



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

REMOCIÓN DE DIESEL CONTENIDO EN EL SUELO  
MEDIANTE FITO-REMEDIACIÓN CONVENCIONAL Y  
ASISTIDA POR BPCV

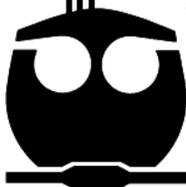
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERA QUÍMICA

PRESENTA

MABEL CARRANZA RODRIGUEZ



MÉXICO, D.F.

2010



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.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: Rodolfo Torres Barrera

Vocal: Víctor Manuel Luna Pabello

Secretario: Fulvio Mendoza Rosas

1<sup>er</sup> Suplente: Juan José Ruíz López

2<sup>do</sup> Suplente: José Agustín García Reynoso

### **Lugar donde se realizó la tesis:**

Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química, UNAM

Tutor Principal

---

Víctor Manuel Luna Pabello

Supervisor Técnico

---

María Guadalupe Tsuzuki Reyes

Sustentante

---

Mabel Carranza Rodriguez

## DEDICATORIAS

A Mabel Carranza Rodriguez por ser la mejor amiga y compañera que he tenido a lo largo de mi vida, y quiero que cuando abras y leas esta tesis sepas que se pueden realizar y sobre todo lograr las metas y sueños.

A mis amados padres Eloy Carranza y Lourdes Rodríguez, por su amor, apoyo, tiempo y consejo para concluir en esta etapa de mi vida y todos los días mi vida. Mamá gracias por todos los ricos apapachos, consejos y amor que me haz dado a lo largo de mi vida y Papá gracias por tus valiosos consejos que han hecho de mi una mejor persona.

A mis hermanos Paul Isaac y Glenda, porque sin ellos la vida no sería la misma. Gracias por estar ahí siempre, que yo estaré ahí también..

A Ana Paola por haber llegado a nuestras vidas e iluminarnos con tu sonrisa todos los días.

A Héctor el bebe de mi hermana Glenda, que me gano en la fecha de mi titulación, que bueno que llegaste al mundo para ver a tu tía Mabel titularse.

A la familia Díaz Santa por todas las reuniones que hemos tenido juntos.

A la persona que amo en estos momentos en mi vida gracias por tu apoyo, amistad, pero sobre todo por todos estos días juntos.

A todos y cada uno de mis amigos que a lo largo de mi vida han estado conmigo en las buenas y en las malas.

A mi, amada Universidad y Facultad de Química, por que el día en que vi la vida diferente.

## **RECONOCIMIENTOS**

Se reconoce el apoyo económico recibido a través de los proyectos UNAM/DGAPA-PAPIIT IN 107209, PAPIME PE-205706, así como al FQ/PAIP-VMLP-6190-14 2009 y 2010. Asimismo, se hace patente el reconocimiento a la Profesora Guadalupe Tsuzuki Reyes, por el apoyo técnico recibido en los aspectos de microbiología del suelo.

La presente tesis de licenciatura en Ingeniería Química, se desarrollo en conjunto con la tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental realizada por Holdayara E. Hernández Reyes. Ambas tesis forman parte del proyecto "Estrategias de tratamiento biológico para suelos contaminados con hidrocarburos".

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Ing. Mendoza por haber cambiado mi vida el día que platique con el.

A el Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por su apoyo incondicional en los trabajos realizados durante mi estancia en el laboratorio de microbiología experimental, por

sus consejos y sobre todo por la entero apoyo en mi carrera, formación profesional y personal.

Al Dr. Felipe Vázquez (q.e.p.d.) del Laboratorio de Físicoquímica del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por el apoyo en el análisis de las muestras.

A la Dra. Lucy Mora Palomino del Laboratorio de Edafología Ambiental, del instituto de Geología de la UNAM por el apoyo en el análisis de las muestras.

A Víctor Pera, del Laboratorio de Físicoquímica del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por su apoyo técnico.

Al Ing. Fernando Gómez, por su amistad y orientación a lo largo de este tiempo.

Y finalmente a todas y cada una de las personas que conocí en el Laboratorio de Microbiología Ambiental.

---

## Resumen

---

Se evaluó y comparó el porcentaje de remoción de diesel (fracción media de hidrocarburos) en suelo mediante fito-remediación convencional y asistida con BPCV en suelo contaminado por diesel, empleando Rye grass (*Lolium perenne*) como especie vegetal para ambos tratamientos y AZm1 (*Azospirillum lipoferum*) como bacteria promotora de crecimiento vegetal (BPCV). Se confirmó la hipótesis: la fito-remediación asistida tuvo un porcentaje de remoción de 84% en comparación con la fito-remediación convencional que tuvo un porcentaje de remoción de 83%, sólo se obtuvo el 1% de diferencia significativa. Los resultados del monitoreo de los sistemas durante el experimento demostraron lo siguientes: la relación del suelo conformado fue: arena 37.97 %, arcilla 22.21 % y limo 22.13 %, siendo un suelo de tipo Franco Arcillo Arenosa; en materia orgánica un valor de 2.54 %; en humedad 23.12 %; el suelo presentó un pH=7.6 del tipo ligeramente alcalino apto para mantener vivas a las BPCV (*Azospirillum lipoferum*); respecto al nitrógeno un valor de 0.12 mg/kg y de fósforo con 1.16 mg/kg. Respecto a la concentración letal media de diesel el valor teórico fue de 15,007.42 mg/kg; el valor real la establecida para trabajar en el experimento fue de 10,552 mg/kg. La especie vegetal Rye grass (*Lolium perenne*) obtuvo un porcentaje de germinación y sobrevivencia aceptables para este experimento. El porcentaje de sobrevivencia para todos los sistemas estuvo en un rango del 60 % al día 62. Con respecto al rango de longitud de raíz y tallo para todos los sistemas fue de 5.30 cm en raíz; para tallo de 11.0 cm al día 62. El pH en el suelo no tuvo un cambio significativo a lo largo del experimento. La concentración de la fracción media de hidrocarburos (HTP) en la planta para la fito-remediación convencional obtuvo mayor concentración una concentración de 1,071 mg/kg con respecto del tratamiento 1 sin bacterias AZm1.

<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
<b><u>RESUMEN</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>1. INTRODUCCIÓN</u></b>	<b><u>12</u></b>
<b><u>2. MARCO TEÓRICO</u></b>	<b><u>13</u></b>
2.1 ASPECTOS LEGALES DE SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS	13
2.1.1 SISTEMA DE DISTRIBUCIÓN DE HIDROCARBUROS EN MÉXICO	18
2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL DIESEL	22
2.2.1 EL DIESEL COMO CONTAMINANTE DE SUELOS	27
2.3 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE TIPO DE SUELOS	29
2.3.1 IMPORTANCIA DE SUS PROPIEDADES EN SU DEPURACIÓN	31
2.4 TECNOLOGÍAS DE REMEDIACIÓN PARA SUELOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS	33
2.4.1 FITO-REMEDIACIÓN COMO ALTERNATIVA	42
2.4.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA FITO-REMEDIACIÓN	44
2.5 LA IMPORTANCIA DE LA ESPECIE VEGETAL Y LA RIZÓSFERA	48
2.5.1 RYE GRASS (LOLIUM PERENNE) ESPECIE VEGETAL PARA FITO-REMEDIACIÓN	49
2.6 MECANISMOS DE ESTIMULACIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS	51
2.6.1 AZOSPIRILLUM LIPOFERUM (AZM1) COMO BACTERIA PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL (BPCV)	53
<b><u>3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO</u></b>	<b><u>57</u></b>
3.1 OBJETIVO GENERAL	57
3.2 OBJETIVO PARTICULAR	57
3.3 HIPÓTESIS	57
3.4 ESTRATEGIA DE TRABAJO	57

<b>4.</b>	<b><u>METODOLOGÍA</u></b>	<b>60</b>
4.1	OBTENCIÓN DEL SUELO NATURAL	60
4.1.1	CARACTERIZACIÓN DEL SUELO NATURAL	60
4.2	OBTENCIÓN DEL SUELO CONFORMADO	61
4.2.1	CARACTERIZACIÓN DEL SUELO CONFORMADO	62
4.3	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL (CL <sub>50</sub> ) DE DIESEL PARA EL EXPERIMENTO	62
4.4	PREPARACIÓN DE SUELO CON DIESEL Y SIN DIESEL PARA LAS UNIDADES EXPERIMENTALES	64
4.5	INÓCULO DE SEMILLA LOLIUM PERENNE CON AZM1 COMO BPCV	65
4.6	CONFORMACIÓN Y MONTAJE DE LOS SISTEMAS EXPERIMENTALES	66
4.7	CARACTERIZACIÓN DE LOS SISTEMAS	70
4.8	FACTORES DE RESPUESTA	70
4.9	DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN MEDIA DE HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP)	70
<b>5.</b>	<b><u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b>	<b>72</b>
5.1	CARACTERIZACIÓN DEL SUELO NATURAL	72
5.1.1	CARACTERÍSTICAS DEL SUELO CONFORMADO	72
5.1.2	CARACTERIZACIÓN DEL SUELO CONFORMADO	75
5.2	CONCENTRACIÓN LETAL MEDIA (CL <sub>50</sub> ) DE DIESEL PARA EL EXPERIMENTO	77
5.3	MONITOREO DE LOS SISTEMAS EXPERIMENTALES	80
5.4	FÓSFORO Y NITRÓGENO EN LOS SISTEMAS.	80
5.5	PH EN LOS SISTEMAS EXPERIMENTALES	83
5.6	FRACCIÓN MEDIA DE HIDROCARBUROS (HTP) EN LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES	85
5.7	PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE FRACCIÓN MEDIA DE HIDROCARBUROS	87
5.8	PORCENTAJE DE SOBREVIVENCIA DE LA PLANTA VEGETAL EN LOS SISTEMAS	89
5.9	LONGITUD DE RAÍZ Y TALLO DE LA PLANTA VEGETAL	91

5.10	OBTENCIÓN DE PESO BASE SECA DE LA PLANTA VEGETAL EN LOS SISTEMAS	95
5.11	CONCENTRACIÓN DE FRACCIÓN MEDIA DE HIDROCARBUROS EN LA ESPECIE VEGETAL DURANTE EL EXPERIMENTO	96
<b>6.</b>	<b><u>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u></b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b><u>BIBLIOGRAFÍA</u></b>	<b>101</b>
<b>8.</b>	<b><u>ANEXOS.</u></b>	<b>105</b>
ANEXO A	105	
8.1	DETERMINACIÓN DEL PH DEL SUELO MEDIDO EN AGUA A TRAVÉS DEL MÉTODO AS-02.	105
8.2	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE HUMEDAD DEL SUELO POR GRAVIMETRÍA, SE REALIZA A TRAVÉS DEL MÉTODO AS-05.	107
8.3	DETERMINACIÓN DEL DE MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO POR GRAVIMETRÍA, SE REALIZA A TRAVÉS DEL MÉTODO AS-07 DE WALKLEY Y BLACK.	108
8.4	LA DETERMINACIÓN DE NITRÓGENO INORGÁNICO DEL SUELO SE REALIZA A TRAVÉS DEL MÉTODO KJELDAHL.	111
8.5	DETERMINACIÓN DE FÓSFORO EN SUELO POR EL PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO LABORATORIO DE EDAFOLOGÍA AMBIENTAL 2000.	117
8.6	DETERMINACIÓN DE TEXTURA DEL SUELO POR EL PROCEDIMIENTO DE BOUYOCOS, SE REALIZA A TRAVÉS DEL MÉTODO AS-09.	120
8.7	ANEXO B	124
8.7.1	RESULTADOS DURANTE EL MONITOREO.	124
8.7.2	RESULTADOS GENERALES DURANTE EL MONITOREO EXPERIMENTAL	129
8.8	ANEXO C	130
8.8.1	DATOS DE CONCENTRACIÓN DE HTP EN SISTEMAS DE TRATAMIENTO.	130
8.9	ANEXO D	132
8.9.1	ÁNÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PLANTAS.	132

<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>Página</b>
<i>Tabla 2.1 Hidrocarburos por analizar en función del producto contaminante (NOM-138-SERMANAT/SSA1-2008)</i>	16
<i>Tabla 2.2 Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelos (NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2008)</i>	16
<i>Tabla 2.3 Tabla de Usos generales de Diesel Industrial</i>	24
<i>Tabla 2.4 Tabla de propiedades de combustible en flama Diesel Industrial</i>	25
<i>Tabla 2.5 Tabla de Medidas de seguridad para el Uso de Diesel Industrial</i>	26
<i>Tabla 2.6 Influencia de la textura en el comportamiento del suelo</i>	31
<i>Tabla 2.7 Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación In situ y ex situ (Instituto de Ecología) Fuente: Velasco, 2002.</i>	39
<i>Tabla 2.8 Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación clasificadas de acuerdo con el tipo de tratamiento. Fuente Volka-Velasco, 2002.</i>	41
<i>Tabla 2.9 Características y funciones en la fito-remediación. Fuente (Casal et al., 2004)</i>	44
<i>Tabla 2.10 Principales ventajas y desventajas de la fito-remediación (Casal et al., 2004)</i>	45
<i>Tabla 4.1 Métodos empleados para la determinación de propiedades y caracterización del suelo natural y suelo conformado</i>	61
<i>Tabla 4.2 Nomenclatura y distribución de las unidades experimentales (S- suelo, Se-semilla Rye gras (Lolium perenne), D- diesel, B- AZm1)</i>	67
<i>Tabla 5.1 Resultados de caracterización del suelo natural de Tierra Blanca, Veracruz.</i>	72
<i>Tabla 5.2 Valores totales de suelo conformado para 100 kg de suelo.</i>	73
<i>Tabla 5.3 Resultados de la caracterización de la materia orgánica obtenida comercialmente.</i>	73
<i>Tabla 5.4 Resultados de caracterización de suelo conformado.</i>	75
<i>Tabla 5.5 Comparación de caracterización del suelo natural y suelo conformado.</i>	76
<i>Tabla 5.6 Diferentes intervalos de concentraciones de diesel en suelo conformado para determinar CL<sub>50</sub></i>	78
<i>Tabla 8.1 Resultados promedio del porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para una n de 25 semillas y una n de 3 repeticiones</i>	124
<i>Tabla 8.2 Resultados promedio de longitud de Raíz y Tallo durante la experimentación para una n de 25 semillas y una n de 3 repeticiones</i>	126

---

<i>Tabla 8.3 Resultados promedio de longitud de Raíz y Tallo durante la experimentación durante el experimento para una n de 25 semillas y una n de 3 repeticiones para el Control 2</i>	127
<i>Tabla 8.4 Resultados del promedio de longitud de tallo-raíz durante el experimento para una n de 25 semillas y una n de 3 repeticiones. Tratamiento1</i>	127
<i>Tabla 8.5 Resultados del promedio de longitud de tallo-raíz durante el experimento para una n de 25 semillas y una n de 3 repeticiones para el Tratamiento 2</i>	128
<i>Tabla 8.6 Resultados de concentración de HTP fracción diesel durante el monitoreo de los sistemas experimentales. Con una n=3 repeticiones y n=25 semillas</i>	130
<i>Tabla 8.7 Resultados de porcentaje de remoción de HTP fracción diesel durante el monitoreo de los sistemas experimentales. Con una n=3 repeticiones y n=25 semillas</i>	130
<i>Tabla 8.8 Resultados de concentración de HTP fracción diesel durante el monitoreo de la especie vegetal. Con una n=3 repeticiones y n=25 semillas por cada sistema</i>	131

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<i>Figura 2.1 Refinerías, oleoductos y poliductos. Fuente: Petróleos mexicanos. Pemex refinación</i>	19
<i>Figura 2.2 Terminales de almacenamiento. (Fuente Petróleos mexicanos. Pemex refinación 2004)</i>	21
<i>Figura 2.3 Triangulo de textura. (Fuente: Crespo Picahardo, 2008)</i>	32
<i>Figura 2.4 Pluma de hidrocarburo durante su infiltración vertical sobre suelo y el manto acuífero (AEET, 2006).</i>	34
<i>Figura 2.5 Diferentes mecanismos de fito-remediación. (Fuente Casal et al., 2004)</i>	43
<i>Figura 2.6 Mecanismos de fito-remediación de una planta. Fuente (Colín, 2001)</i>	46
<i>Figura 2.7 Formación de nódulo radical. Fuente (Tortora, 1993)</i>	55
<i>Figura 3.1 Diagrama de estrategia de trabajo para la fase experimental.</i>	58
<i>Figura 3.2 Diagrama de unidades experimentales para los tratamientos</i>	59
<i>Figura 4.1 Suelo natural, procedencia de Tierra Blanca, Veracruz.</i>	60
<i>Figura 4.2 Suelo conformado, colocación de arena, limo, arcilla.</i>	61
<i>Figura 4.3 Suelo conformado y especie vegetal a diferentes intervalos de concentración de diesel CL<sub>50</sub>.</i>	63
<i>Figura 4.4 Diagrama que resume las actividades realizadas para el suelo contaminado y sin contaminar.</i>	64
<i>Figura 4.5 Diagrama que resume las actividades de inoculación de semilla durante el experimento.</i>	66
<i>Figura 4.6 Diagrama que resume las actividades de conformación y montaje de los sistemas experimentales.</i>	68
<i>Figura 4.7 Matriz experimental, medición de parámetros fisicoquímicos en cada sistema</i>	69
<i>Figura 4.8 Diagrama que resume los pasos para la separación del suelo con la planta, A) Sistemas experimentales en el laboratorio, B) Planta con suelo sobre charola de aluminio Antes de cepillar el suelo, C) Planta con suelo, D) Planta sobre charola para la medir la longitud de la planta.</i>	71
<i>Figura 5.1 Diagrama que resume las actividades de la formación del suelo conformado.</i>	74
<i>Figura 5.2 Diferentes intervalos de concentración de Diesel vs mortandad de la especie vegetal para obtener CL<sub>50</sub>.</i>	79

<i>Figura 5.3 Concentración de diesel en suelo expresada (mg/kg) vs porcentaje de mortandad de semillas (%)</i>	79
<i>Figura 5.4 Medición de Fosforo en los sistemas experimentales</i>	81
<i>Figura 5.5 Relación de nitrógeno entre las unidades experimentales, (primero bloque corresponde al día 10, segundo bloque al día 37 y tercer bloque al día 52 durante su monitoreo)</i>	82
<i>Figura 5.6 Resultados de pH por día en los sistemas experimentales</i>	84
<i>Figura 5.7 Resultados de pH escala logarítmica en los sistemas experimentales</i>	84
<i>Figura 5.8 Concentración de fracción media de diesel durante el monitoreo de los tratamientos</i>	85
<i>Figura 5.9 Remoción de fracción media de diesel en los tratamientos</i>	87
<i>Figura 5.10 Porcentaje de sobrevivencia de la especie vegetal durante el monitoreo de los sistemas experimentales</i>	89
<i>Figura 5.11 Longitud de raíz de la especie vegetal durante el monitoreo de los sistemas experimentales durante los periodos</i>	91
<i>Figura 5.12 Longitud de tallo de la especie vegetal durante el monitoreo de los sistemas experimentales durante los periodos</i>	93
<i>Figura 5.13 Peso Total en base seca de la especie vegetal</i>	95
<i>Figura 5.14 Concentración de fracción media de diesel en la especie vegetal al día 10 y día 62</i>	97
<i>Figura 8.1 Porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para el Control 1</i>	124
<i>Figura 8.2 Porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para el Control 2</i>	125
<i>Figura 8.3 Porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para el Tratamiento 1 Fito-remediación convencional</i>	125
<i>Figura 8.4 Porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para el Tratamiento 2 Fito-remediación asistida por AZm1</i>	125
<i>Figura 8.5 Longitud de tallo-raíz durante el experimento para el Control 1</i>	126
<i>Figura 8.6 Longitud de tallo-raíz durante el experimento para el Control 2</i>	127
<i>Figura 8.7 Longitud de tallo-raíz durante el experimento para el Tratamiento 1. Fito-remediación convencional</i>	128
<i>Figura 8.8 Longitud de tallo-raíz durante el experimento para el tratamiento 2. Fito-remediación asistida por AZm1</i>	128

---

**ABREVIATURAS**

AZm1	Azospirillum lipoferum (como BPCV)
B	Bacteria
BETEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
BPCV	Bacterias promotoras de crecimiento vegetal
C1	Control 1 corresponde S+P
C2	Control 2 corresponde a S+P+B
CL <sub>50</sub>	Concentración letal media
D	Diesel
HAPS	Hidrocarburos aromáticos polinucleares
HTP	Hidrocarburos totales de petróleo
N	número de replicas experimentales
P	Planta
pH	Potencial de iones de hidrógeno.
S	Suelo
T1	Tratamiento 1 corresponde a Fito-remediación convencional
T2	Tratamiento 2 corresponde a Fito-remediación asistida por AZm1

---

## Glosario

### NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2008:

Establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo y lineamientos para el muestreo y la remediación.

### NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-021-SEMARNAT-2000:

Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

### Contaminación:

La presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico.

### Contaminante:

Toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural.

### Derrame:

Cualquier descarga, liberación, rebose, achique o vaciamiento de hidrocarburos que se presente en el suelo.

### Hidrocarburo:

Compuestos químicos, constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno.

### Hidrocarburo de fracción ligera:

Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan cadenas lineales entre cinco y diez átomos de carbono e hidrógeno (C<sub>5</sub> a C<sub>10</sub>).

### Hidrocarburos de fracción media:

Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan cadenas lineales entre diez y veintiocho átomos de carbono (C<sub>10</sub> a C<sub>28</sub>).

---

Hidrocarburo de fracción pesada:

Mezcla de hidrocarburos cuyo peso molecular sea mayor a C<sub>18</sub>.

Fito-remediación: Tecnología biológica emergente que utiliza plantas para degradar, extraer, contener, o movilizar contaminantes en suelos o agua.

Residuos peligrosos: Son aquellos que posean alguna de las características de corrosividad, reactividad, explosividad, toxicidad, inflamabilidad, o que contengan agentes infecciosos que les confieran peligrosidad, así como envases, recipientes, embalajes y suelos que hayan sido contaminados cuando se transfieran a otro sitio, de conformidad con lo que establece la ley.

Restauración: Conjunto de actividades tendientes a la recuperación y establecimiento de las condiciones que propician la evolución y continuidad de los procesos naturales.

Sitio contaminado: Lugar, espacio, suelo, cuerpo de agua, instalación o cualquier combinación de éstos que ha sido contaminado con materiales o residuos que, por sus cantidades y características, pueden representar un riesgo para la salud humana, a los microorganismos vivos y el aprovechamiento de los bienes o propiedades de las personas.

Suelo: Material no consolidado compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire, y organismos que comprenden desde la capa superior de la superficie terrestre hasta diferentes niveles de profundidad.

Suelo contaminado con hidrocarburos: Aquel en el cual se encuentran presentes hidrocarburos incluidos en la tabla señalada por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2008, en una concentración mayor a los límites máximos permisibles establecidos y que representan un riesgo a la salud humana, y al medio ambiente.

---

## 1. INTRODUCCIÓN

---

Entre las causas que han generado contaminación y deterioro ambiental por la contaminación de hidrocarburos de petróleo ya sea en cuerpos de agua y suelos a lo largo de todo el país, se encuentran los siguientes factores:

- Exploración, extracción, transformación y transporte de hidrocarburos.
- Manejo inadecuado y abandono de materiales y residuos peligrosos.
- Mantenimiento inadecuado o falta de éste en instalaciones petroleras.
- Explosiones en instalaciones de alto riesgo.
- Fugas en líneas de conducción.
- Derrames de hidrocarburos.

Para la contaminación ambiental por hidrocarburos en materia de suelos existen diferentes técnicas de tratamiento en las cuales se encuentran las fisicoquímicas y las biológicas, entre las técnica biológica se encuentra el tratamiento de fito-remediación (phyto= planta y remedium = corregir un mal), es una tecnología que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes orgánicos e inorgánicos en suelos, ciertas plantas son removedoras de contaminantes, es decir, son capaces de absorber niveles más altos de estos contaminantes que el promedio, a través de sus raíces y concentrarlos mucho más de lo que lo hacen las plantas normales.

