tabla 5.14 Bacterias hidrocarbonoclastas

Bacterias (antes del tratamiento en el suelo)
<i>Chryseomona luteola</i> <i>Sphingomona paucimobilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i>
Bacterias (después del tratamiento en el suelo)
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Sphingomona paucimobilis</i> <i>Pseudomona Spp</i> <i>Aerococcus viridianis</i> <i>Bacillus sp</i>

Los microorganismos que degradan el petróleo tienen una importancia considerable en la depuración de las aguas residuales de la industria petrolera que los contienen. En este trabajo ha dado resultado la adición de lodos por ser portadora generalmente de una rica población de bacterias y hongos que descomponen los hidrocarburos.

Algunos microorganismos se encuentran especializados en determinadas fracciones, otros viven de los productos intermedios.

En la Tabla 3.1 del capítulo 3, se muestran las bacterias que se han identificado como degradadoras de hidrocarburos y el género *Bacillus* se ha empleado para degradar bifenilos policlorados, del género *Pseudomonas* se ha usado para degradar petróleo crudo, tolueno, y fenol, las bacterias encontradas son del género *Bacillus sp.* y *Pseudomonas sp.* Dado que estas bacterias las encontramos en ambientes como suelo, agua y aire, es probable que éstas estén presentes tanto en

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los lodos aplicados como que sean autóctonas del sitio de donde proviene el suelo contaminado, ya que en la Tabla 5.14 presenta algunas de las bacterias encontradas en el suelo antes del tratamiento las cuales coinciden con las identificadas después del tratamiento.

6.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Los resultados obtenidos muestran que existe una degradación de los hidrocarburos presentes en el suelo con la aplicación de lodos biológicos producidos en los reactores, los cuales asimilan el contaminante como sustrato.
- De los tratamientos probados, el de aplicación de lodos con adición de tensoactivo es el que da mayor eficiencia de degradación de hidrocarburos, en las charolas C7, C8 y C9 con porcentajes de degradación del 73, 72 y 67 % respectivamente.
- De las dosis aplicadas de lodos; dosis 1 (sin aplicación de lodos), dosis 2 (1L / 3 días) y dosis 3 (1L/6 días), las charolas que tuvieron mejor degradación de hidrocarburos fueron con la aplicación de la dosis 2 de lodos con porcentajes de degradación del 70, 63 y 72 por ciento en las charolas C2, C5 y C8 respectivamente.
- No existe una diferencia considerable en los resultados con la aplicación de las diferentes dosis de lodos; por lo que se considera la mejor opción la dosis 2 ya que implica la mitad de volumen de lodos que la dosis 1.

6.0 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ☑ Para la población bacteriana durante el proceso de biodegradación en las charolas experimentales se logró la fase estacionaria del crecimiento bacteriano en una población superior en un intervalo de 10^7 a 10^9 UFC/g a las requeridas de 10^4 UFC / g, lo que permitió lograr la aclimatación de lodos a los contaminantes presentes en el suelo y biodegradarlos.
- ☑ La mejor eficiencia de degradación de hidrocarburos entre las charolas experimentales de la segunda etapa fue la charola C7 con un porcentaje de degradación del 73 %, la cual tuvo aplicación tensoactivo únicamente, es decir el trabajo de degradación se realizó con las bacterias nativas del suelo contaminado aplicando a este la humedad necesaria para que se llevara a cabo además del proceso de solubilización aportado por el tensoactivo.
- ☑ Las bacterias identificadas son comúnmente encontradas en el ambiente tanto en suelo como agua por lo que tanto la aportación de bacterias nativas como las aplicadas con los lodos lograron mantenerse en un ambiente tóxico por el contaminante presente en el suelo las cuales se han llamado hidrocarbonoclastas.
- ☑ En este trabajo se considera que la principal innovación consiste en la aplicación de los lodos provenientes de una planta de tratamiento de aguas residuales industriales para un efecto positivo en la descontaminación de suelo contaminado por desechos industriales principalmente de la industria petroquímica, como es el caso del diesel.

6.2 Recomendaciones

- ☑ Por la experiencia en la realización del trabajo experimental se propone esterilizar el suelo antes del tratamiento con la aplicación de lodos para establecer una comparación entre la aportación de los microorganismos nativos y los aportados por los lodos activados.
- ☑ Para poder establecer una diferencia significativa entre los tratamientos es importante considerar factores que se puedan controlar en el suelo tratado como la humedad ya que durante el proceso se pierde humedad por el ambiente y este puede ser un factor muy importante para el crecimiento bacteriano.
- ☑ Es importante mencionar que debido a la heterogeneidad del suelo y los contaminantes es recomendable realizar un tamizado del suelo para separar los agregados de hidrocarburo intemperizado, que pudieran afectar en el análisis de la concentración de hidrocarburos al final del tratamiento como es el caso de este trabajo en el que se tuvieron serios problemas de homogenización.
- ☑ Se recomienda establecer una cinética de degradación de hidrocarburos tanto para microorganismos nativos de suelo como por los aportados por los lodos activados.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). (1999). Hidrocarburos Totales del Petróleo. Agencia para sustancias Tóxicas y el registro de enfermedades, división de Toxicología. Home page <http://www.atsdr.cdc.gov/es/en español>.
2. Atlas, R., (1991). Microbial hydrocarbon degradation biorremediation of oil spills. Tech Biotechnol. EUA
3. ATSDR, (2001). Hidrocarburos Totales del Petróleo. Reseña toxicológica de los hidrocarburos totales del petróleo. Home page <http://www.atsdr.cdc.gov/es/en español>.
4. Blackburn J.W., Hafker W.R., (1993). The impact of biochemistry, bioavility and bioactivity on the selection of bioremediation techniques (TIBTECH), 11: 328-333
5. Barry,R.K.,(1992). Practical Environmental Biorremediation, Lewis publishers, USA P.p.147.
6. Bossert, I., Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. Petroleo Mycrobiology. Atlas, R. M. Mc Millan Publishing Co., Ney York. P.p. 434-476.
7. Cancino, M.A., (2002). La regulación de la remediación de suelos contaminados en México y propuestas para su fortalecimiento. SEMARNAT-GTZ,. México.D.F, P.p. 59.
8. Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales. (CEPIS), (1997). Control de sustancias tóxicas. Manual de la evaluación y manejo de sustancias toxicas en aguas superficiales. Home page: <http://www.cepis.ops-oms.org/eswww/fulltext/publica/contsust/conca61a.html#biode>
9. Curci, E., Calleja, C., Videla, S., Gálvez, J., Ercoli, E. (1999). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Memorias INGEPET 99, Lima Perú. Home page: <http://www.ingepet.com/espanol/ehs.htm>
10. David, G.A.F, (2002). Saneamiento de sitios contaminados. Procuraduría Federal de Protección al ambiente. Home Page: http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetas/gaceta36/g9536591.html?id_pub=230

11. De los Rios, Z.J.C. (1998). Plantas de Tratamiento, Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Lodos Activados, Home page <http://www.geocities.com/jdelosri/procesos.htm>, Perú.
12. Detergent Chemistry, (1998). Surfactants. Internet home page <http://www.Chemistry.co.nz/surfactants.htm>.
13. Diario Oficial de la federación, 1996. Decreto que reforma, adiciona y deroga diversas disposiciones de la ley general de equilibrio ecológico y protección al ambiente. Viernes 13 de Diciembre, P.p. 6-36.
14. Domínguez, I., Aguilera, N., (1997). Metodologías de Análisis fisicoquímicos de suelos. Universidad Nacional Autónoma de México, P.p. 34.
15. Ercoli, E., Gálvez, J., DiPaola, M., Cantero, J.; Videla, S.; Medaura, M.; Bauzá, J. (2001). Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. Facultad de Ingeniería, Universidad de Cuyo, Mendoza.
16. Ercoli, E., Gálvez, J., Aranzadi, E., Santos, A., Cantassano, P. (1995). Tratamiento biológico exsitu de residuos semisólidos de oleoductos. Memorias 1 encuentro latinoamericano para la calidad en la industria petrolera. Instituto Argentino del Petróleo, Mendoza Argentina, P.p. 311-318.
17. Ercolí, E., Saracino, C. (1998). Evaluación de dos años de experiencias en campo en biorremediación de suelos. 3a Jornadas de preservación de Agua, aire y Suelo en la industria del petróleo y del Gas. Argentina, Tomo 1, P.p. 47-60.
18. Eweis, J.B.; Ergas, S.J.; Chang, D.P y Schroeder, E. (1998). Bioremediation Principes. McGraw-Hill International Editions, P.p. 296.
19. Fahnestock and Wickramanayake (1998). Biopile design, operation and maintenance, handbook for treating hydrocarbon - contaminated soil. Battelle Press. Columbus Ohio, USA. P.p. 163.
20. FAO. (2002). Panorama de la Gestión Ambiental en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (México), Universidad Nacional Autónoma de México (México), Swiss College of Agriculture (Switzerland). Home Page: <http://www.fao.org/WAIRDOCS/LEAD/X6372S/x6372s00.htm>