Para el tratamiento de fito-remediación asistida se integran bacterias, estas bacterias tienen la característica de ser promotoras de crecimiento vegetal, el uso de estas bacterias permiten mejorar o reducir las diversas formas de fertilización química al suelo, e incluso pesticidas químicos, contaminantes como diesel, para que el suelo o la planta se beneficien, el mecanismo que llevan acabo estas bacterias son dos: afectan directamente el metabolismo de la planta proporcionando sustancias que naturalmente se suministran en poca cantidad, siendo capaz de fijar el nitrógeno atmosférico y solubilizar el fósforo; el otro mecanismo que usan las bacterias, es estimular indirectamente el crecimiento vegetal y ayudar a la planta a soportar niveles de estrés a los que pueda estar expuesta.

---

## 2. MARCO TEÓRICO

---

### ***2.1 Aspectos legales de suelos contaminados por hidrocarburos***

Pese a la problemática que existe en el país sobre contaminación de suelos provocada por las actividades que se relacionan con el manejo de productos del petróleo, la ley no contempla de manera explícita la contaminación del suelo por otras fuentes, en particular por hidrocarburos.

La Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA), en su título IV Capítulo III se refiere a la "Prevención y Control de la Contaminación de Suelos". Este capítulo expresa de manera general los criterios relacionados con la prevención y control de la contaminación del suelo, básicamente considera los residuos como la fuente principal de la contaminación y hace referencia a su generación, manejo y disposición (Semarnat, 1998).

Como parte de la LGEEPA, actualmente no se cuenta con un Reglamento referente a la contaminación de suelos, por lo que hasta hace pocos años, la participación de las autoridades se había enfocado a aplicar lo expresamente dispuesto en la Ley y en otros ordenamientos que por similitud se han extendido a los suelos contaminados (PROFEPA, 2000). Un ejemplo de lo anterior fue el uso de la NOM-052-SEMARNAT-1993 que establece las características de los residuos peligrosos, como marco de comparación para determinar la contaminación de suelos y con base en ellos establecer la necesidad de remediarlos. Esta práctica, durante un tiempo se hizo común pero originó diversas opiniones de rechazo ya que los suelos contaminados no pueden ser evaluados de la misma manera que un residuo peligroso, además de que causó confusión entre autoridades y el sector productivo del país.

---

De lo anterior, diversas instituciones gubernamentales, educativas, y del sector privado, se dieron a la tarea de establecer criterios para la evaluación y limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos. En 1998, y a iniciativa de la PROFEPA, se conformo el "Grupo de Trabajo sobre Restauración de suelos Contaminados" (GDT), de carácter interinstitucional y multidisciplinario, cuyo objeto fue el establecimiento de criterios interinos para la restauración de suelos contaminados (PROFEPA, 2000).

A partir de la formación del GDT, se hicieron más intensos los esfuerzos realizados por las dependencias de gobierno, principalmente la PROFEPA y el Instituto Nacional de Ecología, para reglamentar en materia de suelos contaminados, de tal forma que desde 1998 y hasta la fecha se ha trabajado en el establecimiento de las bases políticas en la formulación de elementos normativos.

En el año 2001 se publicaron por parte de la Semarnat las Bases de Política para la Prevención de la Contaminación del Suelo y su Remediación, que incluyó una propuesta de Reglamento en materia de Sitios Contaminados con Materiales y Residuos Peligrosos (Semarnat, 2001). En el año 2002 se emitió una norma emergente NOM-138-ECOL-2002 que establecía los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, la caracterización de sitios y procedimientos para la restauración. Esta norma fue revisada y mejorada con base en las experiencias adquiridas con su aplicación.

El 30 de marzo de 2005 se publicó en el diario Oficial de la Federación la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación, y que actualmente regula en el país la contaminación de suelos con hidrocarburos.

---

Durante los primeros dos años de vigencia de la NOM-138-SEMARNAT-/SS-2003, los usuarios y las autoridades la han aplicado en múltiples casos de remediación, lo que ha permitido identificar algunas especificaciones susceptibles de mejorar.

La Norma Oficial Mexicana, se sometió a consideración y fue aprobada por el comité Consultivo Nacional del Medio Ambiente y Recursos Naturales, en su Primera Sesión Extraordinaria del 2008, celebrada el 13 de noviembre de 2008, para su publicación en el diario Oficial de la Federación, por lo tanto el PROYECTO A LA MODIFICACIÓN A LA NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-138-SEMARNAT/SS-2003**, establece los **LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE HIDROCARBUROS EN SUELOS Y LAS ESPECIFICACIONES PARA SU CARACTERIZACIÓN Y REMEDIACIÓN** para quedar como NORMA OFICIAL MEXICANA **NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2008**, establece los **LÍMITES MÁXIMOS PERMISIBLES DE HIDROCARBUROS EN SUELO Y LINEAMIENTOS PARA EL MUESTREO Y LA REMEDIACIÓN.**

La NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2008, es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional para quienes resulten responsables de la contaminación en suelos con hidrocarburos indicados en la tabla 2.1.

**En la tabla 2.2, se muestran los productos asociados a derrames de hidrocarburos** que se clasifican de acuerdo con sus características en hidrocarburos de fracción ligera, hidrocarburos de fracción media e hidrocarburos de fracción pesada.

Por otro lado, la dependencia también reconoce que algunos de los programas y proyectos de desarrollo implementados en el país, especialmente las políticas agropecuarias y agrarias, han inducido procesos que favorecen la deforestación y el uso irracional del suelo.

**Tabla 2.1 Hidrocarburos por analizar en función del producto contaminante  
(NOM-138-SERMANAT/SSA1-2008)**

Producto Contaminante	HIDROCARBUROS					
	Fracción Pesada	HAP's	Fracción Media	HAP's	Fracción Ligera	BETEX
Mezclas	X					
Petróleo Crudo	X	X	X	X	X	X
Combustóleo	X	X				
Parafinas	X	X				
Petrolatos	X	X				
Aceites	X	X				
Gasóleo			X	X		
Diesel			X	X		
Turbosina			X	X		
Keroseno			X	X		
Creosota			X	X		
Gasavión					X	X
Gasolvente					X	X
Gasolinas					X	X
Gasnafta					X	X

**Tabla 2.2 Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelos  
(NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2008)**

Fracción de Hidrocarburos	USO DE SUELO PREDOMINANTE (mg/kg base seca)		
	Agrícola <sup>2</sup>	Residencial <sup>3</sup>	Industrial
Ligera	200	200	500
Media	1200	1200	5000
Pesada	3000	3000	6000

---

Las disposiciones Jurídicas en Materia Ambiental en México se indican en el siguiente listado:

- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos Art. 27.
- Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos.
- Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente.
- Reglamentos de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de residuos.
- NOM-052-SEMARNAT-2005. Que establece las características, el procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los Residuos Peligrosos.
- NOM-054-SEMARNAT-1993. Que establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos por la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-1993.
- NOM-098-SEMARNAT-2002. Protección Ambiental-Incineración de Residuos peligrosos, especificaciones de operación y límites de emisión de contaminantes.
- NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2008. Que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo y la remediación.
- NOM-021-SEMARNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.
- NMX-AA-021-1987. Calidad del suelo- Terminología.
- NMX-AA-021-1985. Protección al Ambiente-Contaminación del Suelo residuos sólidos Municipales-Determinación de Materia Orgánica.
- NMX-AA-021-1985. Protección al Ambiente-Contaminación del Suelo residuos sólidos Municipales-Determinación de Materia Orgánica.
- NMX-AA-105-SCFI-2008. Suelos-Hidrocarburos fracción ligera por cromatografía de gases con detectores de espectrometría de masas y fotoionización-método de prueba.
- NMX-AA-145-2008. Suelos-Hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama.

---

### ***2.1.1 Sistema de distribución de hidrocarburos en México***

La contaminación se define como la presencia en el ambiente de uno más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico. Un contaminante es toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural. (LEGEEPA, 1999).

A continuación se enlistan algunas causas de contaminación de cuerpos de agua y suelos que han generado deterioro ambiental a lo largo de todo el país en materia de hidrocarburos, por ejemplo:

- Exploración, extracción, transformación y transporte de hidrocarburos.
- Manejo inadecuado y abandono de materiales y residuos peligrosos.
- Mantenimiento inadecuado o falta de éste en instalaciones petroleras.
- Explosiones en instalaciones de alto riesgo.
- Fugas en líneas de conducción.
- Derrames de hidrocarburos.

La obtención de hidrocarburos en México y el deterioro ambiental que le es inherente abarcan grandes extensiones del territorio nacional como se muestra en la figura 2.1, concentrándose en los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, sur de Tamaulipas y norte de Chiapas, así como su almacenamiento que son terminales de servicio en muchos lugares en México.

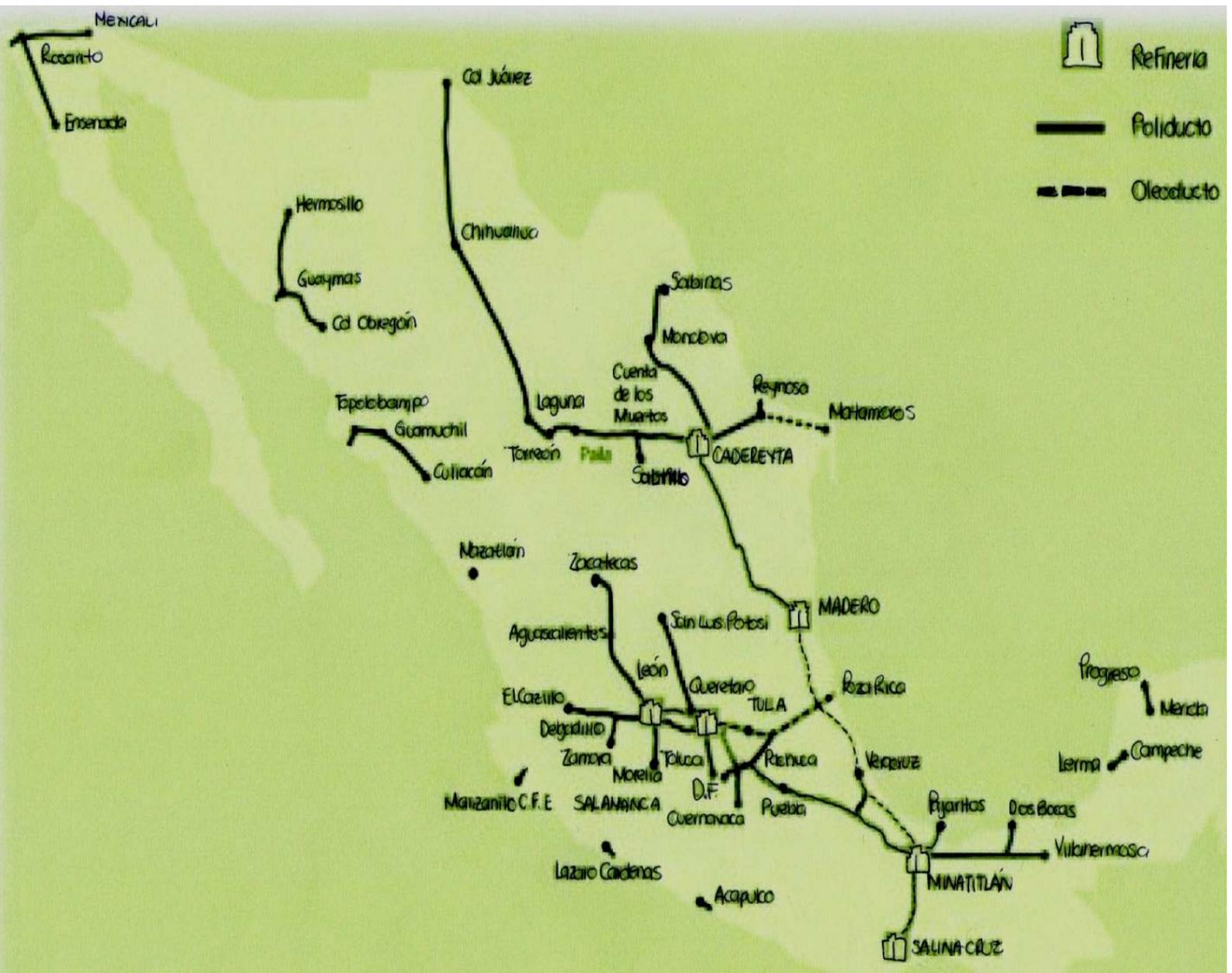


Figura 2.1 Refinerías, oleoductos y poliductos. Fuente: Petróleos mexicanos. Pemex refinación

---

La producción nacional de petróleo crudo se realiza mayoritariamente en la región marina del Golfo de Campeche, la cual aporta el 71%, seguida de la región sur, con el 24.5% y por la región norte con el 3.7%. México, el alto consumo del petróleo hace que, paralelamente a la creación de centros de explotación o refinación, se generan asentamientos humanos con sus correspondientes demandas de servicios y generación de aguas residuales y basura. Al no estar preparada la zona para el alto consumo del petróleo, la alteración del medio va en aumento junto con las afectaciones generadas por la propia planta industrial (Jiménez, 2001).

Los productos combustibles que diariamente se utilizan en el transporte tanto público como privado tales como gasolina, **Diesel**, combustóleo, gasóleo, gas avión y gas LP, son producidos y distribuidos en México por PEMEX. La comercialización a menudo de gasolina y diesel, se lleva a cabo en estaciones de servicio (gasolineras) y en estos lugares uno de los riesgos ambientales que involucra el manejo de estas estaciones, como se observa en la figura 2.2, son los derrames o fugas de combustibles que provocan la contaminación, tanto del suelo, como del agua en los sitios donde se encuentran los tanques de almacenamiento (Muñiz, 2007).

Otra fuente de contaminación de suelos en México son todas las empresas y pequeños negocios que contaminan al tirar sus desperdicios peligrosos, ya sea por ignorancia, intencionalmente o por descuido vierten los residuos peligrosos sin importarles el daño que puedan causar directamente al suelo (Jiménez, 2001).



---

## ***2.2 Características generales del diesel***

El petróleo y los productos derivados de él, son mezclas complejas que contienen primordialmente hidrocarburos (compuestos que contienen moléculas formadas por átomos de carbono e hidrógeno), compuestos de azufre, nitrógeno, y oxígeno y en menos proporción elementos metálicos.

La complejidad de los productos del petróleo se incrementa de acuerdo con el número de carbonos que contienen; mientras mayor es este número, que es el caso de los productos más pesados, mayor es el número de posibles combinaciones de los átomos. Por ejemplo, las gasolinas tienen un menor número de componentes que el diesel y esto se relaciona con el número de carbonos que contienen (es mayor número de carbonos en el diesel). Otro ejemplo de lo anterior, es que hay 75 combinaciones de moléculas que contienen 10 carbonos, en cambio, para moléculas que contienen 20 carbonos, el número de combinaciones posibles es de 366,319. Esto hace prácticamente imposible identificar todos los componentes del petróleo o algunos de sus productos, por lo que éstos se caracterizan en términos de intervalo en el que se encuentra su punto de ebullición y el número aproximado de átomos de carbono.

La composición del petróleo crudo varía de acuerdo con la localización del yacimiento, pero, invariablemente, los principales componentes son los alcanos. El gas natural se encuentra junto con el petróleo y está constituido principalmente por metano, mientras que el petróleo crudo es una mezcla sorprendente de hidrocarburos hasta el tamaño de C<sub>50</sub>.

El diesel es producido en primera instancia a partir de fracciones destiladas del petróleo crudo, con algo de mezcla con gasóleo. Los componentes mayores del diesel son similares a aquellos presentes en el petróleo crudo, pero incluyen una elevada proporción de aromáticos (arriba del 30 a 40%). Aunque el proceso de destilación del

petróleo crudo también produce pequeñas cantidades de alquenos, así como aromáticos, los alquenos producidos no se encuentran dentro del intervalo de carbonos para el diesel, por lo que terminan en la fracción de la gasolina. El intervalo típico de carbonos para el diesel grado No. 1 es de  $C_8$  a  $C_{17}$ , con una mayor proporción de intervalo entre  $C_{10}$  y  $C_{14}$  (similar al combustible Jet A y al Queroseno). El intervalo típico de carbonos para el diesel grado No. 2 es de  $C_8$  a  $C_{26}$ , con una mayor proporción en el intervalo de  $C_{10}$  a  $C_{20}$ . En todos los casos, la mayoría de los combustibles están entre un 60 y 90 % formados por alcanos normales, ramificados y cicloalcanos. El punto de ebullición de los compuestos que forman el diesel están entre 250 °C y 400 °C ( $C_{13}$  a  $C_{25}$ ) (Roberts *et al.*, 1974).

Los hidrocarburos totales del petróleo, HTP, han sido definidos como la concentración total de hidrocarburos extraídos y medidos por un método particular (Gustafson, 1998). Una misma muestra analizada por diferentes métodos puede producir diferentes valores de HTP. Los cuatro métodos más usados para determinar la concentración de fracción media de hidrocarburos (HTP) son:

1. Cromatografía de gases.
2. Espectrometría de infrarrojo.
3. Análisis gravimétricos.
4. Inmunoensayos.

A pesar que las agencias reguladoras de Estados Unidos han utilizado los HTP para establecer los niveles de limpieza en agua y suelo, los datos sobre las concentraciones de éstos no pueden ser utilizados para estimar cuantitativamente el riesgo para la salud humana, debido a que las concentraciones de HTP analizan el conjunto de compuestos y no cada uno de ellos.

La utilidad de los HTP radica en que se trata de una herramienta barata que puede ser usada con ciertos propósitos como:

- Determinar si existe un problema de contaminación.
- Evaluar la magnitud de la contaminación.
- Seguir la evolución de un proceso de remediación.

El diesel industrial es un producto altamente demandado por su alta eficiencia en la combustión, con muy buena carburación en todos los rangos de la flama. Sus principales usos son para Sistemas de Combustión Industrial de flama abierta como: calderas, quemadores y hornos. Y para uso en la Combustión Interna de motores de maquinaria pesada como: trascabos, tractores, trilladoras, etc. (Martín *et al.*, 2004).

En las siguientes tablas (2.3, 2.4 y 2.5) se muestra uso general de diesel industrial, las propiedades y medidas de seguridad para el mismo.

**Tabla 2.3 Tabla de Usos generales de Diesel Industrial**

Uso General del combustible Automotriz	
<b>Algunas aplicaciones</b>	Combustible para máquinas de combustión interna. Motores diseñados para combustibles Diesel (camiones de carga de servicio ligero y pesado, de construcción y automóviles, etc.)
<b>Presentaciones de ventas</b>	Líquido. Contrato: cantidad mínima de 6000 m <sup>3</sup> / año Sin contrato: cantidad mínima 35 Ton.
<b>Transporte</b>	Autotanques y Ductos
<b>Almacenamiento</b>	Tanques de almacenamiento

Fuente: Pemex, 2004

**Tabla 2.4** Tabla de propiedades de combustible en flama Diesel Industrial

PROPIEDADES	UNIDADES	DIESEL INDUSTRIAL
Densidad a 25° C	kg/L	0.83 a 0.845
Viscosidad a 38.8°C	SUS	30-34
Temp. de inflamación	Grados centígrados	68-74
Poder calorífico	kcal/Kg	10,500 - 10,680
Poder calorífico	kcal/Kg	8,700 - 9,000
Azufre	%vol.	< 0.05
Perfil de destilación	Grados centígrados	.....
Temp. inicial	Grados centígrados	190
10% de destila A	Grados centígrados	230
50% de destila A	Grados centígrados	300
Temp. Final	Grados centígrados	370
Contaminación	.....	sin humo y cenizas
Composición aproximada	.....	C <sub>13</sub> -C <sub>18</sub>

Fuete: Grupo Energéticos, 2010

**Tabla 2.5 Tabla de Medidas de seguridad para el Uso de Diesel Industrial**

Medida de seguridad para Deseles
Portar siempre la hoja de seguridad del producto en la unidad de arrastre.
No se deje al alcance de los niños.
Evitar el contacto con materiales oxidantes fuertes, tales como el ácido nítrico.
Evitar las fuentes de calor, chispas y flamas abiertas.
Ventilación adecuada.
Todo el equipo que se utilice para el manejo de esta sustancia debe de estar conectado eléctricamente a tierra.
Deben de evitarse temperaturas extremas en el almacenamiento de esta sustancia.
Los recipientes que haya almacenado este producto, no deben presurizarse, calentarse, soldarse a otras fuentes de ignición.
Debe evitarse la introducción de este producto a vías pluviales, alcantarillas, sótanos o espacios confinados.
No almacenar en contenedores sin etiquetas; los recipientes que contengan esta sustancia deben almacenarse separados de los vacíos y de los parcialmente vacíos.
Donde es probable el contacto repetido y prolongado, utilice gafas de seguridad con protección lateral, mangas largas y guantes resistentes a productos químicos.
En caso de incendios o derrames, emplear agua en forma de rocío o espuma regular, no utilizar chorro de agua.
En caso de contacto con los ojos, lavar inmediatamente la zona afectada con agua limpia corriente por lo menos durante 15 minutos, o hasta que la irritación disminuya.
En caso de ingestión no provocar el vómito y mantener a la víctima abrigada y en reposo.
En caso de contacto con la piel, retirar inmediatamente y confinar la ropa y calzados contaminados. Lavar la parte afectada con abundante agua, empleando jabón si se encuentra disponible.
En caso de inhalación, retirar a la víctima a un lugar bien ventilado y donde se respire aire fresco.

Fuente: Pemex, 2004

---

### **2.2.1 El diesel como contaminante de suelos**

El comportamiento de los hidrocarburos en el suelo está controlado en gran medida por propiedades físicas del suelo (como textura, porosidad, permeabilidad y pH) y por el contenido de materia orgánica, como se describió anteriormente.

Cuando los contaminantes orgánicos, como el diesel, llegan al suelo, puede presentarse como vapores o líquidos, adsorbidos o disueltos. Pueden tener varios destinos (Brady, 1999):

- 1) Escapar como vapor a la atmósfera sin ningún cambio químico.
- 2) Ser adsorbidos en el suelo.
- 3) Moverse hacia abajo a través del suelo hacia los mantos acuíferos.
- 4) Sufrir reacciones químicas.
- 5) Ser asimilados por los microorganismos del suelo.
- 6) Moverse con la escorrentía superficial y
- 7) Ser asimilados por las plantas y animales y trasladarse a la cadena trófica.

Los derrames accidentales y las fugas de materiales y residuos peligrosos es quizá la causa de la mayoría de las afectaciones que se producen en sitios localizados. Un porcentaje significativo de derrames de materiales peligrosos se relaciona con productos del petróleo, solventes volátiles o hidrocarburos totales de petróleo (HTP). El uso generalizado de combustibles en diversas actividades industriales y su almacenamiento en tanques, algunos de ellos enterrados, han hecho de los hidrocarburos del petróleo como diesel el contaminante más importante de suelo, (Canals, 2005).

De acuerdo con los datos de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) registrados en el período de 1995 a 2000, las sustancias más frecuentes involucradas en eventos de contaminación por fugas o derrames de materiales o

residuos peligrosos fueron hidrocarburos (petróleo crudo, combustóleo, diesel, gasolina, gas natural y gas L.P.), amoniaco, ácido sulfúrico, asfalto, ácido clorhídrico, cloro, mezclas de solventes y aceites gastados, principalmente. En este mismo periodo, de 108 sitios contaminados por residuos o materiales peligrosos identificados por la PROFEPA, 19 corresponden a grasas y aceites residuales y 11 corresponden a derrames de hidrocarburos (PROFEPA, 2000).