21. Ferrari, M.D., Albornoz, C., Nerrotti, E. (1994). Biodegradabilidad en suelos de hidrocarburos residuales en fondos de tanques de almacenamiento de Petróleo. *Revista Argentina de microbiología*, 26: 157-170. Argentina.
22. Freeman M.H., Harris F.E. (1995). *Hazardous Waste Remediation Innovative Treatment Technologies*. Thechnomic Publishing Company, Inc. USA, P.p. 103-113.
23. Glyn,H.J, Gary, W.H. (1999). *Ingeniería ambiental*, Prentice-Hall, 2a Edición, México. P.
24. Grady, C.P.L Jr. (1985). Biodegration: It's measurement and microbiological basis. *Biotechnol. Bioeng.* P.p. 27: 660-674
25. INE, (2002). Marco jurídico e institucional. Home Page: http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/3/marco.html?id_pub=3
26. INE, (2003). Tecnologías de remediación utilizadas en México. Home page: http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/372/tecnomexico.html?id_pub=372
27. Iturbe A.R. (2003). *Remediación de suelos contaminados*. Apuntes Maestría. Facultad de Ingeniería, UNAM. México, D.F. México.
28. Iturbe, A.R., Castro,R.A, Madrigal, M.I (1998). *Técnicas de rehabilitación de suelos y acuíferos*. Series del instituto de Ingeniería, No. 612. UNAM, México, P.p. 16
29. Iturbe, R., Flores, C., Chávez,C., Bautista, G., Torres, L. (2003). Design and operation of 27 m³ bioplie for the treatment of soil contaminated with petroleum fractions. 2nd ICPB Ten development and perspectives of biotechnology Applied to the oil Industry Memories, México.
30. Jonge, H., Freijer, J.Y., Verstraten J.M., and Westerveld J. (1997). Relation between Bioavailability and Fuel Oil Hydrocarbon Composition in Contaminated Soils. *Environ. Sci. Technol.*, 31:771-775
31. Jutean,P., Bisailon, J.G., Lepine, F., Ratheau, V., Villemur, R., (2003). Improving the biotreatment of hydrocarbons contaminated soils by addition of activated sludge taken from the waste water treatment facilities of an oil refinery. *Biodegradation* 14: 31-40. Netherlands.

32. Madrigal, M.I. (1998). Alternativas para la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos en México. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería, UNAM. México, P.p. 196.
33. Maroto, A.M., Quesada, J.M., (1997). Aplicación de sistemas de biorremediación. GEOCISA. División de Protección Ambiental de Suelos.
34. Márquez, R. F. J. (1997), Biodegradación y biodisponibilidad de contaminantes en el suelo. Memorias Symposium Biorremediación de suelos y acuíferos. Cinvestav-IPN. México, D.F. México.
35. Orantes, G.J.L, (2002). Aplicación de surfactantes en suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de Maestría. Facultad de Ingeniería, UNAM, P.p. 18
36. Ortiz, S.R., (2003). Aspectos en la contaminación del suelo por hidrocarburos en México. Home Page: <http://www.monografias.com/trabajos7/hime/hime.shtml>
37. Poder Ejecutivo Federal, 1995. Programa Forestal y de Suelos 1995-2000. Dirección General de Comunicación Social de la SEMARNAP. México.
38. PROFEPA, (2002). Dirección General de Inspección de Fuentes de Contaminación, México <http://www.profepa.gob.mx/>
39. Réyes, Jaramillo I., (1996). Fundamentos teórico prácticos de temas selectos de la ciencia del Suelo. Universidad Autónoma Metropolitana, 33 P.p. México. D.F.
40. Roldán M.G.A. (2001), Biopilas como alternativa de tratamiento para la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería. UNAM, México.
41. Sawyer, C.N., Mc Carty L. (2001). Química para Ingeniería Ambiental. 4ª Edición, Editorial Mc Graw Hill. Colombia, P.p. 714.
42. Saval, B. S. (1995). Acciones para la remediación de suelos en México. 2º minisimposio internacional sobre contaminantes del agua y suelo. Instituto de Ingeniería, UNAM.
43. Saval, S. (1997). Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. Revista Ingeniería y ciencias Ambientales, 33: 24-30. México.