Con respecto al diesel se sabe que están constituidos de una mezcla muy compleja de distintos compuestos químicos. Gran parte de ellos pueden ser metabolizados y convertidos en  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  por diversos organismos marinos y terrestres, fundamentalmente bacterias y hongos, que son bastante frecuentes y ubicuos. Sin embargo; existen varios factores que dificultan el proceso de degradación. El principal es que el petróleo contiene mucho carbono y bastante azufre en formas asimilables por los microorganismos, pero tiene muy poco nitrógeno y fósforo, y como todos los seres vivos los microorganismos necesitan aporte equilibrado de diferentes nutrientes. Por lo tanto los hidrocarburos de petróleo no podrán ser metabolizados eficientemente por los microorganismos a menos que se suministre fuentes de nitrógeno y fósforo adecuada (Casal *et al.*, 2004).

Un segundo factor que limita la degradación del diesel es la insolubilidad en agua de la mayoría de sus componentes, lo que limita su biodisponibilidad, es decir, la facilidad con la que serán captados por los microorganismos. Muchos microorganismos han desarrollado diversas estrategias para poder captar los hidrocarburos de diesel insolubles más eficientemente. Las más comunes son las excreción al medio de las moléculas que facilitan la solubilidad o la dispersión de estos compuestos en el agua, o el desarrollo de superficies celulares hidrófobas que permiten al microorganismo adherirse a la interface entre el agua y petróleo, captando así los hidrocarburos directamente sin necesidad de que se disuelvan previamente en el agua. Un tercer factor que limita la degradabilidad del petróleo es la relativa toxicidad de muchos de sus componentes. Moléculas como el benceno, el xileno, y todos sus análogos son bastante tóxicas y normalmente sólo se degradan

---

bien si están en concentraciones moderadas. Asimismo, muchos compuestos poliaromáticos tienen actividad mutagénica. Finalmente, la disponibilidad de oxígeno es también importante (Anderson *et al.*, 1993).

Por lo tanto, la degradación del diesel en suelos contaminados es relativamente eficiente en la zona más superficial, en la que hay oxígeno, pero es muy lenta en capas más internas (a más de 10 centímetros de profundidad), donde el oxígeno escasea. Aunque existen microorganismos capaces de degradar hidrocarburos en ausencia de oxígeno (anaeróbicamente), crecen más lentamente que los microorganismos aeróbicos, y el proceso degradativo es más eficiente (Bossler y Bartha, 1999).

Los derrames de diesel provocan daños genéticos y muerte a manglares, pastos marinos, humedales y plantas terrestres. También incrementan o reducen la biomasa y actividad fotosintética de comunidades de fitoplancton, al reducir la cantidad de luz, alterando el pH, disminuyendo la cantidad de oxígeno, disminuyendo la disponibilidad de alimento (Hoffman *et al.*, 2003).

### **2.3 Características generales de tipo de suelos**

La matriz del suelo constituye un recurso natural que desempeña diversas funciones en la tierra, proporcionando un soporte mecánico así como nutrientes para el crecimiento de plantas y microorganismos. 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, y usualmente conforman de 25 a 50 % del volumen total. La proporción relativa aire/agua fluctúa considerablemente con el contenido de humedad del suelo. El material orgánico ocupa entre 3 a 6 % de volumen promedio, mientras que los organismos vivos constituyen menos del 1 % (Volke y Velasco, 2002).

El suelo funciona como filtro químico y biológico que amortigua el impacto ambiental de los contaminantes orgánicos derramados en la biosfera. Es un cuerpo natural y organizado, con unos constituyentes, propiedades y génesis que son el resultado de la interacción de una serie de factores activos (clima, organismos, relieve, y tiempo) sobre el material pasivo (roca madre). Se define también como la región que sustenta la vida vegetal y de la cual las plantas obtienen soporte mecánico y nutrimentos. Este ambiente es uno de los sitios más dinámicos en interacciones biológicas en la naturaleza, en el cual se realizan la mayor parte de las reacciones bioquímicas involucradas en la descomposición de materia orgánica, la intemperización de las rocas y la nutrición de cultivos agrícolas (Jiménez, 2001).

También es un elemento que regula los ciclos del agua siendo un amortiguador y transformador, que tiene la propiedad de retener sustancias mecánicamente o fijarlas por adsorción, contribuyendo a la protección de aguas subterráneas y superficiales contra la penetración de agentes nocivos. El suelo además, promueve fenómenos de transpiración del aire a través de la superficie. También es un soporte físico de infraestructura. Por sus características físicas, químicas y mecánicas, el suelo posee propiedades de soporte para el desarrollo de actividades forestales, recreativas y agropecuarias, además de socioeconómicas como vivienda, industria y carreteras, entre otras (Brady, 1999).

El suelo posee materiales no renovables por lo que es un yacimiento de materias primas, como minerales no metálicos de interés para la construcción, minerales metálicos y combustibles fósiles como el petróleo (Colín, 2005).

### 2.3.1 Importancia de sus propiedades en su depuración

#### Textura

Las distintas porciones de arena, limo y arcilla definen la textura de cada suelo y horizonte. Las partículas del suelo se distribuyen en diversas fracciones atendiendo a su tamaño. El tamaño de las partículas minerales individuales puede ser: Arcilla (<0.002 mm); limo (0.002-0.02); arena (0.02-2.0 mm); grava >2mm (Porta *et al.*, 1994).

En la tabla 2.6 se observa la influencia de la textura en el comportamiento del suelo. Pueden ocurrir excepciones a estas generalizaciones, especialmente resultado de la estructura del suelo y la mineralogía de la arcilla (Brad, 1999).

En caso de contaminantes de suelos con hidrocarburos, el tamaño de partícula predominante es una característica importante, debido a que a mayor superficie activa mayor será la cantidad de hidrocarburo adsorbido. Además, la oxidación microbial ocurre en la interface agua- sólido de la superficie de una partícula, entonces la degradación microbial es más eficiente en partículas finamente divididas (Porta *et al.*, 1994).

**Tabla 2.6 Influencia de la textura en el comportamiento del suelo**

Propiedad / Comportamiento	Arena	Limo	Arcilla
Capacidad del mantener el agua	baja	media a alta	alta
Aireación	bueno	media a alta	pobre
Tasa de drenaje	alta	lenta a media	muy lenta
Materia orgánica del suelo	baja	media a alta	alta a media
Descomposición de la materia orgánica	rápida	media a alta	lenta
Compactibilidad	baja	media a alta	alta
Potencial de lixiviación del contaminante	alto	medio	bajo
Habilidad de almacenar nutrientes para la planta	pobre	medio	alto
Resistencia al cambio de pH	bajo	medio	alto

Para realizar la clasificación textural, se utiliza el triángulo textural que divide en 12 clases texturales básicas, que dependen del porcentaje de las fracciones antes mencionadas en él. En la figura 2.3 se presenta el triángulo textural que explica la relación en porcentaje de cada una de las fracciones con respecto a las demás (Pérez, 2006).

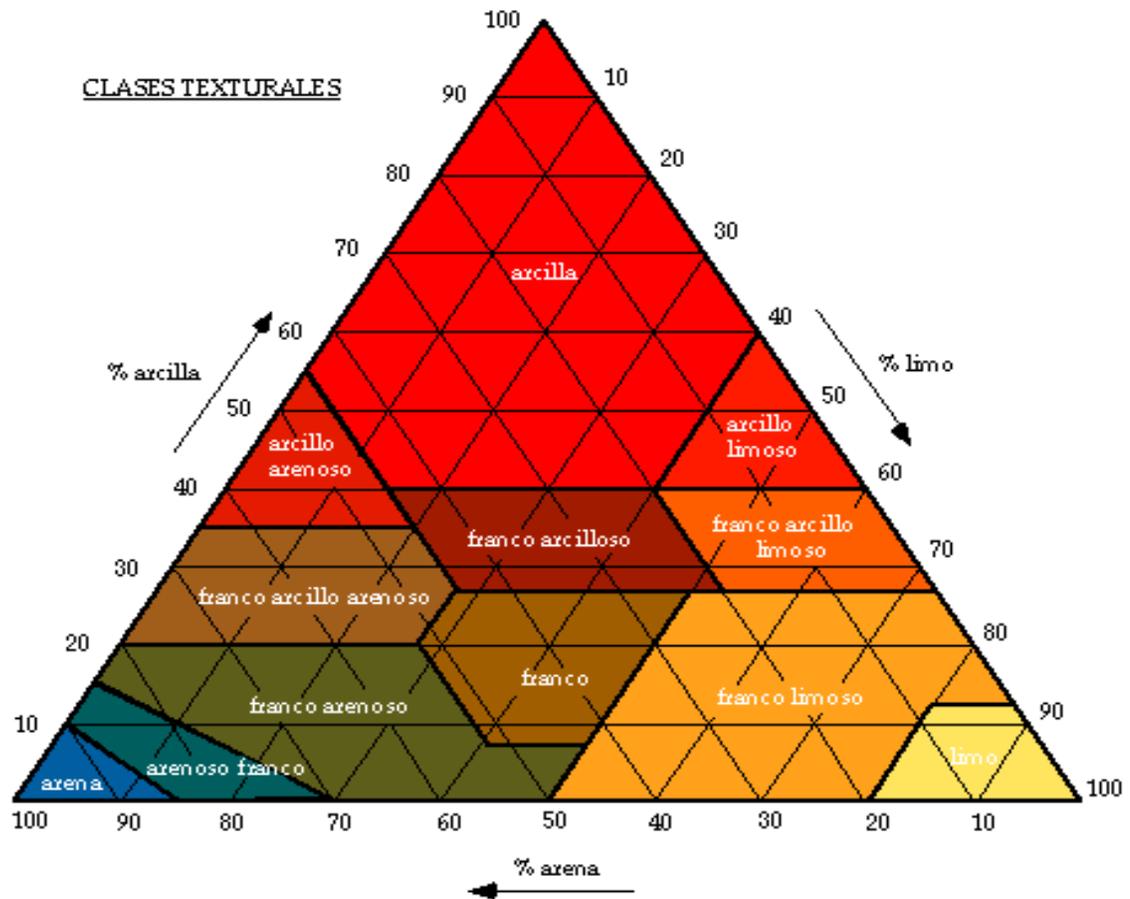


Figura 2.3 Triángulo de textura (Fuente: Crespo Picahardo, 2008).

Por ejemplo, una mayor cantidad de agua se infiltra a través del suelo si atraviesa una arena gruesa, que si lo hace a través de una arcilla la movilidad de los hidrocarburos solubles en agua, dependerá de la permeabilidad de los suelos.

---

## **Potencial Hidronio pH**

El pH del suelo se refiere a la acidez relativa de la solución del suelo. El estrato acuoso en la superficie de las partículas del suelo es la región de mayor abundancia en microorganismos. Para que esta actividad bacteriana sea óptima se requiere un pH de 7 (Cole, 1994).

## **Materia orgánica**

Los principales constituyentes de la materia orgánica (MO) del suelo, son: carbono (52-58 %), oxígeno (34-39 %), hidrógeno (3-4 %) y nitrógeno (3.7-4.1 %). Esta materia orgánica está constituida principalmente de sustancias húmicas y no húmicas (que se originan por la descomposición de biomasa). La materia orgánica mejora la estructura del suelo, la capacidad de retención del agua, la aireación y la agregación. Es una fuente importante de micronutrientes (B y Mo) y macro nutrientes (N, P y S). Su alto contenido de carbono es fuente de la energía necesaria para las actividades de la micro y macro fauna (Cole, 1994).

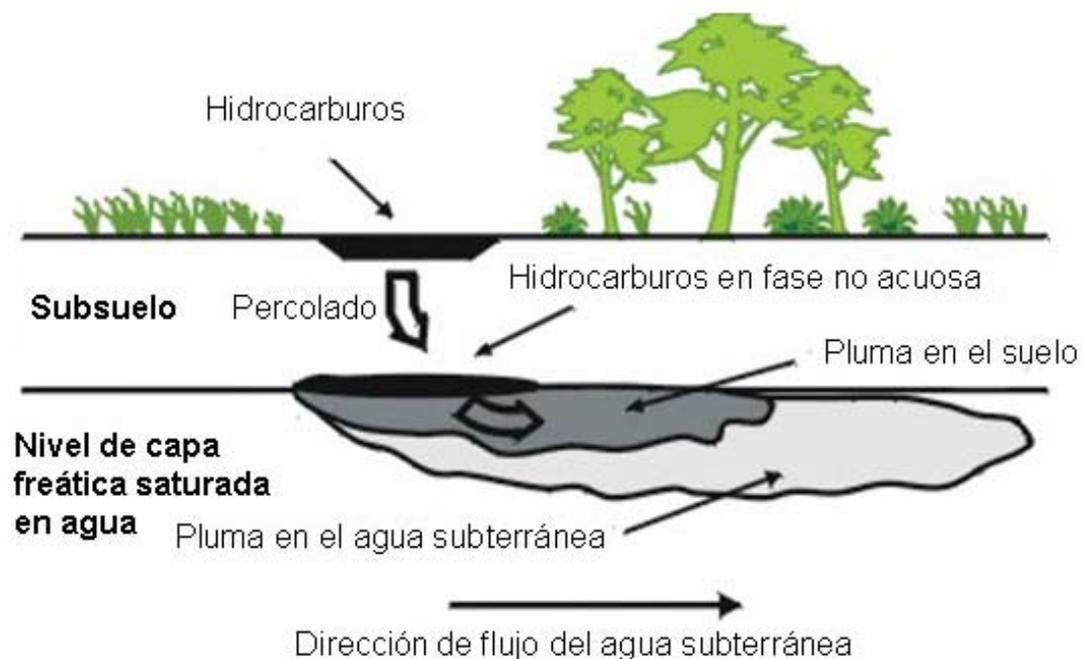
## ***2.4 Tecnologías de remediación para suelos contaminados por hidrocarburos***

El término tecnología de tratamiento implica cualquier operación unitaria o serie de operaciones unitarias que altera la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (EPA, 2001).

Las tecnologías de remediación representan una alternativa a la disposición en tierra de desechos peligrosos que no han sido tratados, y sus capacidades o posibilidades de éxito, bajo las condiciones específicas de un sitio, pueden variar ampliamente (Volka y Velasco, 2002).

Factores que inciden en la eficiencia de una tecnología de remediación:

El comportamiento de un contaminante en el suelo (como se observa en la figura 2.4), así como la efectividad de una tecnología de remediación, están determinados por una variedad de factores que interactúan de manera compleja y que dependen de las características propias del contaminante así como de las del suelo (AEET, 2006).



**Figura 2.4 Pluma de hidrocarburo durante su infiltración vertical sobre suelo y el manto acuífero (AEET, 2006).**

Por consiguiente, para la selección adecuada de una tecnología de remediación con buenas perspectivas de éxito, es indispensable considerar tanto las propiedades del contaminante como las del sitio contaminado.

---

En general, dentro de los factores a considerar se encuentran los siguientes: a) procesos químicos (reacciones de hidrólisis, oxidación, reducción, fotólisis); b) procesos físicos o de transporte (sorción, advección, dispersión, difusión, volatilización y solubilización; c) y procesos biológicos (degradación, biotransformación y toxicidad) (Volka-Velasco, 2002).

Como se mencionó, el uso de una tecnología de remediación en particular depende, además de los factores específicos del sitio y de las propiedades fisicoquímicas del contaminante, de su disponibilidad, de la fiabilidad demostrada o proyectada, de su estado de desarrollo y de su costo (Cunningham, *et al.*, 1993).

Antes de considerar la aplicación de cualquier tecnología de remediación, es fundamental conocer ciertas características, tanto del suelo (ambientales), como del contaminante y de los organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) presentes en el sitio, con potencial metabólico para degradar los contaminantes. De esta manera, los procesos de remediación dependen de estos tres factores que deben encontrarse en equilibrio (Casal *et al.*, 2005).

La obtención de esta información requiere de muestreo y determinación de las características físicas y químicas que se describen a continuación:

*Factores ambientales.* Dentro de los factores más importantes para la remediación de un suelo se encuentran las condiciones ambientales y las características *fisicoquímicas* del suelo (Muñiz, 2007).

- i) **Temperatura.** Puede afectar propiedades del contaminante así como la velocidad de un proceso de biorremediación, ya que la velocidad de las reacciones enzimáticas depende de ésta.

- 
- ii) **Humedad.** Una alta humedad en el suelo provoca problemas durante la excavación y el transporte así como aumentos en los costos durante el uso de métodos térmicos. La humedad también puede afectar los procesos de biorremediación debido a que, en general, aunque todos los microorganismos necesitan agua para subsistir, debe existir balance, ya que si el contenido de agua es muy bajo, la actividad microbiana se detiene, y si es muy alto, disminuye el intercambio gaseoso a través del suelo.
  - iii) **Tipo de suelo.** La capacidad de retención de agua de un suelo varía en función de las fracciones orgánicas y minerales. En general, los materiales no consolidados (arenas y gravas finas) son más fáciles de tratar. Asimismo a mayor tamaño de partícula en la fracción mineral, la permeabilidad y la aireación son mayores. La capacidad de retención de agua en un suelo aumenta proporcionalmente al contenido de materia orgánica. Un suelo con alto contenido de humedad disminuye la movilidad de compuestos orgánicos y con ellos la eficiencia de ciertas tecnologías, como el lavado de suelo.
  - iv) **pH.** El pH afecta la solubilidad y disponibilidad de macro y micro-nutrientes, la movilidad de metales y la reactividad de minerales. Generalmente, los metales son móviles a pH bajo, en forma de especies iónicas libres o como órgano-metales solubles; al pH alcalino forman carbonatos o fosfatos minerales insolubles. La actividad y crecimiento microbianos son fuertemente afectados por el pH. La mayoría de las bacterias tienen un rango óptimo de 6.5 a 8.5; si el suelo es ácido se favorece el crecimiento de hongos.
  - v) **Aceptores de electrones.** Su presencia es importante para aplicación de tecnologías de biorremediación. La mayoría de estos son compuestos inorgánicos oxidados.
  - vi) **Potencial Redox.** Mide la oxidación relativa de una solución acuosa y normalmente se encuentra controlado por el contenido de humedad del suelo. En ambientes anaerobios reducidos, los metales precipitan debido a la presencia de iones ferrosos y carbonatos; en cambio, bajo condiciones oxidantes, los metales se hacen más solubles.
  - vii) **Permeabilidad.** Se refiere a la facilidad o dificultad con la que un líquido puede fluir a través de un medio permeable. La permeabilidad de un suelo es uno de los

factores que controla la efectividad de la tecnología in situ. En general, una baja permeabilidad en el suelo disminuye la efectividad de la mayoría de las tecnologías de remediación. Características de los contaminantes (Volka-Velasco, 2002).

La naturaleza y característica del contaminante es otra variable de suma importancia para el éxito o fracaso de un proceso de remediación. Dentro de las más importantes se encuentran: toxicidad, concentración, disponibilidad, solubilidad y sorción del contaminante a la superficie sólida (Muñiz, 2007).

- i) **Toxicidad.** El factor clave para decidir la remediación de un sitio es la toxicidad para los seres vivos. La descarga de químicos tóxicos a un suelo implica, entre muchos otros problemas, que son generalmente resistentes a la biodegradación. La biorremediación se inhibe si un químico es tóxico para los organismos degradadores.
- ii) **Concentración.** La concentración de un compuesto en un suelo es un factor de gran importancia para definir el uso de una tecnología de remediación en particular. En general, altas concentraciones inhiben la actividad microbiana; sin embargo, ésta depende de la estructura del contaminante. Algunos químicos pueden ser inhibitorios en baja concentración, mientras que otros pueden serlo en cantidades mayores.
- iii) **Solubilidad.** Es la cantidad de un elemento o compuesto que puede disolverse en agua. Los químicos difieren significativamente entre sí en cuanto a su solubilidad en agua. En general, esta disminuye al aumentar el tamaño de la molécula y los compuestos polares son más solubles que los no polares. Mientras mayor es la solubilidad de un compuesto, mayor es su biodisponibilidad.
- iv) **Sorción.** La sorción de un químico a la matriz sólida del suelo afecta su solubilidad y su biodisponibilidad. La sorción incluye la adsorción (retención superficial) y la absorción (captación hacia el interior de la matriz). La sorción de un contaminante a las partículas del suelo puede no sólo provocar la falta de biodisponibilidad, sino que también dificultar su extracción química.

v) **Volatilidad.** Es la tendencia de un compuesto o elemento para moverse de una fase líquida a sólida a una gaseosa. Entre metales, el Hg y el Se tienen formas volátiles.

vi) **Polaridad y carga iónica.** Los compuestos no polares tienden a ser hidrofóbicas y se concentran en la materia orgánica del suelo. Los compuestos no polares generalmente tienen menos movilidad en el suelo que los polares. La carga iónica determina la capacidad de un compuesto para su adsorción en un sólido (Volka-Velasco, 2002).

Factores microbiológicos. Es un factor de importancia para la aplicación de tecnologías biológicas, este tipo de factores implica la verificación de la existencia de poblaciones de microorganismos degradadores, es decir, si existen grupos microbianos capaces de degradar o transformar el contaminante y si estos se encuentran en número suficiente. Las poblaciones microbianas pueden encontrarse en número suficiente en el sitio a tratar (autóctonas o nativas) o bien pueden adicionarse poblaciones nativas aumentadas en laboratorio u organismos genéticamente modificados (Muñiz, 2007).

#### Tecnologías de Remediación:

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base en su estado de desarrollo (tradicionales e innovadoras), el lugar en donde se realizan (*in situ* y *ex situ*) y, en el caso de la contaminación por metales, con base en la alteración de propiedades del contaminantes (Muñiz 2007).

#### *Lugar de tratamiento*

Con base en el lugar en donde se lleva a cabo el tratamiento de un suelo, las tecnologías se pueden clasificar *in situ* o *ex situ*:

***In situ***: Los tratamientos *In situ* son aquellos que permiten tratar el suelo contaminado sin la necesidad de excavar o transportar el suelo fuera de la zona (espacio) contaminada, lo cual genera una disminución de los costos. Este tipo de tratamiento requiere de periodos largos, además de que existe la posibilidad de que el tratamiento de remediación no sea uniforme dada la variabilidad de las características del suelo y debido a que es más difícil de verificar la eficiencia de los procesos empleados (Volka-Velasco, 2002).

***Ex situ***: Los tratamientos fuera de sitio son aquellos que requieren de una excavación del suelo contaminado antes de realizar los procesos de remediación, lo cual incrementan los costos. Este tipo de tratamiento, generalmente requieren periodos cortos y presenta una mayor certeza de la uniformidad de los procesos empleados debido a que se puede obtener una adecuada homogeneización del suelo. En general, existe un mejor manejo del suelo contaminado, sin embargo, esto puede presentar condiciones de exposición a los trabajadores. (Volka-Velasco, 2002), en la tabla 2.7 se muestra las ventajas y desventajas de remediación *in situ* y *ex situ*.

**Tabla 2.7 Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación *In situ* y *ex situ* (Instituto de Ecología) Fuente: Velasco, 2002.**

Características	<i>In Situ</i>	<i>Ex situ</i>
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Permite tratar el suelo sin necesidad de excavar ni transportar.</li> <li>*Potencial de disminución de costos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Menor tiempo de tratamiento.</li> <li>*Uniformidad: es posible homogeneizar y muestrear periódicamente.</li> </ul>
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Mayores tiempos de tratamiento.</li> <li>* Pueden ser inseguros en cuanto a la uniformidad: heterogeneidad en las características del suelo.</li> <li>*Dificultad para verificar la eficacia del proceso.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>*Necesidad de excavar el suelo.</li> <li>*Aumento en costos e ingeniería para equipos.</li> <li>*Debe considerarse la manipulación del material y la posible exposición al contaminante.</li> </ul>

***Remediación biológica.***

La remediación biológica se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan el potencial metabólico de organismos vivos (plantas, hongos y bacterias, entre otros) para limpiar ambientes contaminados. La biorremediación de un suelo implica su descontaminación por vía biológica. En el caso de los sitios contaminados con metales, los microorganismos pueden modificar su movilidad en el ambiente a través de cambios en sus características físicas o químicas (Volka-Velasco, 2002).

***Remediación fisicoquímica.***

Los tratamientos fisicoquímicos utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para transformar, separar o inmovilizar el contaminante. Son tratamientos económicamente factibles y la mayoría se encuentra disponible comercialmente, por lo cual son las técnicas más empleadas para la remediación de diferentes matrices contaminadas con los residuos peligrosos desde hace décadas. Estas tecnologías involucran una variedad de procesos como, mezclado, neutralización, filtración, sorción, absorción, evaporación y floculación, entre otros (Volka-Velasco, 2002).

En la tabla 2.8, se observa las ventajas y desventajas de la remediación biológica y fisicoquímicas

**Tabla 2.8 Ventajas y desventajas de las tecnologías de remediación clasificadas de acuerdo con el tipo de tratamiento. Fuente Volka-Velasco, 2002.**

	<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
<b>Tratamientos biológicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Son efectivos en cuanto a costos.</li> <li>* Son tecnologías más benéficas para el ambiente.</li> <li>* Los contaminantes generalmente son destruidos.</li> <li>* Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Requieren mayores tiempos de tratamiento.</li> <li>* Es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos.</li> <li>* No pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano.</li> </ul>
<b>Tratamientos fisicoquímicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Son efectivos en cuanto a costos.</li> <li>* Pueden realizarse en periodos cortos.</li> <li>* El equipo es accesible y no necesita de mucha energía ni ingeniería.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Los residuos generados por técnicas de separación, deben tratarse o disponerse: aumento en costos y necesidad de permisos.</li> <li>* Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación.</li> </ul>
<b>Tratamientos térmicos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Son efectivos a corto plazo de tiempo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Es el grupo de tratamientos más costosos.</li> </ul>

### **2.4.1 Fito-remediación como alternativa**

El término fito-remediación (phyto = planta y remedium = corregir un mal) fue acuñado en 1991 (EPA, 2000). Se determina como un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ* (Van Deuren *et al.*, 1997).

La fito-remediación incluye cualquier proceso biológico, físico o químico que, mediado por plantas, ayuda a la adsorción, secuestro y degradación de los contaminantes, ya sea por las plantas mismas o por microorganismos que se desarrollan en la rizósfera.

Existen diferentes tipos de fito-remediación como se muestra en la figura 2.5 en función de la forma y lugar de actuación. Los mecanismos de fito-remediación incluyen: rizo-degradación, la fito-extracción, la fito-degradación y la fito-estabilización.

En la tabla 2.9, se muestra las características y funciones derivadas de la Fito-remediación (Casal *et al.*, 2004).

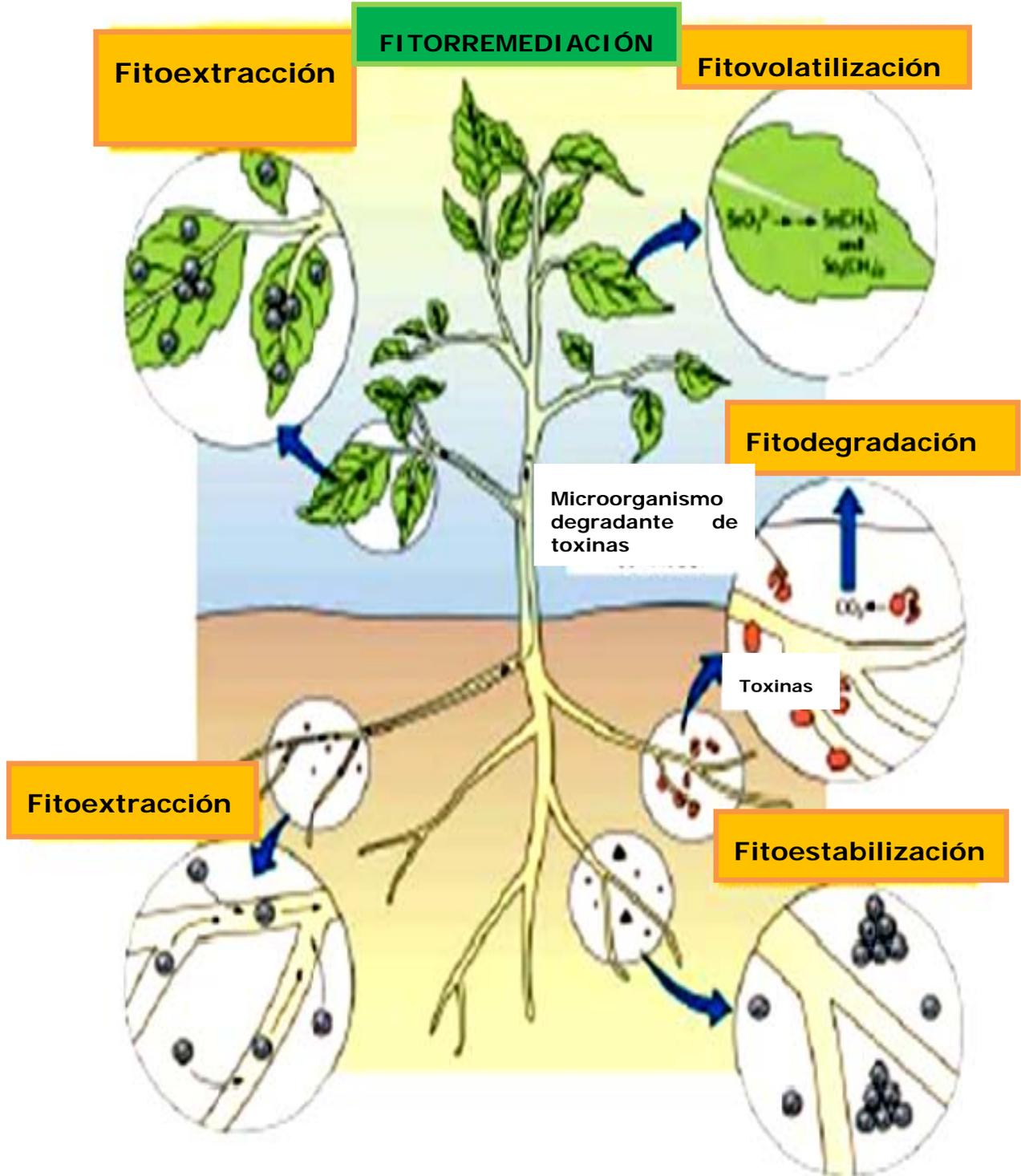


Figura 2.5 Diferentes mecanismos de fito-remediación.  
(Fuente Casal *et al.*, 2004)

**Tabla 2.9 Características y funciones en la fito-remediación.**  
Fuente (Casal *et al.*, 2004)

<i>Mecanismo de Fito-remediación</i>	<i>Característica</i>	<i>Función</i>
<b>Rizo-degradación</b>	* Se lleva a cabo en el suelo que rodea a las raíces.	* Las sustancias que excretadas naturalmente por éstas, suministran nutrientes para los microorganismos, mejorando así su actividad biológica.
<b>Fito-extracción</b>	* Los contaminantes son captados por las raíces, tallo y hojas de la planta.	* Cuando es captado por la raíz (fito-acumulación), posteriormente estos son trasladados y/o acumulados hacia los tallos y hojas (Fito-extracción).
<b>Fito-estabilización</b>	* Las plantas limitan la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo.	* Las raíces producen compuestos químicos que pueden absorber y/o formar complejos con los contaminantes, inmovilizándolos así en la interface raíces-suelo.
<b>Fito-degradación</b>	* Metabolizar el contaminante en los tejidos de la planta.	* Consiste en el metabolismo de contaminantes dentro de los tejidos de la planta, a través de enzimas que catalizan su degradación.

#### **2.4.2 Ventajas y Desventajas de la Fito-remediación**

El éxito de la fito-remediación depende de la edad y el tipo de la planta, concentraciones de nutrientes en el suelo, características del suelo, tipo y concentración del contaminante. Su principal inconveniente es la lentitud, ya que las plantas eliminan o degradan solo una pequeña cantidad del contaminante durante cada ciclo de cultivo, por lo que se requieren varias décadas para limpiar adecuadamente un suelo contaminado. Las ventajas y desventajas de la fito-remediación se muestran en la tabla 2.10.

**Tabla 2.10 Principales ventajas y desventajas de la fito-remediación (Casal *et al.*, 2004)**

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Incrementa la mineralización de los contaminantes.	Los contaminantes pueden pasar a otras cadenas tróficas.
Bajos costos.	Alcance aproximado de 2-5 mts.
Minimiza disturbio a los ecosistemas.	El contaminante puede ser tóxico para las plantas.
Evita la erosión.	Las plantas exóticas pueden ser dañinas a los ecosistemas.
Aumenta la disponibilidad del contaminante.	Proceso lento.
Evita la erosión.	
Puede abarcar grandes extensiones de suelos contaminados.	

La técnica de Fito-remediación, que utiliza la vegetación para la descontaminación *in situ* de suelos y sedimentos contaminados por metales pesados y contaminantes orgánicos, se está erigiendo como una tecnología emergente. Tal como se muestra en la figura 2.6, las plantas pueden degradar a los contaminantes por medio de tres mecanismos (Colín, 2001):

- Absorción directa de los contaminantes y su acumulación en el tejido de la planta (fito-extracción).
- Liberación al suelo de oxígeno y sustancias bioquímicas, como por ejemplo enzimas que estimulan la biodegradación de los contaminantes.
- Intensificación de la biodegradación por los hongos y microbios localizados en la interface suelo-raíz.

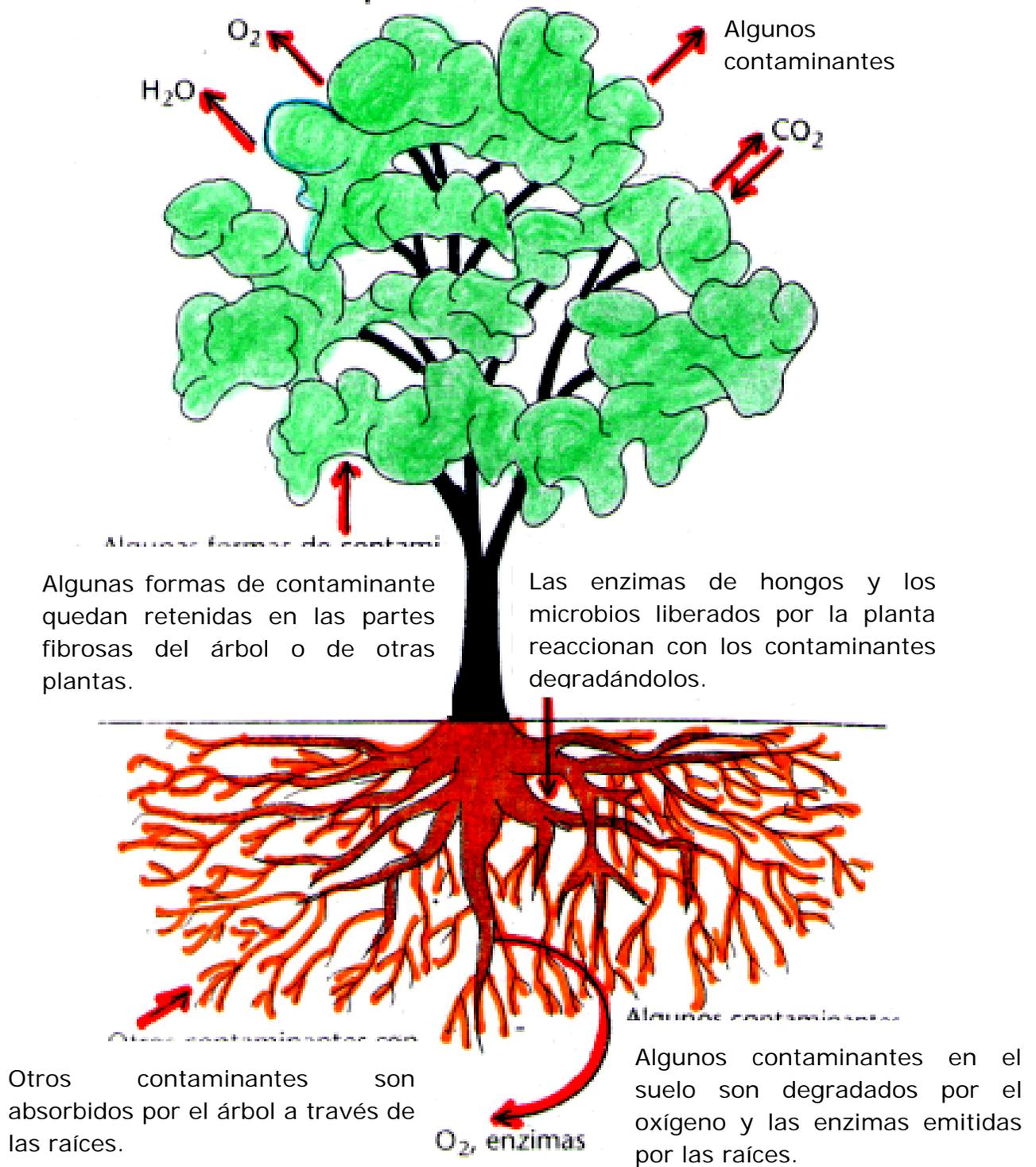


Figura 2.6 Mecanismos de fito-remediación de una planta. Fuente (Colín, 2001)

---

Ciertas plantas son *hiperacumuladores* de contaminantes, es decir, son capaces de absorber niveles muchos más altos de estos contaminantes que el promedio (en un factor entre 10 y 100, para dar una concentración de contaminante en la planta de 0,1 % o más), a través de sus raíces y concentrarlos mucho más de lo que lo hacen las plantas normales. Esta capacidad probablemente evolucionó a lo largo de períodos de tiempo a medida que las plantas crecieron en suelo naturales que contenían elevadas concentraciones de contaminantes (Juárez, 2007).

La dificultad de la Fito-remediación es que los hiperacumuladores usualmente son plantas que crecen lentamente y, por tanto, acumulan con lentitud a los contaminantes. En general es necesario recolectar las plantas antes de que pierdan las hojas o empiecen a pudrirse, con el fin de que los contaminantes absorbidos no se dispersen o retornen al suelo (Juárez, 2007).

Las plantas pueden absorber, de forma eficiente, sustancias orgánicas moderadamente hidrofóbicas como los componentes BTX y algunos disolventes clorados. Sustancias más hidrofóbicas, se enlazan muy fuertemente a las raíces y no son asimilados por la planta. Una vez absorbidos, la planta almacena la sustancia por medio de su transformación en un componente de la lignina, o bien es metabolizado y los productos son liberados a la atmósfera.

Los experimentos realizados en diversos lugares de ensayo han mostrado que la fito-remediación puede utilizarse con éxito para degradar los productos derivados del petróleo en suelos; y para fortalecer la técnica y remediación se requiere de una técnica que fortalezca a la planta durante la fito-remediación (Colín, 2001), en donde además se promueva el crecimiento de microorganismos asociados a las raíces de la planta, una de ellas es la utilización de microorganismos en la rizósfera, dichos microorganismos son las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (Casal *et al.*, 2004).

---

## **2.5 La importancia de la especie vegetal y la rizósfera**

El ciclo de vida de una planta tiene efectos profundos en los procesos químicos, físicos y biológicos que se presentan en la vecindad inmediata donde ésta se encuentra. Las plantas alteran profundamente el suelo que tienen alrededor, al adquirir agua, nutrimentos y al fenecer. Las raíces en particular, tienen un papel relevante en el área del suelo que ocupan (Cunningham, 1996).

Las sustancias naturales liberadas por las raíces de las plantas (azúcares, alcoholes, ácidos) contienen carbón orgánico que actúan como recurso de nutrientes para los microorganismos del suelo, esta adición de nutrientes estimula la actividad microbiana hasta 20 veces más que la normalmente presentada en la parte del suelo sin raíces, por otra parte, otros estudios demuestran que la rizósfera puede tener de 10 a 100 veces más microorganismos que el resto del suelo (Sutherland, 2002).

Los pastos de pradera se han aplicado para la restauración de suelos contaminados con HTP y se sugiere que las raíces de estos pastos pueden ser muy efectivas para la estimulación de la microflora en la rizósfera debido a sus fibras naturales. Estas fibras proveen de más área superficial a la raíz para la colonización microbiana que otras raíces y esto resulta en un incremento en la población microbiana del suelo contaminado (Tortora, 1993).

De esta forma las raíces afectan las propiedades de su propio ambiente, alteran el pH, la composición del suelo, aire y actividad microbiana dando como resultado un microambiente muy diferente en la rizósfera, comparada con el resto del suelo (Cristensen *et al.*, 1995).

---

### **2.5.1 Rye grass (*Lolium perenne*) especie vegetal para Fito-remediación**

Para aplicar fitorremediación, las especies se seleccionan teniendo en cuenta la tolerancia al contaminante, el potencial de evapotranspiración, las enzimas degradativas que producen, las tasas de crecimiento, el tipo de crecimiento radicular y la capacidad para bioacumular y/o degradar los contaminantes, además de otros factores como ser la biodisponibilidad de los contaminantes debido a la absorción por las partículas del suelo y la adecuada actividad microbiana (Jonson *et al.* 2002);

Los contaminantes de naturaleza orgánica e inorgánica pueden ser absorbidos por las plantas, como sucede con *Lolium perenne* en suelos contaminados por diesel (Gunther *et al.*, 1996).

El Rye grass (*Lolium perenne*) o raigrás, es uno de los géneros de nueve especies euroasiáticas de hierbas anuales o perenes, mesotérmicas, con hojas planas y tiernas. Poseen una espiga terminal, dística, comprimida, con el raquis articulado. Las espiguillas son plurifloras, alternas y solitarias en cada nudo, las laterales con una sola gluma y la terminal con dos, dispuestas en el mismo plano que el raquis. La flor hermafrodita con tres estambres. Dentro del género se encuentran especies de gran importancia forrajera en regiones de clima templado con el "Rye grass anual" (*Lolium multiflorum*) y el Rye grass (*Lolium. perenne*). Además, es un cultivo importante en la explotación agropecuaria debido a sus posibilidades de producción de forraje de calidad en las épocas más deficitarias e inclusión en rotaciones como cultivo intercalar. Además presenta un ciclo anual y tiene una buena adaptación a la climatología e idóneo para desarrollarse a bajas temperaturas y con coincidencia habitual con los meses de mayor precipitación.

En el 2004 se realizó un experimento utilizando Rye grass (*Lolium perenne*) en un suelo contaminado con diesel. La relación entre las varias especies de crecimiento, la actividad microbiana y la tasa de disipación del diesel fueron monitoreadas. Los

---

resultados indicaron que el crecimiento del Rye grass puede disminuir los umbrales de disipación de diesel en el suelo.

La tasa residual de diesel en la rizósfera fue 55% menor que en la correspondiente al suelo libre de contaminantes y la reducción ocurrió posterior al crecimiento de la raíces. En la rizósfera el número de bacterias aerobias y la cantidad de actividad de la deshidrogenasa fueron mayores que en la zona libre de raíces, además expuso una correlación con el crecimiento de las mismas.

Además la tasa de la disipación por la actividad de la deshidrogenasa fue mayor en la rizósfera que en la zona libre de raíces. En conclusión, las raíces del Rye grass se determinaron como eficaces para la biodegradación del suelo contaminado con diesel

Se han utilizado distintas especies de *Lolium perenne* midiendo la respuesta de los microorganismos nativos y la inoculación de BPCV en un suelo contaminado con HAP, en donde no se observaron diferencias en los tratamientos pero no se notó un incremento en la comunidad microbiana y su actividad.

En el 2006, se realizó un estudio experimental para observar la contaminación por diesel en estratos bien definidos del suelo y ver la distribución y desarrollo de las raíces, utilizando *Lolium perenne*. La distribución y brotes de las raíces fueron monitoreadas con respecto del tiempo y se determinaron la densidad radicular, la biomasa en la parte aérea del pasto y la concentración final de HTP. Se observó un cambio en la distribución de los estratos debido principalmente a la irrigación. La planta presentó un desarrollo radicular mayor en las zonas libres de hidrocarburos una vez ocupado este espacio las raíces comenzaron a crecer en la zona contaminada

En el mismo año, se realizó otro estudio de multiproceso de fito-remediación acelerando la cinética de remediación para la remoción de HTP e hidrocarburos

---

clorados en el suelo utilizando como potenciador a las BPCV. La presencia de estas, como ya se ha discutido anteriormente, mitigan el estrés por etileno permitiendo un incremento en la microbiota de la rizósfera. Se utilizaron pruebas piloto en invernadero en un periodo de tres años logrando el 70% de remediación del 15% de HTP, y en otro sitio se logró remediar mas del 50% del 1% de HTP recalcitrantes.

Debido a sus capacidades para crecer en suelos contaminados con diesel y de degradar este contaminante, se ha seleccionado al Rye grass como una de las plantas gramíneas a emplear para la fase experimental de la presente tesis.

## ***2.6 Mecanismos de estimulación del crecimiento de las plantas***

En el suelo existe una gran cantidad y diversidad de microorganismos, los cuales son particularmente abundantes en las zonas inmediatas a las raíces de las plantas. Dentro de estos grupos microbianos, se han identificado numerosas bacterias benéficas de vida libre, las cuales se conocen como rizobacterias promotoras de crecimiento de las plantas (Camarillo, 2006).

En numerosos estudios de inoculación de BPCV, además de la mejora en el crecimiento de las plantas, fueron observados incrementos en el contenido de nitrógeno total de las plantas inoculadas respecto al testigo, no obstante, en la mayoría de estos estudios no fueron observadas diferencias significativas en el porcentaje de nitrógeno o en el contenido de proteína entre las plantas inoculadas y no inoculadas, razón que contribuyó a desechar la idea de que la fijación biológica de nitrógeno fuera el mecanismo responsable de los efectos benéficos observados.

---

Debido a que los efectos de la inoculación con BPCV sobre el mecanismo de la raíz y la parte aérea de las plantas similares a los que se presentan cuando las plantas son tratadas con fitohormonas fue sugerido que estas sustancias podrían ser responsables del mejor crecimiento de las plantas, así como de los incrementos observados en el contenido de minerales y en el rendimiento de los cultivos (Gerard, 1993).

El uso de bacterias promotoras de crecimiento vegetal permite mejorar o reducir las diversas formas de fertilización química al suelo, e incluso en pesticidas químicos, contaminantes por hidrocarburos, etc., para que, el suelo, la planta, y el ecosistema se beneficien (Bashan, 1998).

Las ampliamente conocidas BPCV son aquellas que inoculadas a la siembra de la semilla, inducen su germinación para luego colonizar la raíz, en donde al transformar sus exudados radicales en sustancias promotoras del crecimiento vegetal (García, *et al.*, 1995), causan el efecto similar a las fitohormonas aplicadas comercialmente a las semillas y plantas: como una mayor proliferación de pelos radicales, que incrementa una mejor y eficiente adsorción mineral como nitrógeno, fósforo, hierro (Mackenzie, 2005).

Las BPCV propician principalmente el crecimiento vegetal en dos formas:

- Afectando directamente el metabolismo de las plantas proporcionando sustancias que son naturalmente suministradas en poca cantidad, siendo capaces de fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo y hierro, transformándolos a estados de óxido reducción que los hace disponibles para las plantas y en la producción de las fitohormonas tales como auxina, giberelinas, citocinas y etilenos. Además, las BPCV incrementan la tolerancia al estrés ambiental provocado ya sea por

sequía, salinidad, toxicidad por la presencia de metales, pesticidas y otros contaminantes (Camarillo, 2006).