44. Saval, S.B. (1996). Biodegradación de compuestos orgánicos industriales. Series Instituto de Ingeniería, UNAM, México. 1: 84-94
45. Saval, S.B. (1997). Biorremediación de suelos y acuíferos contaminados. Memorias Symposium Biorremediación de suelos y acuíferos. CINVESTAV-IPN, México.
46. Saval, S.B. (2000). Casos de estudio sobre caracterización y biorremediación de sitios contaminados con combustibles destilados. Memorias del 1er curso de restauración de suelos contaminados. Instituto de Ingeniería, Colegio de Ingenieros Ambientales, A.C., SEMARNAT. México.
47. SEMARNAT (2002). NOM-EM-138-ECOL-2002, Diario Oficial de la federación, 20 de Agosto, 2002. México.
48. SEMARNAT, Recursos Naturales. (2002). NOM-021-RECNAT-2000, Diario Oficial de la Federación, Diciembre 31, 2002. México.
49. SEMARNAT, (1981). NMX-AA-034 Aguas, determinación de sólidos en agua, Diario Oficial de la federación, 3 de Julio de 1981. México.
50. Scragg, A. (1996). Biotecnología para ingenieros, Sistemas biológicos en procesos tecnológicos, Edit. Limusa, 1ra ed. México, P.p. 368.
51. Soil Science Society of America Book Series (SSSA), 1994. Methods of soil analysis, part 2: Microbiological and biochemical properties. Wisconsin, USA, P.p. 1121.
52. Standard methods for the examination of water and wastewater, 1989. Test on activated sludge. Publication office American Public Health Association. USA part 2-83.
53. Torres, B.L.G. (1997), *Et al* Uso de cepas adaptadas a la degradación de compuestos orgánicos recalcitrantes y tóxicos. Ingeniería Hidráulica en México. Vol. XII, 3:15-25.
54. Torres, L., Orantes, J.L, Iturbe, R. (2003). Critical Micellar Concentrations for three Surfactants and their Diesel removal efficiencies in Petroleum contaminated soils. Environmental Geosciences, V.10. No. 1, México, P.p. 28-36.

7.0 BIBLIOGRAFÍA

55. Pontificia Universidad Católica de Chile. Tratamiento de Aguas Residuales domésticas (PUCC), (2004). Internet home page <http://www.puc.cl/quimica/agua/tratamiento.htm>. Chile.
56. US EPA, 1985. Hazard Waste Sites and Spills: Biological treatment, Report submitted by Battelle Northwest Labs. Richmond, Washington to office of Research and Development, U.S EPA, Oregon.
57. Valderrama, B.B, (2001). Microbiología del petróleo y sus derivados. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Publicaciones digitales. Home page: <http://biblioweb.dgscs.unam.mx/libros/microbios/Cap2/>
58. Volke, S.T., Velasco, T.J.A. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. SEMARNAT. P.p. 62. Home page: http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/consultaPublicacion.html?id_publicacion=372&id_tema=&dir=Consultas
59. Winkler, M. (1986). Tratamiento biológico de aguas de desecho, Edit. Limusa, 1ra ed, México, P.p. 87-88
60. Zehner, R. (2001). Identificación, evaluación, control, mitigación y biorremediación de riesgos medioambientales. II congreso de seguridad industrial y medio ambiente de la industria petrolera. Perú.
61. Zegarra, M.G. (2000). Optimización de la biodegradación del diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta, Tesis de Maestría, Facultad de Ingeniería, UNAM. México. P.p. 142.