- De forma directa, son utilizadas como biocontrol. Las BPCV estimulan indirectamente el crecimiento vegetal mediante la prevención de efectos degenerativos patógenos. Las BPCV producen entonces, sustancias que resultan dañinas o inhiben a otros microorganismos, sin que éstas pongan en riesgo a la planta, limitando la disponibilidad de hierro para los microorganismos patógenos o alterando el metabolismo de los mismos (Bashan y de Bashan, 2005).

### ***2.6.1 Azospirillum lipoferum (AZm1) como bacteria promotora del crecimiento vegetal (BPCV)***

Como se menciona anteriormente existen bacterias que se encuentran libremente en la rizósfera, sobre las raíces o en el interior de las mismas pero sin formar estructuras especializadas y que también fijan el nitrógeno pero en estos casos la aportación es mayor, algunos ejemplos de estas bacterias son: *Azotobacter beijerinckii*, ***Azospirillum brasiliense*** o ***Azospirillum lipoferum*** *Bacillus cereus*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia* spp, (Cristensen, 1995).

Estas bacterias proporcionan una fuente muy considerable de nitrógeno asimilable siendo de importancia a las bacterias asociativas formadoras de estructuras especializadas tales como *Rizobium* y *Frankia* (Camarillo, 2006). La mayoría de los organismos fijadores de nitrógeno no simbióticos son capaces de fijar grandes cantidades de nitrógeno en condiciones de laboratorio. Sin embargo, en el suelo suele haber escasez de glúcidos utilizables, que son los que aportan la energía para la reducción de nitrógeno a amonio, incorporando después en las proteínas. Las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno realizan una tarea aún más importante en el crecimiento del vegetal y la producción de las cosechas (Tortora, 1993).

La mayoría de las bacterias se unen a la raíz de cada huésped, normalmente en el pelo radical (figura 2.7). En respuesta la infección bacteriana se forma una invaginación en el pelo radical y posteriormente un hilo de infección y penetra en las células de la raíz. Dentro de las células las bacterias cambian su morfología y se convierten en unas formas mayores llamadas bacteroides, que finalmente se acumulan en la célula vegetal. La infección estimula las células radicales para formar un nódulo, similar a un tumor de las células llenas de bacteroides. El nitrógeno entonces es fijado por un proceso simbiótico de la planta y la bacteria. La planta proporciona condiciones anaeróbicas y nutrientes para el crecimiento de la bacteria y la bacteria nitrógeno para incorporarlo a las proteínas vegetales (Tortora, 1993).

#### Características y mecanismo de acción específicos de *Azospirillum*

Es una bacteria en forma de espirilo que se encuentra en el suelo, viviendo de forma libre y asociada a las raíces de una gran variedad de plantas. A través de múltiples realizados en diferentes especies se han evidenciado las siguientes características:

- Amplia distribución
- Capacidad para colonizar la rizósfera y la superficie e interior de las raíces de diversos vegetales
- Fija nitrógeno atmosférico
- Produce fitohormonas
- Produce sideróforos (agentes quelantes del hierro)
- Produce señales moleculares que activan diferentes funciones de las plantas.

Juegan un papel importante durante la colonización del ambiente rizosférico y de la superficie de las raíces, debido al efecto antagónico que estos compuestos ejercen contra otros miembros de la comunidad microbiana, incluyendo a microorganismos fitopatógenos que sean sensibles a estas biomoléculas.

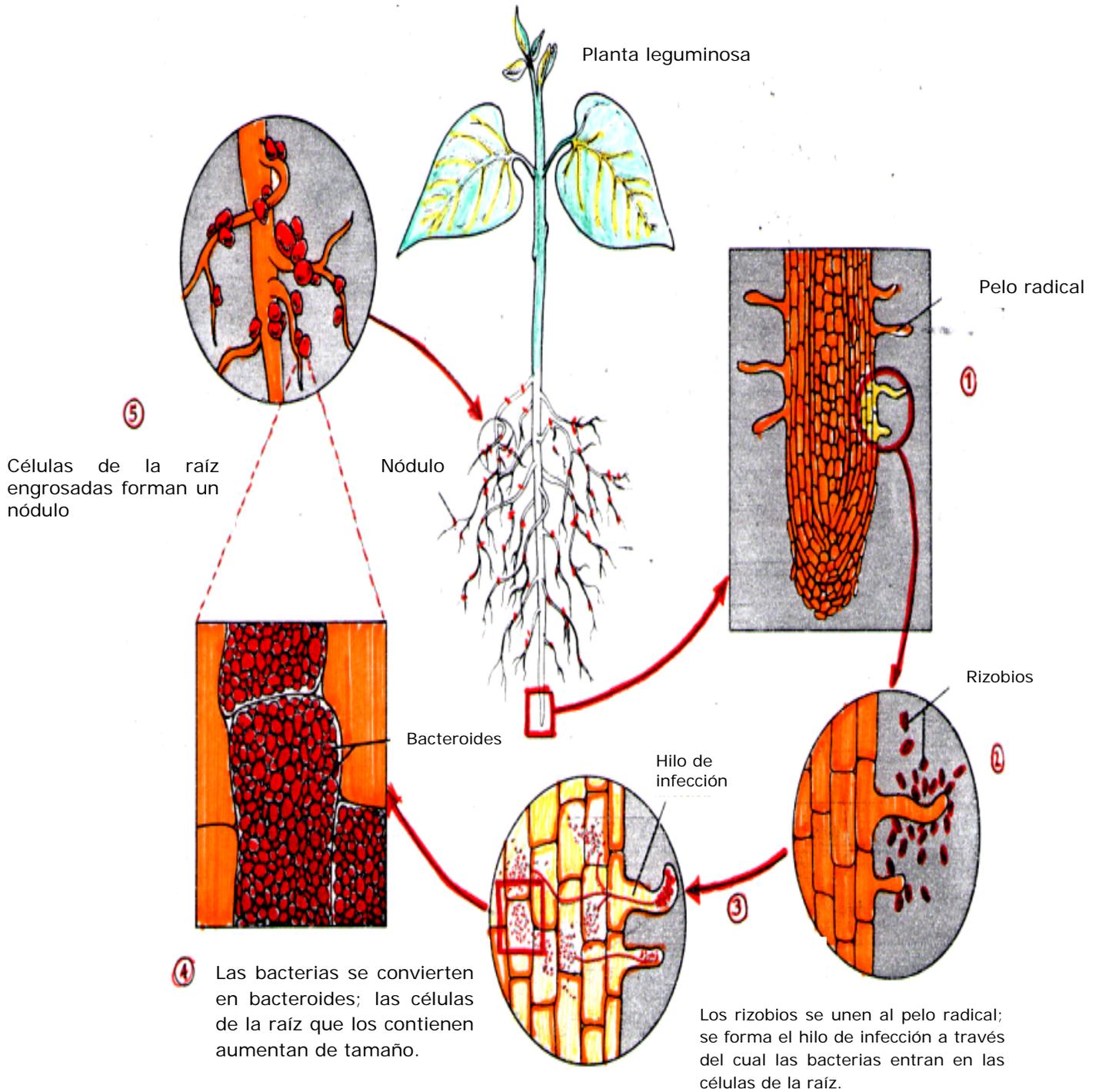


Figura 2.7 Formación de nódulo radical. Fuente (Tortora, 1993).

---

Respecto a los mecanismos de acción con efecto directo sobre el desarrollo de la planta, los primeros estudios estuvieron enfocados en la fijación de nitrógeno y su asociación con gramíneas (pastos), sin embargo, posteriormente se demostró que la contribución de nitrógeno fijado hacia la planta es mínimo y fluctúa del 5 al 8 % de nitrógeno total.

Uno de los compuestos de mayor importancia y el más ampliamente estudiado es el ácido indol acético (AIA) que induce la aparición temprana de pelos radicales, así como el incremento de la longitud de las raíces y además modifica el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas. En este sentido, la literatura indica que la inoculación con *Azospirillum* da origen a un mayor desarrollo del sistema radical, lo que se traduce en una mayor superficie de absorción de nutrientes, lo que fue confirmado al registrar incrementos en el contenido de nitrógeno, fósforo, potasio y otros minerales, así como, con el mayor desarrollo de la parte aérea de las plantas.

A pesar de las características fisiológicas de *Azospirillum* están bien definidas, no se ha logrado especificar cual es el primer mecanismo de acción por el que ésta bacteria favorece el desarrollo de las plantas, no obstante se descubrió que la bacteria es capaz de sintetizar biomoléculas que transmiten señales que atraviesan la pared celular de las plantas y al ser reconocidas por sus receptores inician una cadena de eventos que resultan en la alteración del metabolismo de las plantas. Así mismo se ha demostrado que los nitritos sintetizados por *Azospirillum* induce el aumento en la formación de las raíces laterales (Camarillo, 2006).

---

## 3. OBJETIVOS Y ESTRATEGIA DE TRABAJO

---

### 3.1 Objetivo General

Evaluar y comparar la remoción de diesel en suelo mediante la Fito-remediación convencional y asistida por BPCV.

### 3.2 Objetivo Particular

- Conformar un suelo artificial y evaluar la respuesta del componente vegetal y microbiano del sistema en presencia y ausencia del diesel.
- Evaluar la Fito-remediación convencional con Rye grass (*Lolium perenne*) de suelo contaminado con diesel, bajo condiciones controladas en laboratorio.
- Evaluar la Fito-remediación convencional con Rye grass (*Lolium perenne*) asistida con AZm1 de suelo contaminado con diesel, bajo condiciones controladas en laboratorio.
- Comparar ambos tratamientos en función de los porcentajes de remoción de diesel.

### 3.3 Hipótesis

La fito-remediación asistida por AZm1 como Bacteria Promotora de Crecimiento Vegetal en suelo contaminado por diesel tendrá un mayor porcentaje de remoción que la fito-remediación convencional.

### 3.4 Estrategia de Trabajo

La estrategia de trabajo se realiza en dos partes, la primera parte se conforma de las pruebas preliminares al experimento y la segunda se conforma por la parte experimental, por lo anterior mencionado se planteó de la siguiente forma:



Figura 3.1 Diagrama de estrategia de trabajo para la fase experimental.

Fi

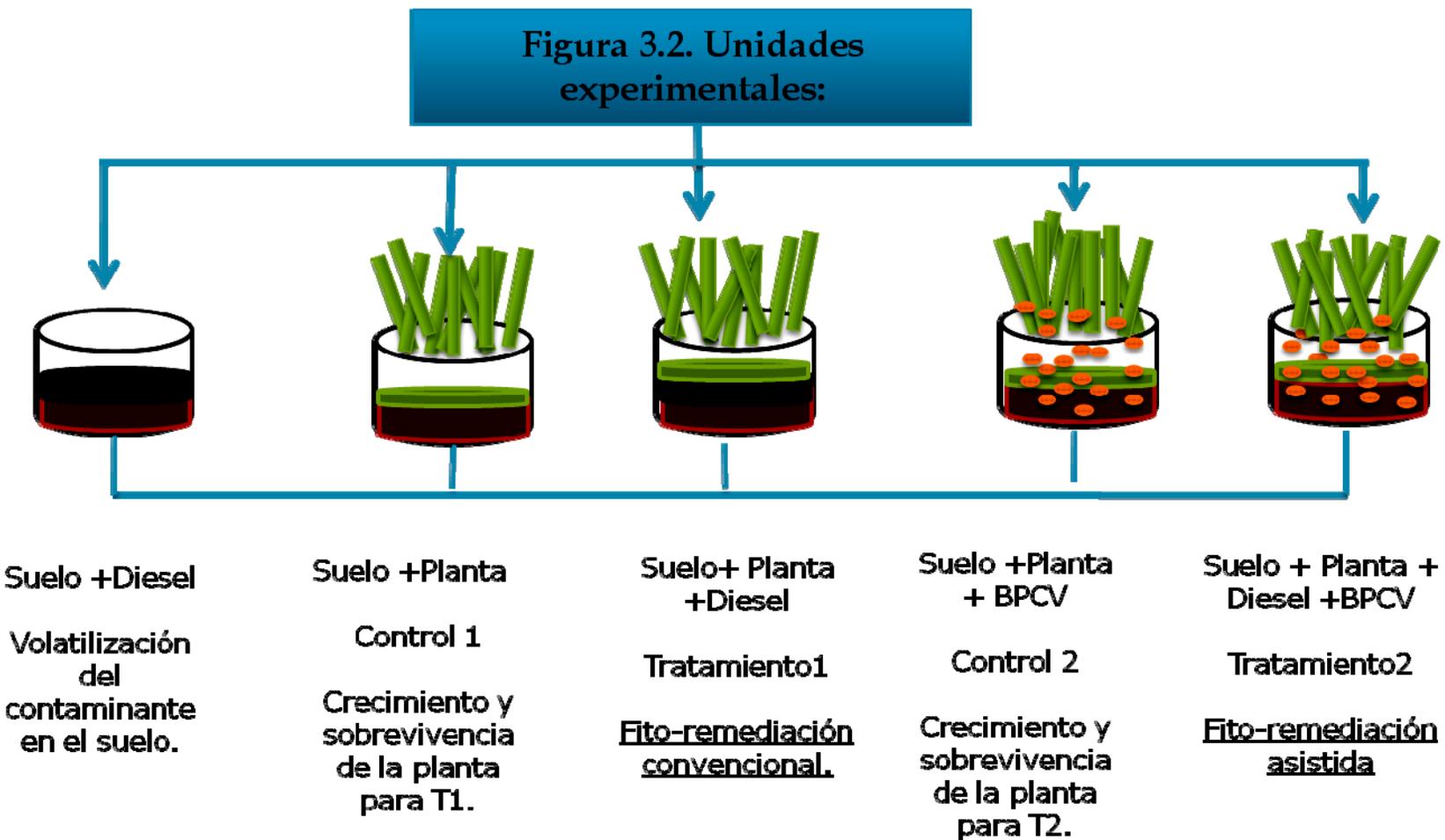


Figura 3.2 Diagrama de unidades experimentales para los tratamientos

---

## 4. METODOLOGÍA

---

### 4.1 *Obtención del suelo natural*

El suelo natural fue recolectado de la zona de Tierra Blanca, Estado de Veracruz en la cuenca de Papaolapan, perteneciente a una región con probabilidades altas de incidencia a derrames por hidrocarburos.

Una vez que la muestra de suelo se obtuvo, se llevo al laboratorio (Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química), se mantuvo en refrigeración a temperatura de 4 °C y se procedió a su caracterización.

De este suelo se determinaron los siguientes parámetros físicos y químicos: carbono, fósforo aprovechable, humedad, materia orgánica, nitrógeno total, pH y textura.



**Figura 4.1 Suelo natural, procedencia de Tierra Blanca, Veracruz.**

#### 4.1.1 *Caracterización del suelo natural*

Los métodos utilizados para la caracterización se enlistan en la tabla 4.1. Para la determinación de fósforo aprovechable, humedad, materia orgánica, nitrógeno y pH y textura se utilizaron los métodos descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

**Tabla 4.1 Métodos empleados para la determinación de propiedades y caracterización del suelo natural y suelo conformado**

<i>Parámetro</i>	<i>Técnica empleada</i>
<b>pH</b>	Método AS-02 (NOM-021-SEMARTNAT-2000)
<b>Humedad</b>	Método As-05 Gravimetría (NOM-021-SEMARTNAT-2000)
<b>Materia orgánica y carbono orgánico</b>	Método AS-07 de Walkley y Black (NOM-021-SEMARTNAT-2000)
<b>Nitrógeno</b>	Kjeldahl
<b>Fósforo</b>	Olsen <i>et al</i> (Laboratorio de Edafología Ambiental 2000)
<b>Textura</b>	Método As-09 Hidrómetro de Bouyoucos (NOM-021-SEMARTNAT-2000)

No

ta: La descripción y fundamento de las técnicas se muestran en el ANEXO A.

#### **4.2 Obtención del suelo conformado**

Ya obtenidas las respectivas proporciones según las propiedades del suelo natural se llevó a cabo la formación del suelo conformado. Como se observa en la Figura 4.2, se formó con un lote de: arena, feldespato como limo, y arcilla tipo caolinita. Las tres fracciones fueron obtenidas comercialmente (fábrica: Fernando Montes de Oca # 18 Col. San Nicolás, Fraccionamiento Fincas Industriales Tlalnepantla, Edo. De México), la materia orgánica se adicionó en forma orgánica de tipo comercial y agua destilada para la homogenización de la mezcla.

El suelo conformado se guardó en un contenedor de plástico con tapa a temperatura ambiente.



**Figura 4.2 Suelo conformado, colocación de arena, limo, arcilla.**

#### **4.2.1 Caracterización del suelo conformado**

Para la caracterización del suelo conformado, se tomó cierta cantidad de suelo guardado en el contenedor y se secó a temperatura ambiente aproximadamente por 24 horas, se maceró en un mortero de porcelana y se tamizó a través de una malla de 200 mm. Se tomaron muestras de la cantidad específica que indica cada técnica a determinar.

Las características físicas y químicas del suelo conformado que se determinaron se muestran en la Tabla 4.1.

#### **4.3 Determinación de la concentración letal ( $CL_{50}$ ) de diesel para el experimento**

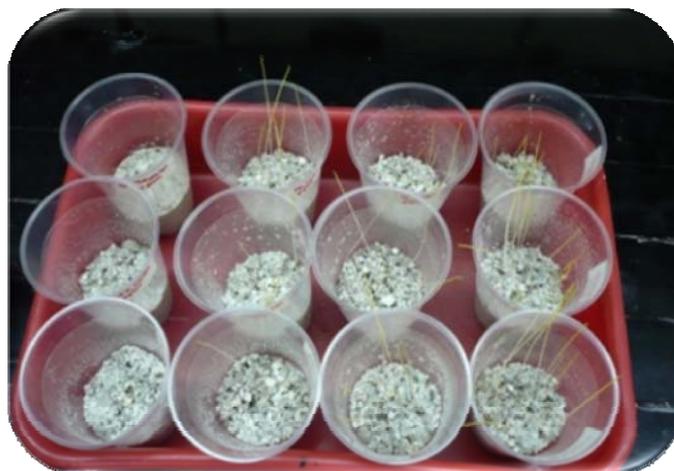
El procedimiento consistió en determinar la concentración letal media por medio de germinación y sobrevivencia de la especie vegetal *Lolium perenne* en el suelo conformado, y se contaminó a diferentes concentraciones (mg/kg) de diesel.

El método fue el siguiente:

- a) Se tomó 3.6 kg de suelo húmedo guardado en el contenedor y se secó a temperatura ambiente aproximadamente por 24 hrs. para obtener la humedad requerida a trabajar, se maceró en un mortero de porcelana y se tamizó a través de una malla de 200 mm.
- b) Se contaminó 300 g de suelo a diferentes intervalos de concentraciones: 0,000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 12000, 16000, 20000, 24000, 28000, 32000 y 36000 mg/kg de diesel, con el fin de corroborar la concentración letal media se planteó el diseño con 3 replicas para cada concentración, se mezcló en un mortero aproximadamente 1 hora para asegurar la homogeneidad del contaminante en el suelo.
- c) Se dejó reposar el suelo con diesel durante un periodo de 72 horas.
- d) Se pesó 150 g de suelo por cada concentración establecida anteriormente y se colocó en un vaso de vidrio con capacidad de 250 mL.

- e) Se agregó 15 semillas de la especie vegetal *Lolium perenne* por cada vaso en el suelo, a una profundidad no mayor de 0.5 cm y se adicionó agrolita en la parte superficial.
- f) Se agregó agua para humedecer el suelo y se taparon los vasos con bolsas negras de plástico para evitar el paso de la luz y obtener una germinación óptima, se colocaron en el cuarto de incubación cerrada para asegurar oscuridad total a una temperatura de 32 °C por 96 horas.
- g) Se roció agua cada 48 horas a las semillas.
- h) Se sacó los vasos del cuarto de incubación para seguir con el procedimiento de crecimiento y sobrevivencia de la planta vegetal y se colocaron en el laboratorio.
- i) Se rocío agua cada 48 horas a las plantas.
- j) Se obtuvo un 50% de crecimiento de la especie vegetal al día 6 a partir de su germinación.
- k) Se dejó los vasos con la especie vegetal como se observa en la figura 4.3, por un periodo de 15 días con el fin de obtener el porcentaje de sobrevivencia para las diferentes concentraciones establecidas de diesel
- l) Ya transcurrido los días señalados se registró los resultados de porcentaje de germinación y sobrevivencia de la especie vegetal.

Con esta prueba se encontró la concentración letal media y se obtuvo por medio de regresión lineal.



**Figura 4.3 Suelo conformado y especie vegetal a diferentes intervalos de concentración de diesel  $CL_{50}$ .**

#### 4.4 Preparación de suelo con diesel y sin diesel para las unidades experimentales

Se llevó a cabo la preparación del suelo conformado en dos lotes cada uno de 14 kg, con una humedad de  $17.32 \pm 3 \%$  y se mezcló con agrolita (materia inerte) para mejorar la estructura del suelo. Uno de los lotes fue contaminado con diesel a una concentración teórica de 15,000 mg/kg dando una concentración real de 10,552 mg/kg en, en la figura 4.4 se muestra el resumen en diagrama de los pasos de la preparación del suelo.

El método fue el siguiente:

- Se tomó del contenedor dos lotes 14 kg de suelo, se secó a temperatura ambiente aproximadamente por 24 hrs. Se obtuvo una humedad de  $17.32 \pm 3 \%$  la requerida para poder trabajar el suelo, se maceró en un mortero de porcelana para adquirir la textura deseada para trabajar.
- Se contaminó el primero lote de suelo adicionando diesel con una probeta y se homogenizó con una espátula por un periodo de 2 horas aproximadamente, para obtener el diesel en toda el área del suelo. La concentración establecida teóricamente fue de 15,000 mg/kg de diesel y la concentración real fue de 10,552 mg/kg.
- Se dejó reposar el suelo con diesel por 72 horas.



Figura 4.4 Diagrama que resume las actividades realizadas para el suelo contaminado y sin contaminar.

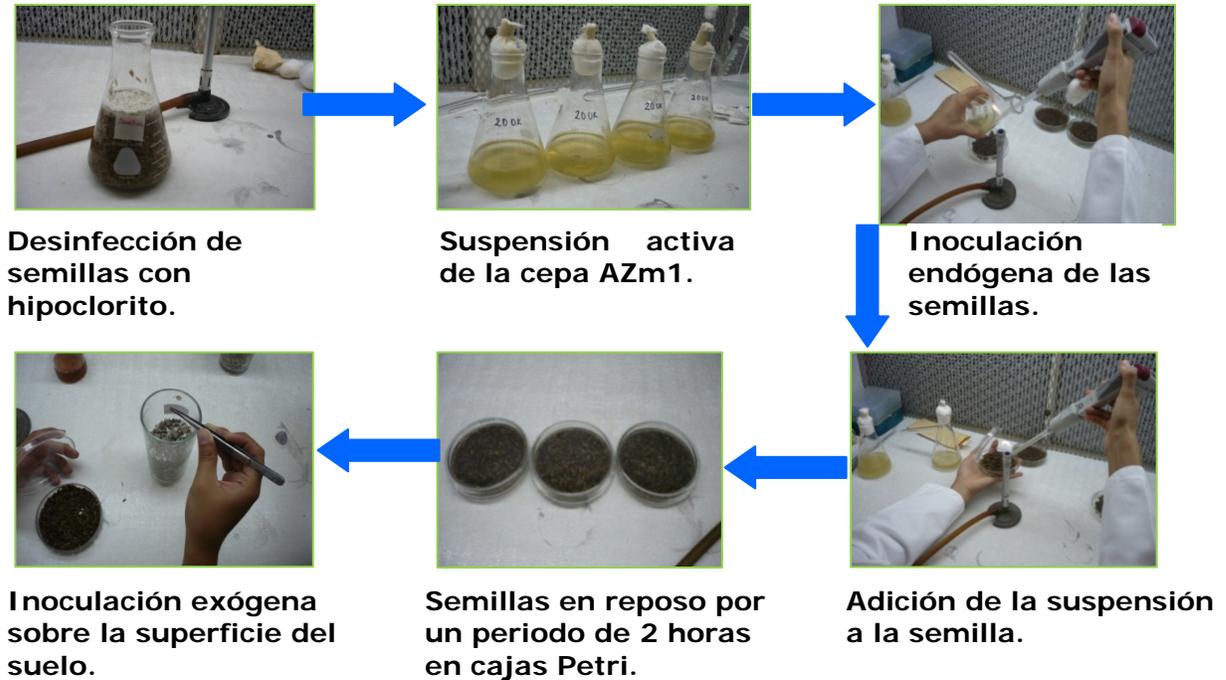
#### **4.5 Inóculo de semilla *Lolium perenne* con AZm1 como BPCV**

Una vez establecida la concentración de diesel, se llevó a cabo la inoculación de las semillas de Rye grass la cepa con la que se trabajó fue Azm1.

En el Laboratorio de Microbiología Experimental, se ha trabajado con tres cepas específicas de *Azospirillum lipoferum* las cuales son **AZm1**, AZm3 y AZm5, de acuerdo a trabajos previos experimentalmente en el Laboratorio de Microbiología Experimental, se obtuvo que la cepa AZm1 presentó mayor densidad bacteriana por semilla y tolerancia al diesel, para fines del presente trabajo se proporcionó la cepa AZm1 por las características antes mencionadas, la cepa se obtuvo activada y propagada, se realizó tinciones de Gram para observar la forma y característica física de la cepa, una vez llevado a cabo estas actividades se inoculó la semilla de Rye grass. La totalidad de las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5 % durante 10 minutos, con el fin de eliminar totalmente impurezas alrededor de la semilla, se enjuagó en agua estéril, los pasos resumidos se muestran en la figura 4.5. El montaje de las unidades experimentales tuvo dos lotes; uno con semillas inoculadas con la cepa AZm1 y el otro lote semillas sin inocular.

Para la inoculación se siguió la propagación de la cepa como se muestra a continuación:

- a) se desinfectó las semillas con una solución de hipoclorito de sodio a 5 % por diez minutos y se enjuagaron con agua estéril.
- b) Se colocó las semillas desinfectadas en cajas Petri estériles a las cuales se les agregó la suspensión activa de la cepa AZm1 y se dejó reposar por un período de 2 horas a temperatura ambiente
- c) Se inoculó las semillas de forma endógena y se agregaron a la superficie del suelo conformado preparado, y para asegurar la presencia de las bacterias se volvió a inocular, de forma exógena, es decir añadiendo un mL a la superficie del suelo con las semillas.



**Figura 4.5 Diagrama que resume las actividades de inoculación de semilla durante el experimento.**

#### **4.6 Conformación y Montaje de los sistemas experimentales**

Ya preparado el suelo contaminado como se explicó en la sección 4.4, se llevó acabo el montaje de los sistemas experimentales. Estos sistemas se monitorearon para obtener la concentración de diesel en fracción media de HTP durante los siguientes intervalos de días, al día cero, y los siguientes intervalos de 10, 22, 37, 52 y 62 días. Se consideró para cada arreglo del sistema tres replicas por cada uno, en la figura 4.6 se muestra el resumen en diagrama de pasos.

Para la conformación de los sistemas se siguieron los siguientes pasos:

- a) Se colocó las unidades experimentales en vasos de vidrio tipo comercial con capacidad de 125 mL, se lavó previamente con agua acidulada y se enjuagó con agua destilada.
- b) Se preparó posteriormente dos lotes de suelo el suelo como se menciona en la sección 4.4., el primero con diesel y el segundo sin diesel.

- c) De los dos lotes de suelos se clasificó dos lotes diferentes el primero con semillas Rye grass inoculado con AZm1 y el segundo con semillas Rye grass sin inocular.
- d) Una vez identificado la separación se colocó 150 g de suelo en cada vaso con y sin diesel y 25 semillas de Rye grass (*Lolium perenne*) por vaso.
- e) Una vez colocadas las semillas se esparció en poca cantidad agrolita, con el fin de darle una mejor textura y se agregó agua para su germinación,
- f) Ya completado las 90 unidades experimentales, se colocaron bolsas negras con ligas a los vasos para evitar el paso de luz.
- g) Los vasos se colocaron en un cuarto de incubación a una temperatura de  $30 \pm 5$  °C, y se dejó por un periodo de 120 hrs,
- h) Durante este período se regó cada dos días, con revisiones diarias.
- i) Una vez germinadas las semillas, se colocó las 90 unidades experimentales dentro del laboratorio a una temperatura de  $20 \pm 5$  °C.
- j) Durante este período se rego cada tres días, con revisión diaria hasta el día 62 donde finalizó el monitoreo experimental.

**Tabla 4.2 Nomenclatura y distribución de las unidades experimentales (S- suelo, Se-semilla Rye gras (*Lolium perenne*), D- diesel, B- AZm1)**

Sistema	Bloque a día 10	Bloque b día 22	Bloque c día 37	Bloque d día 52	Bloque e día 52
S + D testigo	S-D-a	S-D-b	S-D-c	S-D-d	S-D-e
S + B	S-B-a	S-B-b	S-B-c	S-B-d	S-B-e
S + P CONTROL 1	S-Se-a	S-Se-b	S-Se-c	S-Se-d	S-Se-e
S + P + D TRATAMIENTO 1	S-Se-D-a	S-Se-D-b	S-Se-D-c	S-Se-D-d	S-Se-D-e
S + P + B CONTROL 2	S-Se-B-a	S-Se-B-b	S-Se-B-c	S-Se-B-d	S-Se-B-e
S + P + B + D TRATAMIENTO 2	S-Se-B-D-a	S-Se-B-D-b	S-Se-B-D-c	S-Se-B-D-d	S-Se-B-e

Los sistemas experimentales fueron etiquetados para su distribución de acuerdo a cada característica de sistema, en la tabla 4.2, se observa la nomenclatura. De acuerdo a su distribución experimental se obtuvo un matriz que señala parámetros fisicoquímicos medibles durante el experimento, se observa en la tabla 4.3.



Figura 4.6 Diagrama que resume las actividades de conformación y montaje de los sistemas experimentales.

Sistema	Característica	Sobrevivencia de planta		Crecimiento		Peso base seca	pH	Nitrógeno (mg/kg)	Fósforo (mg/kg)	Hidrocarburos totales de petróleo fracción media diesel	Análisis estadístico
		(%)	tallo %	raíz %	(g)						
S + D	Volatilización del contaminante	no	no	no	no	no	si	no	no	no	no
S + P	crecimiento y sobrevivencia de la planta como control para el tratamiento 1	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si
S + P + D	Fito-remediación convencional	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
S + P + B	Crecimiento y sobrevivencia de planta y viabilidad de las bacterias como control para el tratamiento 2	si	si	si	si	si	si	si	si	no	si
S + P + B + D	Fito-remediación asistida con Azm1	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si

S Suelo  
 D Diesel  
 P semilla-Planta  
 B AZm1

Figura 4.7 Matriz experimental, medición de parámetros fisicoquímicos en cada sistema

#### **4.7 Caracterización de los sistemas**

Se realizó la caracterización y parámetros fisicoquímicos de los sistemas como se indicó en la figura 4.3.

#### **4.8 Factores de respuesta**

Como factor respuesta se dio seguimiento al porcentaje de sobrevivencia, longitud de raíz y tallo de la planta, peso base seca estos resultados se encuentran en el **Anexo B**.

#### **4.9 Determinación de la fracción media de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)**

La preparación de la muestra de suelo para el análisis del contenido de diesel se realizó secando las muestras al aire libre por un periodo de 3 a 5 días a temperatura ambiente; una vez secas, se trituró la muestra en un mortero de porcelana y se colocaron en frascos de vidrio color ámbar con tapa de teflón y refrigeración a una temperatura 4 °C.

Las plantas se retiraron de las unidades experimentales y fueron cepilladas con el fin de eliminar los gránulos restantes del suelo especialmente la parte de la raíz, posteriormente fueron extendidas y colocadas sobre charolas de aluminio en donde se dejó secar por un periodo de 3 a 5 días a temperatura ambiente, de igual formase obtuvo el peso en gramos para obtener la base seca de planta, estas se colocaron en frascos de vidrio ámbar cerrados con tapa teflón y en refrigeración a 4 °C.

Una vez obtenidas las muestras en frascos se procedió a la extracción con un equipo Soxhlet por un periodo de 18 horas en una solución de extracción consistente en una mezcla de hexano con diclorometano (1:1). Posteriormente se concentraron con equipo rota vapor y se pasaron por una columna cromatografía

empacada con sulfato, sílice, alúmina, sulfato de cobre granulado, posteriormente las muestras nuevamente son evaporadas con la ayuda de un rota vapor hasta un volumen aproximado de 5 mL transvasándose a viales.



(A)



(B)



(C)



(D)



(E)



(F)

Figura 4.8 Diagrama que resume los pasos para la separación del suelo con la planta, A) Sistemas experimentales en el laboratorio, B) Planta con suelo sobre charola de aluminio Antes de cepillar el suelo, C) Planta con suelo, D) Planta sobre charola para la medir la longitud de la planta.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Caracterización del suelo natural

La muestra de suelo natural fue obtenida de Tierra blanca, Veracruz, México.

Se determinó las pruebas fisicoquímicas con base a los métodos mencionados en la tabla 4.1. Los valores obtenidos de la caracterización del suelo natural se muestran en la tabla 5.1.

**Tabla 5.1 Resultados de caracterización del suelo natural de Tierra Blanca, Veracruz.**

<i>Parámetro</i>	<i>Resultados</i>
<b>Valor de pH</b>	7.75
<b>Humedad (%)</b>	18.63
<b>Nitrógeno (mg/Kg)</b>	0.17
<b>Materia orgánica y carbono orgánico (%)</b>	2.51
<b>Fósforo (mg/Kg)</b>	1.96
<b>Arena (%)</b>	44.09
<b>Arcilla (%)</b>	27.91
<b>Limo (%)</b>	28.00

Fue de suma importancia determinar la de textura del suelo, ya que proporciona una idea general de las propiedades físicas del suelo, el suelo natural tienen los siguientes valores: **arena** 44 %, **arcilla** 27 % y **limo** 28 %, de acuerdo al triángulo de clasificación de textura del departamento de agricultura de E. U., el suelo es de tipo Franco Arcillo Arenosa.

#### 5.1.1 Características del suelo conformado

En la tabla 5.2 se observan las cantidades de sólidos (materia orgánica e inorgánica) y líquidos con las cuales se realizó el suelo conformado, para la obtención de 100 kg de suelo.

**Tabla 5.2 Valores totales de suelo conformado para 100 kg de suelo.**

Agua (L)	18.631962		
Sólidos (kg)	81.368038		
Total 100			
Parte :			
Orgánica	2.0439473	Fósforo	0.690854
		Nitrógeno	0.003536
		Otros	1.349557
Inorgánica	79.324091	Arena	34.97664
		Limo	22.21075
		Arcilla	22.13671
			81.36804

La materia orgánica se obtuvo comercialmente, se realizó la caracterización de la materia orgánica los valores se muestran en la tabla 5.3.

**Tabla 5.3 Resultados de la caracterización de la materia orgánica obtenida comercialmente.**

<i>Determinación</i>	<i>Resultados</i>
<b>Peso del bulto kg</b>	30
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> %</b>	85.00
<b>Fósforo (Kg)</b>	22.44
<b>Nitrógeno total (mg/Kg)</b>	39
<b>Ácidos Húmicos %</b>	10.7
<b>Humus %</b>	60
<b>K<sub>2</sub>O (mg/Kg)</b>	29
<b>Azufre (mg/Kg)</b>	18.40
<b>Magnesio (mg/Kg)</b>	13.6
<b>Calcio (mg/Kg)</b>	74

En la figura 5.1 se muestra los pasos realizados durante la formación del suelo, adicionando los componentes, arcilla, limo, agua destilada y su disposición final.



**Mezcla de arena, limo, arcilla**



**Adición de agua**



**Homogenizando la mezcla**



**Depósito de suelo conformado en contenedor**



**Textura del Suelo conformado**



**Vista del suelo conformado**

**Figura 5.1 Diagrama que resume las actividades de la formación del suelo conformado.**

### 5.1.2 Caracterización del suelo conformado

Para el suelo conformado se determinó las pruebas fisicoquímicas con base a los métodos mencionados en la tabla 4.1. Los valores obtenidos de la caracterización del suelo natural se muestran en la tabla 5.4.

Los valores obtenidos para el suelo conformado se muestran en la tabla 5.4, dando los siguientes resultados: **arena** 37.97 %, **arcilla** 22.21 % y **limo** 22.13 %, de acuerdo al triangulo de clasificación de textura del departamento de agricultura de E. U., el suelo conformado entra en la clasificación de tipo **Franco Arcillo Arenosa**.

**Tabla 5.4 Resultados de caracterización de suelo conformado.**

<i>Parámetro</i>	<i>Resultados</i>
<b>Valor de pH</b>	7.6
<b>Humedad (%)</b>	23.12
<b>Nitrógeno (mg/kg)</b>	0.12
<b>Materia orgánica y carbono orgánico (%)</b>	2.54
<b>Fósforo (mg/Kg)</b>	1.16
<b>Arena (%)</b>	34.97
<b>Arcilla (%)</b>	22.21
<b>Limo (%)</b>	22.13

Por lo tanto, se obtuvo un suelo conformado con características similares al suelo natural procedente de Tierra Blanca, Veracruz. Para este proceso se observó que ambos suelos tienen características similares, los resultados se muestra en la tabla 5.5.

**Tabla 5.5 Comparación de caracterización del suelo natural y suelo conformado.**

<i>Parámetro</i>	<i>Suelo natural</i>	<i>Suelo conformado</i>
<b>Valor de pH</b>	7.75	7.6
<b>Humedad (%)</b>	18.63	23.12
<b>Nitrógeno (mg/Kg)</b>	0.17	0.12
<b>Materia orgánica y carbono orgánico (%)</b>	2.51	2.54
<b>Fósforo (mg/Kg)</b>	1.96	1.16
<b>Arena (%)</b>	44.09	34.97
<b>Arcilla (%)</b>	27.91	22.21
<b>Limo (%)</b>	28.00	22.13

Analizando los resultados el suelo conformado con respecto al suelo natural muestra una pequeña presentó un color arena claro, esto debido a los componentes y propiedades físicas de la arena, arcilla y limo.

Con respecto al valor del pH se encontró en un nivel óptimo para la actividad microbiana, esto quiere decir que un suelo con pH cercano a la neutralidad tienen las características necesarias para mantener vivas a las bacterias, en este caso las BPCV (*Azospirillum lipoferum*).

Por otra parte el valor del porcentaje de humedad del suelo conformado con respecto al suelo natural obtuvo un 4% mayor de humedad con respecto del suelo natural, esto debido a que se agregó una cantidad mayor de agua al momento de su formación.

Los resultados de textura para ambos suelos de acuerdo al triangulo de clasificación de textura del departamento de agricultura de E. U., es de tipo **Franco Arcillo Arenosa**, observando los resultados de textura este tipo de suelos tiene la característica de provocar una relativamente mediana distribución de agua para su uso con plantas.

Cabe mencionar que con las características obtenidas del suelo conformado la capacidad de retención de agua en el suelo es poco aceptable para la disponibilidad de las plantas y las bacterias, por lo tanto se hizo pruebas de campo para observar la retención de agua en el suelo, se observó que el agua en el suelo tenía medianamente dificultad para lixiviarse, por lo tanto, basándose en esta observación se determinó agregar agrolita al suelo para obtener mejor textura y espacio entre las partículas del suelo, esto con el fin de ayudar a la planta a tener mejor crecimiento de rizósfera y actividad microbiana en el suelo.

## **5.2 Concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de diesel para el experimento**

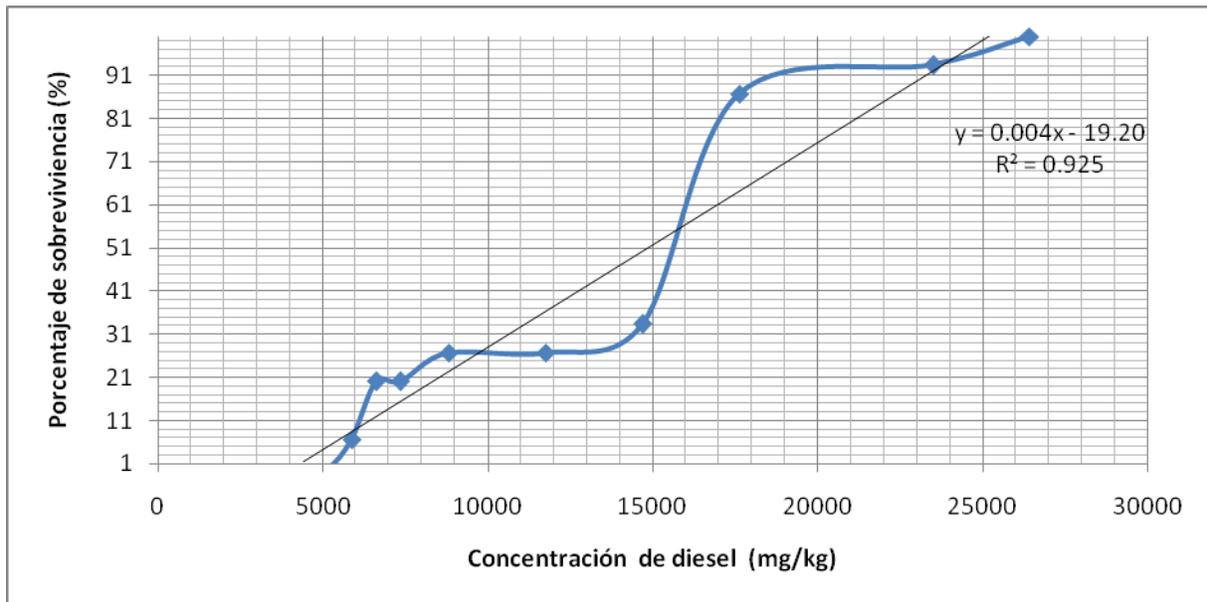
Para derrames donde las concentraciones en el suelo son: entre 10000 y 50000 mg/kg no se han observado efectos negativos; e incluso a muy bajas concentraciones, se han encontrado efectos benéficos debido a que los hidrocarburos actúan como hormonas de crecimiento y por el aumento en el contenido de humus y de la capacidad de retención de agua (Bossert y Bartha, 1994). Otros efectos benéficos, debido a la descomposición de los hidrocarburos, incluye el incremento de la agregación en la estructura física, el aumento de la estabilidad microbiana. Se menciona también que en presencia de bajas concentraciones de hidrocarburos se favorece la fijación de nitrógeno (Frankenberger, 1992).

Cuando se examinan las propiedades letales de una sustancia se estima un parámetro propio de cada especie de organismo, que es la  $CL_{50}$  o concentración letal media, que corresponde a la concentración de la sustancia con la cual la mitad de la población expuesta muere, en la figura 5.2 y 5.3 se observa el comportamiento de la especie vegetal para obtener la  $CL_{50}$ .

Se observó que a las concentraciones de 24000 a 36000 mg/kg de diesel la especie vegetal tuvo un bajo porcentaje de germinación, y de sobrevivencia, se encontró que el valor de  $CL_{50}$  fue de 15,000 mg/kg de acuerdo a la tabla teórica, los resultados que se obtuvieron se observan en la tabla 5.6, tomando en cuenta que se agregó 15 semillas por cada vaso, se monitoreó las plantas por un período aproximado de 20 días, desde su germinación hasta el día que terminó la prueba experimental.

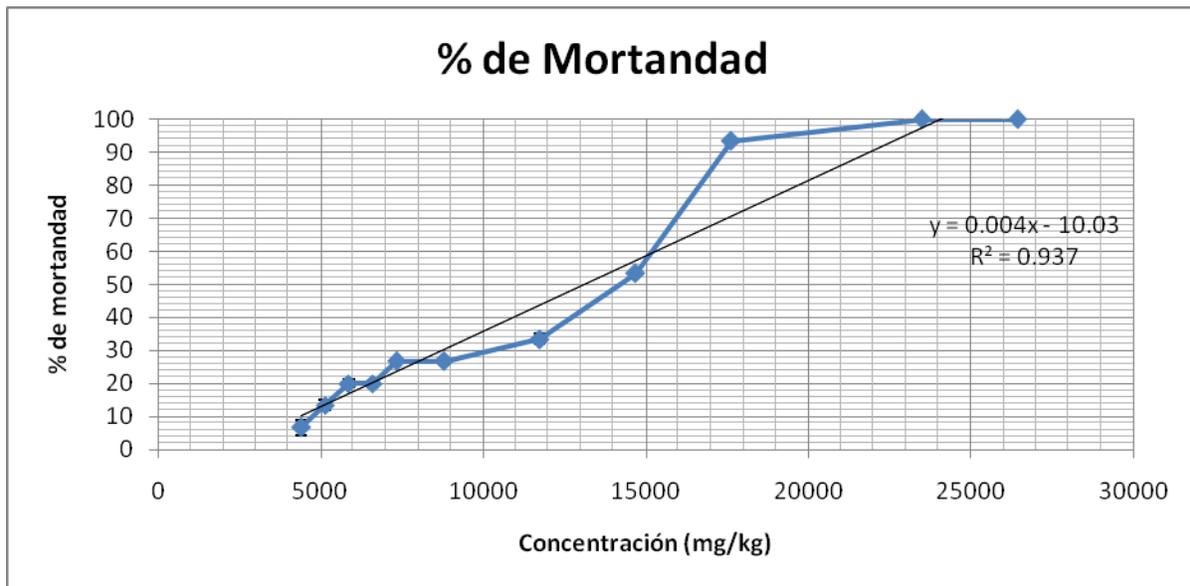
**Tabla 5.6 Diferentes intervalos de concentraciones de diesel en suelo conformado para determinar  $CL_{50}$**

Conc. de diesel en suelo conformado	Sobrevivencia de la especie vegetal vs. Conc. de diesel	Mortandad de la especie vegetal vs. Conc. de diesel
mg/kg	%	%
6000	93.3	6.7
7000	86.6	13.4
8000	80	20
9000	80	20
10000	73.3	26.7
12000	73.3	26.7
16000	66.6	33.4
20000	46.6	53.4
24000	6.66	93.34
32000	0	100
36000	0	100



**Figura 5.2** Diferentes intervalos de concentración de Diesel vs mortandad de la especie vegetal para obtener CL<sub>50</sub>.

Con los resultados se realizó una regresión lineal, con esta ecuación fue posible obtener la dosis teórica con un valor de: 15,000 mg/kg,



**Figura 5.3** Concentración de diesel en suelo expresada (mg/kg) vs porcentaje de mortandad de semillas (%)

Para determinar la concentración real, se determinó la concentración fracción media de hidrocarburos mediante el análisis por cromatografía de gases, obteniendo una concentración real con un valor de 10,522.42 mg/kg.

De acuerdo a las pruebas de concentración letal media se trabajó a una concentración teórica de 15,000 mg/kg que resulta ser 12.5 veces más alta que lo reglamentado por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2008 (que es 1,200 mg/kg) para fracción media en uso residencial y agrícola, en tanto a la concentración real inicial al día cero resultó ser 10 552.42 mg/kg que es 8.77 veces más alto que el límite máximo permisible.

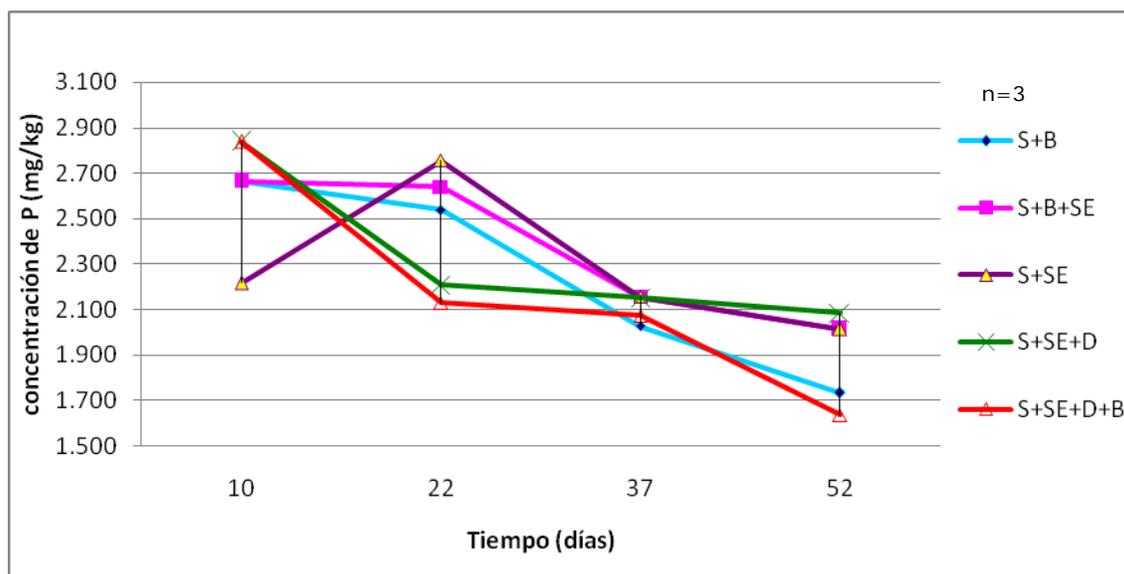
### **5.3 Monitoreo de los sistemas experimentales**

El monitoreo de los sistemas se dio para las plantas registrando el porcentaje de sobrevivencia, así como longitud de raíz y longitud de tallo y base seca de las plantas. Estos factores de respuesta se monitorearon por un periodo total de 62 días con los siguientes intervalos de tiempo: 10, 22, 37, 52 y 62.

### **5.4 Fósforo y nitrógeno en los sistemas.**

El fósforo es un elemento indispensable para el desarrollo de las plantas, por lo que su variación se determinó en el estudio. Debido a que el suelo es ligeramente alcalino, fue necesario determinar la cantidad de fósforo en el suelo, ya que existe una actividad microbiana y una concentración de diesel para los sistemas.

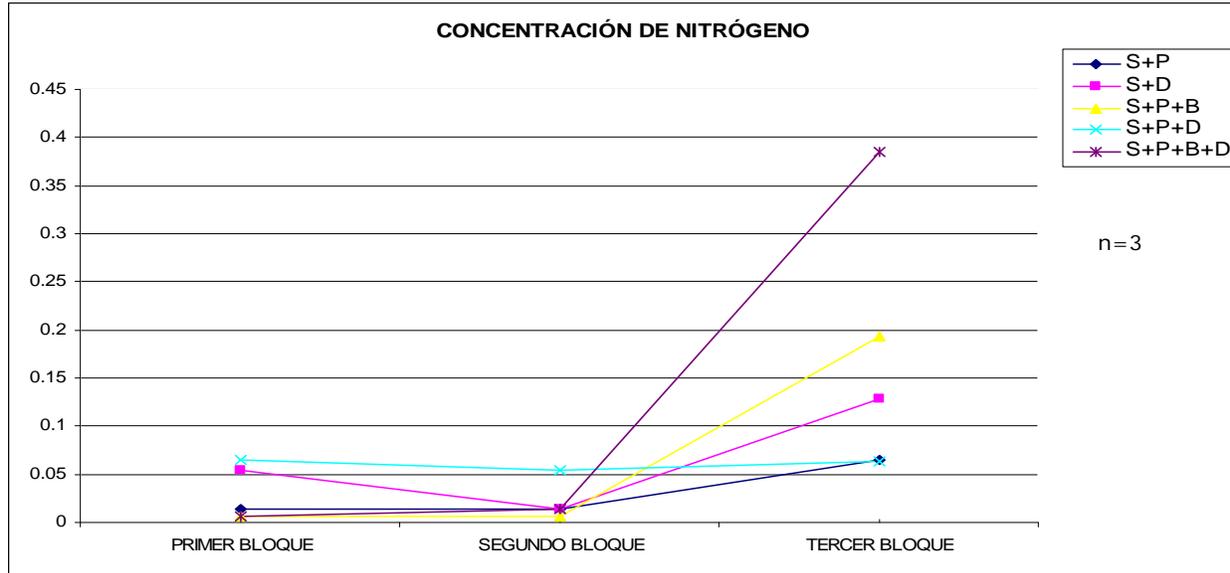
Los resultados de la cuantificación de fósforo se presentan en la figura 5.5 con n=3.



**Figura 5.4 Medición de Fosforo en los sistemas experimentales**

Las concentraciones de fósforo en el suelo fue baja en todos los sistemas, ya que corresponde a un suelo muy pobre en materia orgánica, aunque las concentraciones de fósforo mostraron homogeneidad se encuentran en un intervalo de 1,100 y 2,800 mg/kg, esto indica que el factor de concentración de diesel afectó significativamente a la concentración de fósforo, pero no hay relación con el tiempo, ni con la especie de la planta.

Las concentración de diesel, tienen influencia sobre la concentración de nitrógeno en el suelo y las bacterias, ya que al existir un aumento en la población de las bacterias promotoras de crecimiento vegetal podría existir una competencia de recursos en las bacterias. A continuación se muestran en la figura 5.6 los resultados obtenidos en la cuantificación de la concentración de nitrógeno.



**Figura 5.5 Relación de nitrógeno entre las unidades experimentales, (primero bloque corresponde al día 10, segundo bloque al día 37 y tercer bloque al día 52 durante su monitoreo)**

De acuerdo a la literatura se menciona que las BPCV (*Azospirillum lipoferum*) son capaces de mejorar el rendimiento de las plantas, fijar el nitrógeno, por lo que se pretende establecer una relación entre la inoculación de la bacteria en las semillas y la fijación de nitrógeno en los sistemas experimentales. De acuerdo a la figura 5.5, se observa que conforme incrementa el crecimiento de las plantas aumenta la concentración de nitrógeno; todas las unidades experimentales presentaron un incremento en la cantidad de nitrógeno inorgánico extraíble; tomando en cuenta que los sistemas C1 y T2 presentaron valores superiores comparando con el resto de sistemas experimentales, debido a la presencia de las bacterias comparados con los sistemas carentes de bacterias.

### **5.5 pH en los sistemas experimentales**

El pH es un índice representativo, que permite conocer el grado de saturación de las bases y orienta sobre los elementos nutritivos asimilables de la planta (Porta, 1994). El pH óptimo para la mayoría de las bacterias está entre el valor de 6 y 7, aunque la tolerancia varía entre las especies de cada planta.

El resultado inicial del suelo en la caracterización fue de 7.8 dando como resultado ser del tipo medianamente alcalino. La tabla de resultados se encuentra en el **ANEXO C**.

Los resultados obtenidos para el pH en los sistemas experimentales se observan en la figura 5.7, con una escala reducida a un valor entre de 7.6 y 8.50. En color verde se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación convencional, en la curva se observa un incremento ligero en el pH, a partir del día 10 el pH tiene un valor de 8.12, para el día 22 el pH tiene un valor de 8.45 como valor máximo en la curva, para el día 62 el valor del pH fue de 7.98, En color morado se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación asistida (AZm1), en la curva se observa un pH para el día 10 de 8.10, para el día 22 el pH tiene un valor de 8.18 como valor máximo en la curva, para el día 62 el valor del pH fue de 8.04 arriba de la fito-remediación convencional, En color azul celeste se encuentra la curva perteneciente a volatilización del contaminante, en la curva se observa un pH para el día 10 de 7.97, para el día 22 el pH tiene un valor de 8.13 como valor máximo en la curva, para el día 62 el valor del pH fue de 7.82. De acuerdo a los resultados la variación significativa del pH en los sistemas se dio en el día 22, en el día 37 al 62 el pH se estabilizó de acuerdo a la escala y el tipo de suelo que presentó-.

En la figura 5.8 se observa en términos generales que el suelo no presentó un cambio representativo en el valor del pH con respecto al tiempo y concentración de diesel.

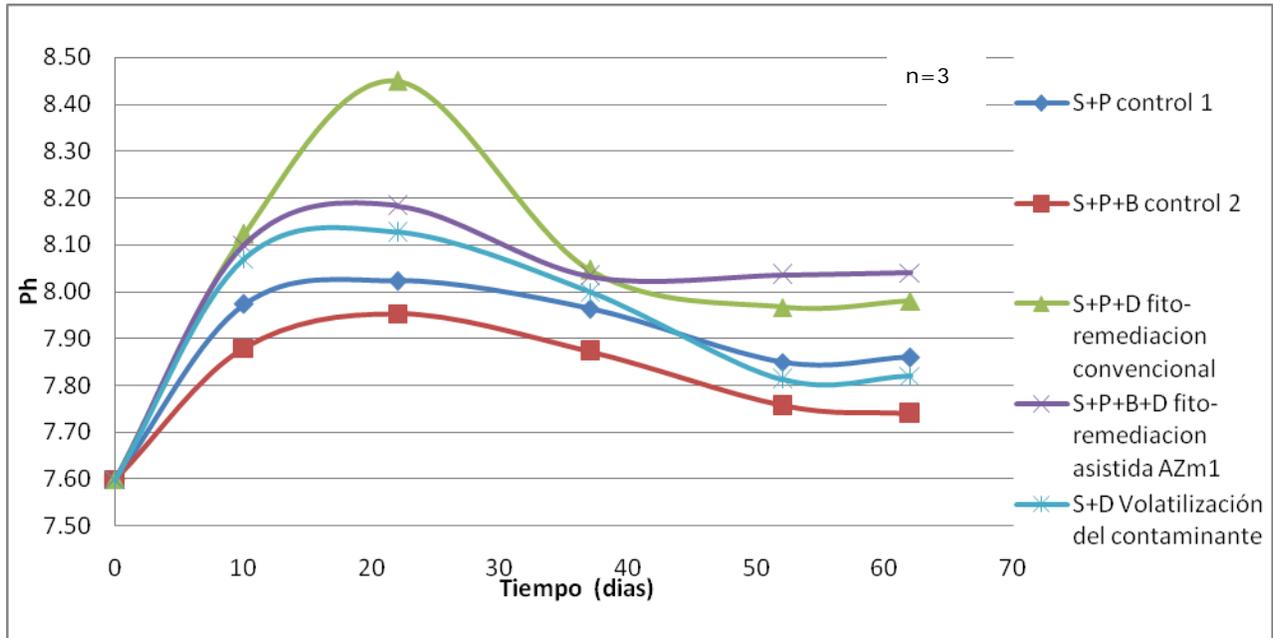


Figura 5.6 Resultados de pH por día en los sistemas experimentales

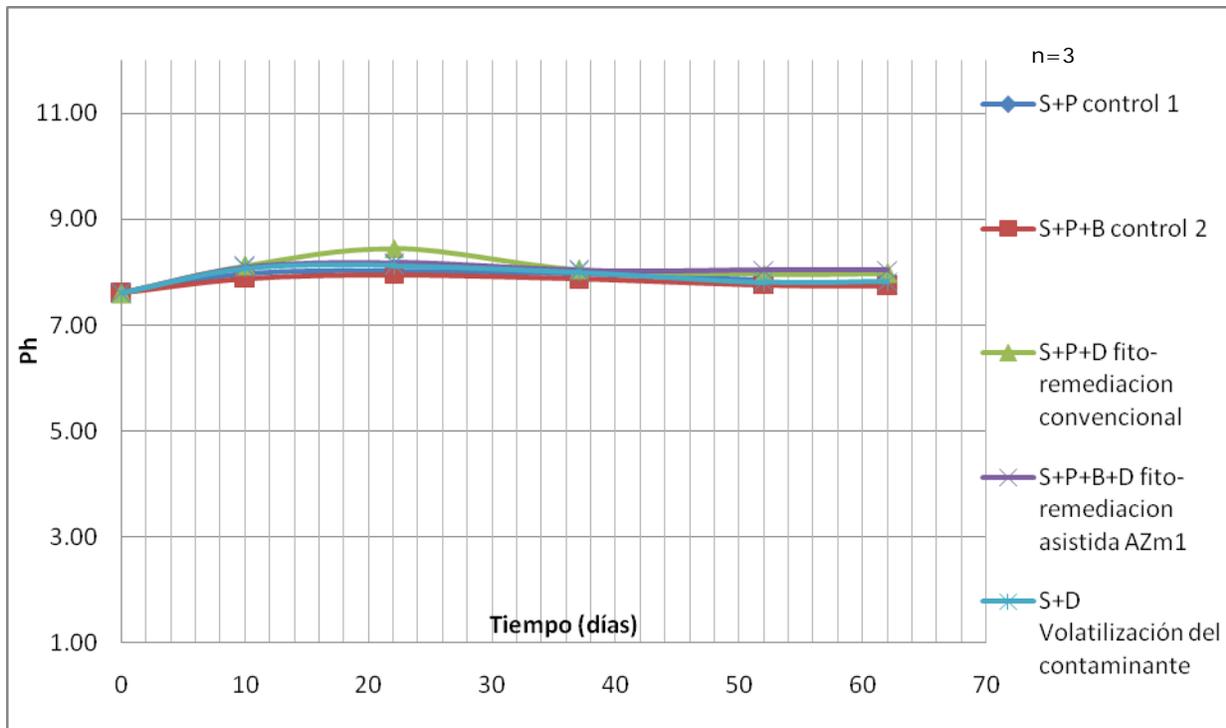


Figura 5.7 Resultados de pH escala logarítmica en los sistemas experimentales

### 5.6 Fracción media de hidrocarburos (HTP) en los tratamientos experimentales

El método que resulta ser el más preciso para predecir la disponibilidad de un contaminante en suelo recientemente contaminado es midiendo la fracción media de hidrocarburos o los hidrocarburos totales de petróleo. Los resultados obtenidos durante el monitoreo de los sistemas se observan en la figura 5.8. La concentración inicial de diesel en los tres sistemas fue de 10,552 mg/kg.

En color azul se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación convencional, en la curva se observa que la concentración del diesel en el día 10 es casi similar a la concentración inicial con un valor de 10,272 mg/kg, para el día 22 bajo la concentración considerablemente a 6,414 mg/kg manteniéndose sin cambio significativo al día 37, para el día 62 la concentración final fue de 1,771 mg/kg.

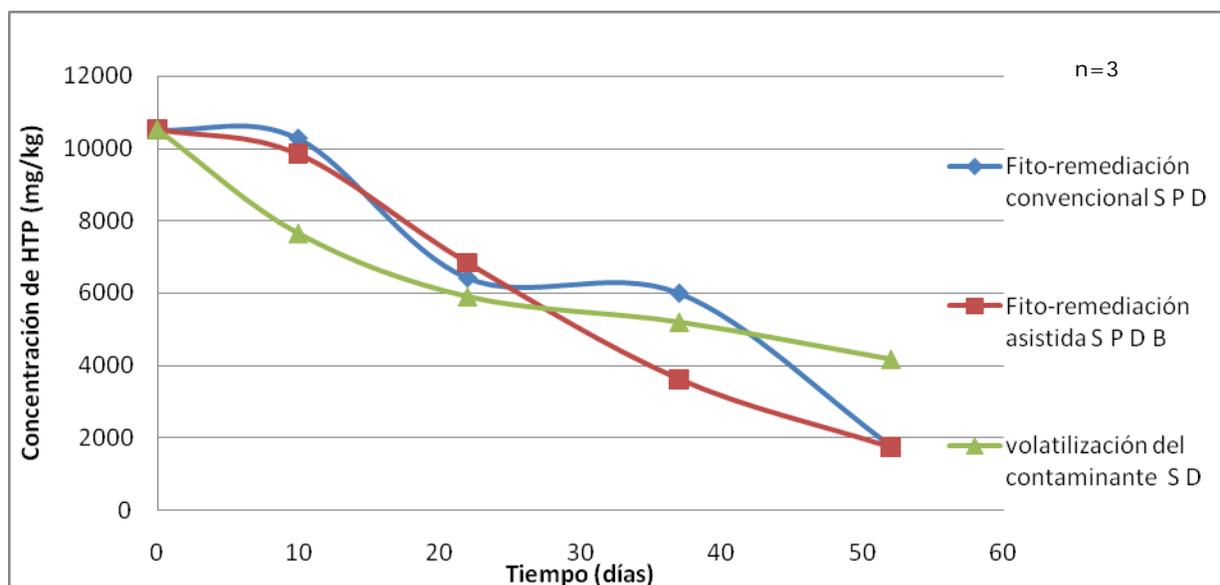


Figura 5.8 Concentración de fracción media de diesel durante el monitoreo de los tratamientos

---

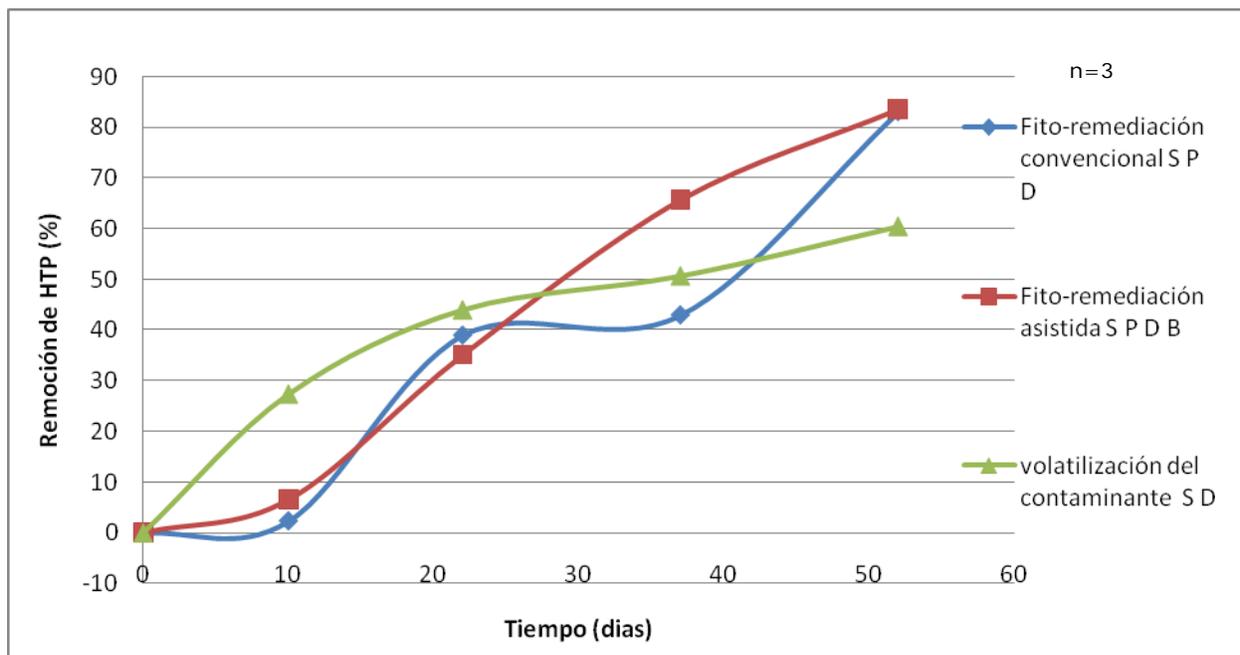
En color rojo se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación asistida (AZm1), en la curva se observa que la concentración del diesel en el día 10 es de 9,838 mg/kg, para el día 22 bajo la concentración considerablemente a 6,832 mg/kg, al día 37 se observa menor concentración de diesel respecto a los 3 sistemas con un valor de 3,616 mg/kg, para el día 62 la concentración final fue de 1,735 mg/kg, obteniendo un valor similar a la fito-remediación convencional.

En color verde se encuentra la curva perteneciente a volatilización del contaminante, en la curva se observa que la concentración del diesel en el día 10 fue de 7,646 mg/kg, para el día 22 bajo a 5,899 mg/kg obteniendo el valor mas bajo de concentración para ese día, al día 37 presenta una concentración similar respecto a los otros sistemas, para el día 62 la concentración final fue de 4,169 mg/kg.

Finalmente, se observa que ambos tratamiento tienen diferente comportamiento uno con respecto del otro, para la fito-remediación convencional la curva en el día 22 y 37 se mantiene constante, el tratamiento de fito-remediación asistida su comportamiento es resultado de la interacción de las BPCV en el sistema, la volatilización del contaminante al día 62 presento un valor alto de concentración con respecto de los dos tratamientos. Por lo tanto la concentración de la fracción media de hidrocarburos, disminuyó después de 62 días, pasando de la concentración inicial de 10,552 mg/kg a 1,735 mg/kg para T1 y 1,771 para T2. La tabla de resultados se encuentra en el **ANEXO C**.

### 5.7 Porcentaje de remoción de fracción media de hidrocarburos

Los resultados en la figura 5.9 indican que el porcentaje de remoción de la fracción media de hidrocarburos (diesel) fue por arriba del 50 %.



**Figura 5.9 Remoción de fracción media de diesel en los tratamientos**

En color azul se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación convencional, en la curva se observa que el porcentaje de remoción para día 10 fue de 2 %, para el día 22 fue de 39 % manteniéndose sin cambio significativo al día 37 con un 43 %, para el día 62 el porcentaje de remoción fue de 83 %.

En color rojo se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación asistida (AZm1), en la curva se observa que el porcentaje de remoción para el día 10 fue de 7 %, para el día 22 fue de 35 %, al día 37 se observa mayor porcentaje de remoción de diesel respecto a los 3 sistemas con un 66 %, para el día 62 el porcentaje de remoción fue de 84 % obteniendo un porcentaje similar a la fito-remediación convencional.

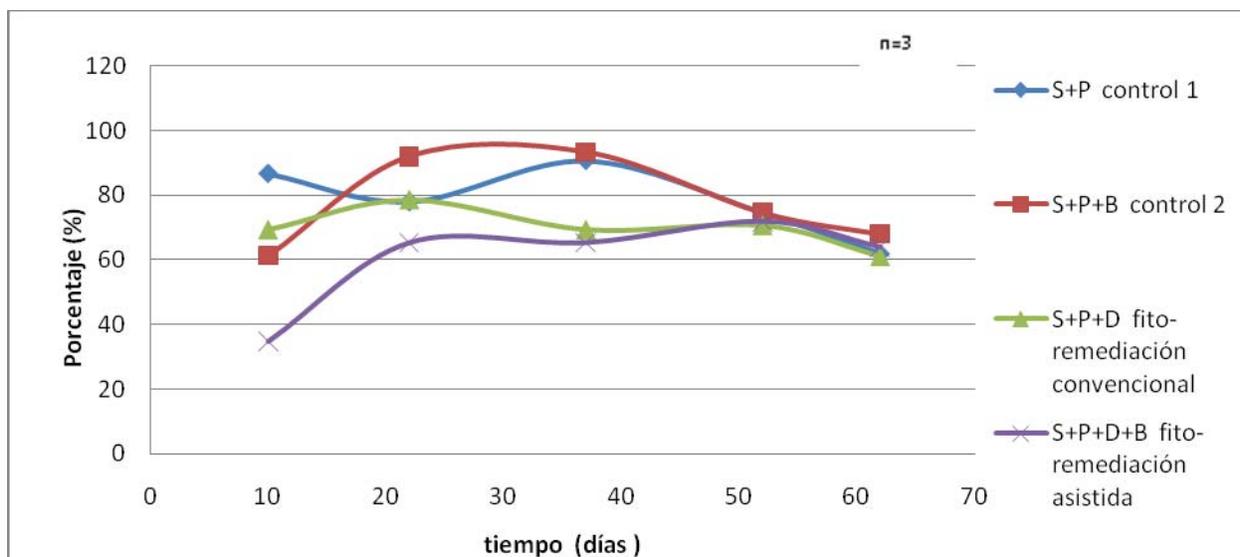
En color verde se encuentra la curva perteneciente a volatilización del contaminante, en la curva se observa que el porcentaje de remoción para el día 10 fue 27 % un valor por arriba de ambos tratamientos, para el día 22 fue de 44 % con un comportamiento similar a los dos tratamientos par ese día, al día 37 presenta un bajo porcentaje de remoción respecto de los otros sistemas, para el día 62 el porcentaje de remoción fue de 60 %.

Se observa que ambos tratamiento tienen diferente comportamiento uno con respecto del otro, para la fito-remediación convencional la curva en el día 22 y 37 mantiene un porcentaje de remoción constante, el tratamiento de fito-remediación asistida tiene un diferente comportamiento de curva esto como resultado de las BPCV en el sistema; la volatilización del contaminante al día 62 presentó un bajo porcentaje de remoción con respecto de los dos tratamientos.

Finalmente de acuerdo a los resultados finales y el planteamiento de la hipótesis el tratamiento de Fito-remediación asistida por AZm1 obtuvo un mayor porcentaje remoción con un valor de 84 % durante un periodo de 62 días a una concentración inicial de 10,552 mg/kg de diesel y una concentración final de 1,735 mg/kg, pero este porcentaje no tienen una diferencia significativa con respecto al tratamiento de fito-remediación convencional, el que si es significativamente diferente en al menos un 20 % de diferencia es el porcentaje de volatilización del contaminante al día 20, pero tuvo un porcentaje del 60 % al día 62, por lo tanto la fito-remediación asistida no obtuvo un porcentaje de remoción mayor que la fito-remediación convencional. La tabla de resultados se encuentra en el **ANEXO C**.

### 5.8 Porcentaje de sobrevivencia de la planta vegetal en los sistemas

En la figura 5.10 se muestran los resultados del porcentaje de sobrevivencia de la especie vegetal (Rye grass) durante el experimento.



**Figura 5.10 Porcentaje de sobrevivencia de la especie vegetal durante el monitoreo de los sistemas experimentales**

En color azul se encuentra la curva perteneciente al control 1, en la curva se observa que el porcentaje de sobrevivencia para día 10 fue de 87 %, para el día 22 fue de 78 %, con un cambio significativo al día 37 del 91 %, para el día 62 el porcentaje de sobrevivencia fue de 62 %, este sistema se tomó como control para el tratamiento de fito-remediación convencional.

En color rojo, se encuentra la curva perteneciente al control 2, en la curva se observa que el porcentaje de sobrevivencia para día 10 fue de 61 %; para el día 22 fue de 92 % manteniéndose sin cambio significativo al día 37 con un 93 %, en este intervalo de tiempo se observa que la sobrevivencia de las plantas se ve afectada por las BPCV; para el día 62 el porcentaje de sobrevivencia fue de 68 % este sistema se tomó como control para el tratamiento de fito-remediación asistida.

En color verde, se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación convencional (AZm1), en la curva se observa que el porcentaje de sobrevivencia para el día 10 fue de 69 %, para el día 22 fue de 79 %, al día 37 se observa un similar porcentaje de sobrevivencia al día 10 con un 69 %, para el día 62 el porcentaje de sobrevivencia fue de 61 % obteniendo un porcentaje relativamente constante durante el experimento y monitoreo de las plantas.

En color morado se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación asistida (AZm1), en la curva se observa que el porcentaje de sobrevivencia para el día 10 fue de 35 % un valor por debajo de los demás sistemas como resultado del acoplamiento de las BPCV al sistema, para el día 22 fue de 65 %, al día 37 se observa un porcentaje de sobrevivencia similar al día 22 con un 65 %, para el día 62 el porcentaje de sobrevivencia fue de 64 % obteniendo un porcentaje similar a la fito-remediación convencional.

Finalmente, observando la fito-remediación asistida comparada con la fito-remediación convencional, ésta presenta menor porcentaje de sobrevivencia que las demás. En base a estos resultados se realizó un análisis estadístico a los tratamientos con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre ambos tratamientos.

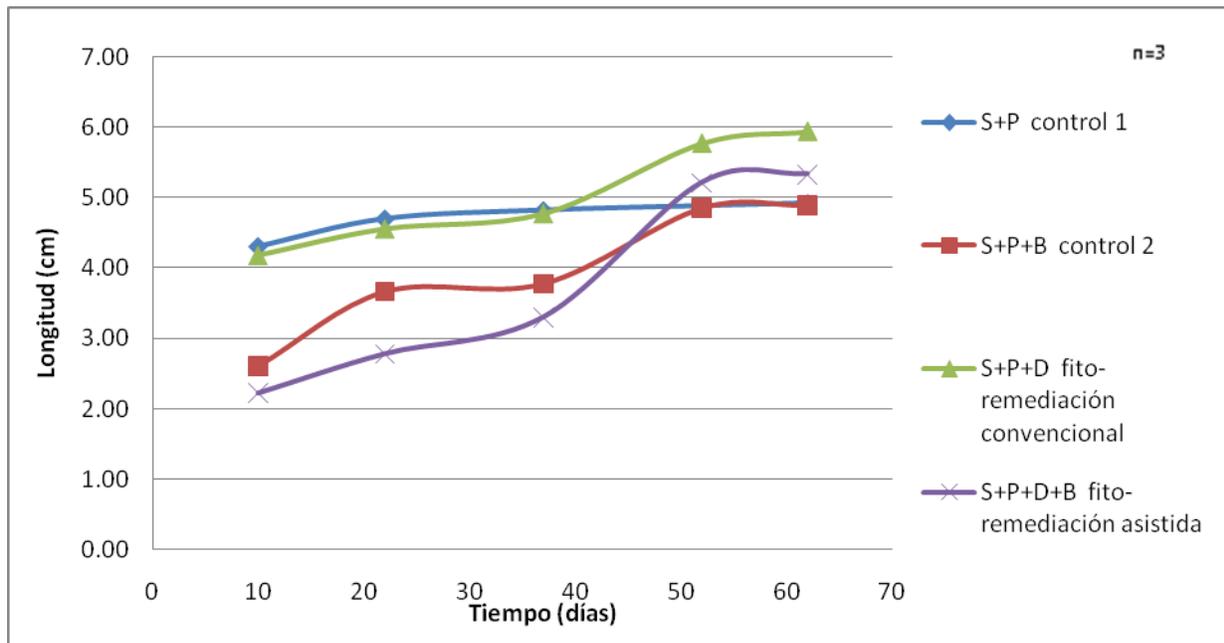
El análisis estadístico indica que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (fito-remediación convencional con la especie vegetal *Lolium perenne* y el tratamiento de Fito-remediación asistida con la especie vegetal *Lolium perenne* inoculada con la cepa AZm1), por lo que la presencia de AZm1 en la especie vegetal incrementa el porcentaje de sobrevivencia, y en presencia de diesel la especie vegetal se ve con menor tolerancia de sobrevivencia.

En general, las plantas tienen diferentes grados de afectación dependiendo de su especie y sensibilidad a un contaminante puede variar en función de factores

ambientales, así como de factores propios de la planta. A este último factor se le dio importancia, ya que la germinación de una planta, no asegura la supervivencia, el establecimiento, ni el desarrollo adecuado de éstas. En el **anexo B** se encuentran los resultados de sobrevivencia por tratamiento y por bloque.

### 5.9 Longitud de raíz y tallo de la planta vegetal

La altura del tallo es un parámetro útil que se mide en ensayos de toxicidad. Esto se debe a que puede evaluarse cuantitativamente, permitiendo observar el grado de afectación en el crecimiento que tiene una planta en presencia de un contaminante. En la figura 5.11, se observan los resultados obtenidos de longitud de raíz en cada sistema.



**Figura 5.11 Longitud de raíz de la especie vegetal durante el monitoreo de los sistemas experimentales durante los periodos**

En color azul, se encuentra la curva perteneciente al control 1. En esta curva, se observa que la longitud de la raíz al día 10 fue de 4.30 cm, para el día 22 fue de 4.70 cm, para el día 62 la longitud de la raíz fue de 4.92 cm, se observa que no hubo un cambio significativo en la longitud de la raíz de la planta durante el experimento; este sistema se tomó como control para el tratamiento de fito-remediación convencional.

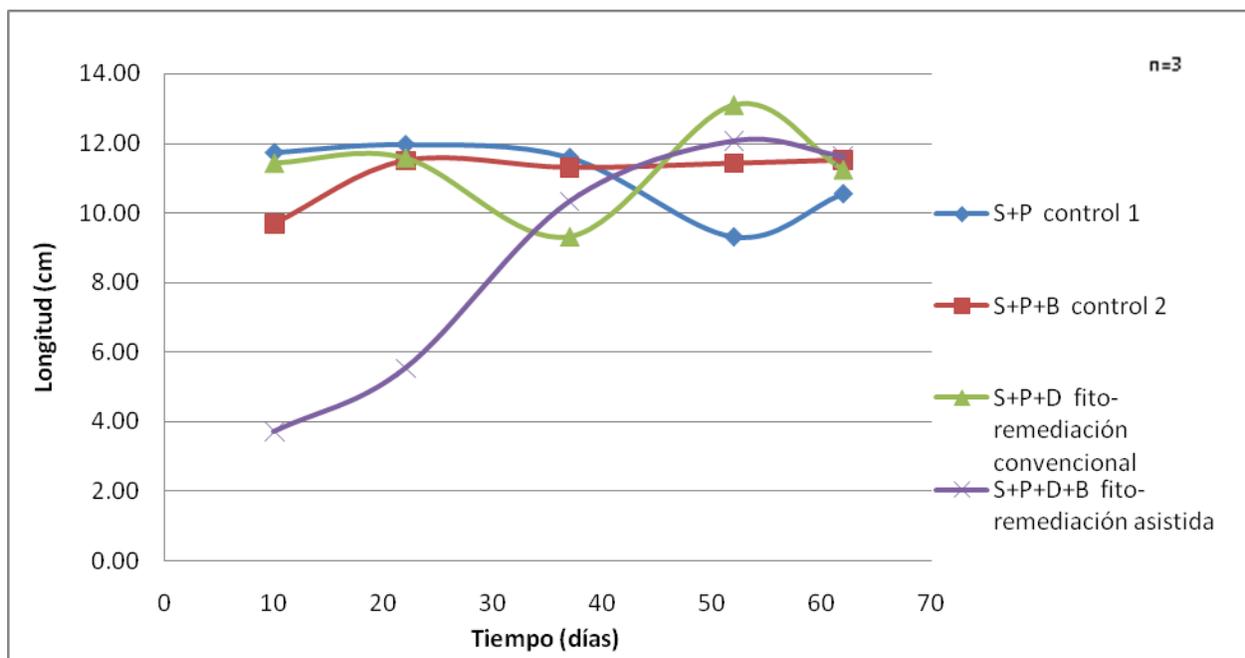
En color rojo, se encuentra la curva perteneciente al control 2, en la curva se observa que la longitud de la raíz al día 10 fue de 2.71 cm ; para el día 22 fue de 3.67 cm; manteniéndose sin cambio significativo al día 37 con una longitud de 3.78 cm; en este intervalo de tiempo se observa que la longitud de las rapices de las plantas se ve afectada por las BPCV; para el día 62 la longitud fue de 4.89 cm, este sistema se tomó como control para el tratamiento de fito-remediación asistida.

En color verde, se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación convencional (AZm1), en la curva se observa que la longitud de la raíz al día 10 fue de 4.18 cm; para el día 22 fue de 4.55 cm; manteniéndose sin cambio significativo al día 37 con una longitud de 4.77 cm; para el día 62 la longitud de la raíz fue de 5.94 cm obteniendo una mayor longitud de raíz con respecto a los demás sistemas durante el experimento.

En color morado, se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación asistida (AZm1), en la curva se observa que la longitud de la raíz al día 10 fue de 2.23 cm; para el día 22 fue de 2.79 cm; manteniéndose un cambio significativo al día 37 con una longitud de 3.31 cm; para el día 62 la longitud de la raíz fue de 5.34 cm obteniendo una longitud de raíz similar a la fito-remediación convencional.

Finalmente, el monitoreo de longitud de raíz en la planta, indica el buen o mal desarrollo de acuerdo a las condiciones establecidas, en el caso de fito-remediación convencional las raíces no se observó afectación en el crecimiento obteniendo longitud de 6 cm como valor establecido, en las observaciones se obtuvo que las raíces presentaban dos ramificaciones; para la fito-remediación asistida las raíces presentaron una longitud de 5.5 cm como valor establecido; en las observaciones las raíces presentaron hasta 4 ramificación, esto debido a la presencia de las bacterias pobladoras en la rizósfera.

En la figura 5.12, se observan los resultados de longitud de tallo de la planta en cada sistema.



**Figura 5.12 Longitud de tallo de la especie vegetal durante el monitoreo de los sistemas experimentales durante los periodos**

En color azul, se encuentra la curva perteneciente al control 1, en la curva se observa que la longitud del tallo al día 10 fue de 11.75 cm, para el día 22 fue de

11.97 cm, para el día 62 la longitud de la raíz fue de 10.56 cm, se observa que no hubo un cambio significativo en la longitud de la raíz de la planta durante el experimento; este sistema se tomó como control para el tratamiento de fito-remediación convencional.

En color rojo, se encuentra la curva perteneciente al control 2, en la curva se observa que la longitud del tallo al día 10 fue de 9.68 cm ; para el día 22 fue de 11.50 cm; manteniéndose sin cambio significativo al día 37 con una longitud de 11.30 cm; en este intervalo de tiempo se observa el crecimiento del tallo de las plantas se ve afectada por las BPCV; para el día 62 la longitud fue de 11.52 cm, este sistema se tomó como control para el tratamiento de fito-remediación asistida.

En color verde, se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación convencional (AZm1), en la curva se observa que la longitud del tallo al día 10 fue de 11.44 cm; para el día 22 fue de 11.58 cm; manteniéndose un cambio significativo al día 37 con una longitud de 9.33 cm; para el día 62 la longitud de la raíz fue de 11.25 cm obteniendo una mayor longitud de raíz con respecto a los demás sistemas durante el experimento.

En color morado, se encuentra la curva perteneciente a fito-remediación asistida (AZm1), en la curva se observa que la longitud del tallo al día 10 fue de 3.73 cm; para el día 22 fue de 5.54 cm; manteniéndose un cambio significativo al día 37 con una longitud de 10.34 cm; para el día 62 la longitud de la raíz fue de 11.64 cm obteniendo una longitud de raíz similar a la fito-remediación convencional.

Finalmente, el monitoreo de longitud de tallo en la planta, indica el buen o mal desarrollo de la planta de acuerdo a las condiciones establecidas, en el caso de fito-remediación convencional los tallos no se observó afectación en el crecimiento obteniendo longitud intermedia por arriba de 10 cm, en las observaciones se obtuvo que las plantas presentaban buenos tallos en color y textura; para la fito-

remediación asistida los tallos presentaron una longitud variable como resultado de las BPCV; en las observaciones los tallos presentaron variación de longitud pero un buen color y textura. Discutiendo estos resultados se obtiene que la presencia de las BPCV en los arreglos experimentales no incrementa el desarrollo radicular ni de tallo, que sería importante para alcanzar mayores profundidades para un tratamiento real. En el **anexo B**, se encuentran los resultados de sobrevivencia por tratamiento y por bloque.

### 5.10 Obtención de peso base seca de la planta vegetal en los sistemas

Los efectos del daño tóxico se determinaron con la biomasa y longitud de tallos y raíces de las plantas. En la raíz la reducción de longitud y biomasa fue similar, no así en el tallo, por lo que las plantas reaccionaron de forma diferente al estrés provocado por el suelo contaminado durante las etapas de exposición, en la figura 5.13 se observa la variación de peso en base seca de la especie vegetal.

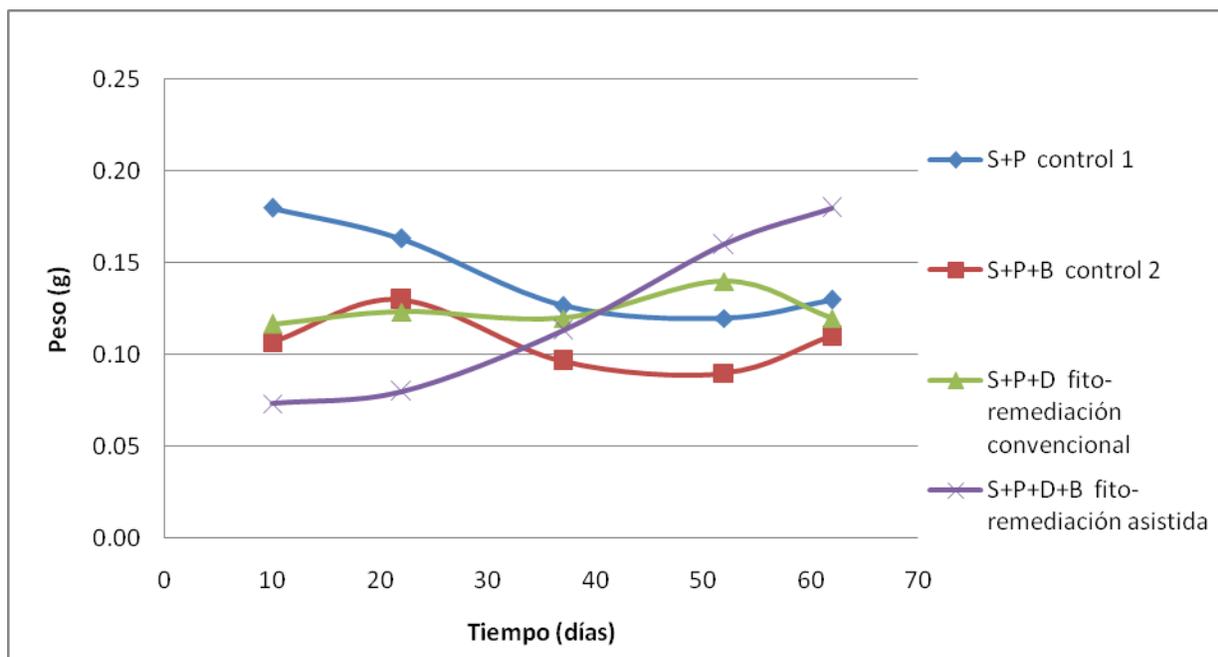


Figura 5.13 Peso Total en base seca de la especie vegetal

De acuerdo a la producción de la biomasa, las plantas tienen mayor sensibilidad a la contaminación de suelo con diesel, y de acuerdo a los resultados de la figura 5.13, se observa lo siguiente: en color morado se observa la curva correspondiente a fito-remediación asistida presentó un valor al día 10 de 0.07 g un valor menor con respecto de los demás tratamientos, para el día 62 0.18 g de base seca un valor mayor con respecto de los tratamientos estos resultados son importantes debido a que hubo concentración de fracción media de hidrocarburos absorbida por parte de la planta y las bacterias ayudaron a tolerar el estrés del contaminante, para el Control 1 color de línea azul en este sistema no hubo presencia del contaminante pero presentó un valor mayor de peso en base seca al día 10 con respecto a los dos sistemas restantes, en color verde se observa la curva que corresponde a fito-remediación convencional presentó un bajo peso en base seca intermedio al día con un valor de 0.12 g y al día 62 con un valor de 0.12 g, en la curva de color rojo correspondiente al Control 2 color de línea rojo presenta valores similares al 10 y al día 62 con un valor de 0.12 g.

### ***5.11 Concentración de fracción media de hidrocarburos en la especie vegetal durante el experimento***

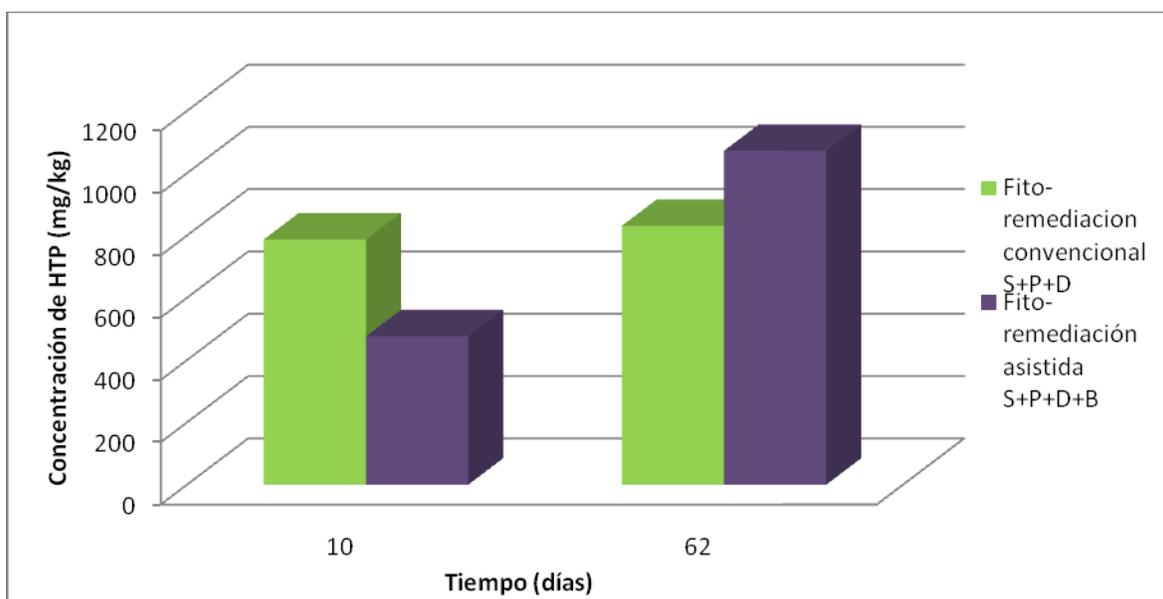
Las plantas que crecen en suelos contaminados con hidrocarburos pueden presentar síntomas similares al efecto de sequía, debido a que alrededor de la raíz se forma una película grasosa que impide la entrada de agua, aunque esto no afecta a todas las plantas, se conoce que las gramíneas se pueden adaptar mejor a estas condiciones (Anderson et al., 1993).

La concentración del contaminante en los sistemas experimentales a lo largo del tiempo fue de suma importancia para determinar este último resultado.

En la figura 5.14, se observa los resultados obtenidos en función de la concentración absorbida por la planta de la fracción media de hidrocarburo durante su monitoreo del día 10 al día 62, dando como resultado los siguientes valores:

En la barra del color verde, corresponde a la fito-remediación convencional, con la concentración al día 10 de 787 mg/kg y al día 62 de 830 mg/kg, para la barra de color morado corresponde a la fito-remediación asistida con la concentración al día 10 de 476 mg/kg y al día 62 una concentración de 1,071 mg/kg.

Lo anterior, podría explicarse que para el T2 en condiciones de estrés (presencia del contaminante) las bacterias AZm1 recurren a la activación del metabolismo secundario, por lo tanto hay una mayor producción y cantidad de compuestos que permiten a la planta asimilar y aprovechar de manera más eficiente los compuestos presentes en el suelo y los producidos por el contaminante por lo que la presencia del contaminante incrementa el tamaño de la comunidad microbiana en el suelo y el pasto.



**Figura 5.14 Concentración de fracción media de diesel en la especie vegetal al día 10 y día 62.**

---

## 6. Conclusiones y recomendaciones

---

Se cumplió con el objetivo de evaluar y comparar la remoción de diesel en el suelo mediante la fito-remediación convencional y asistida por BPCV.

Respecto a la hipótesis se confirmó que, la fito-remediación asistida por AZM1 en suelo contaminado con diesel, tuvo un porcentaje de remoción del 84 % (con una diferencia significativa del 1 % de remoción) con respecto de la fito-remediación convencional con porcentaje de remoción del 83 %. En consecuencia no existe diferencia significativa entre ambos tratamientos. En cuanto a la volatilización del contaminante, el porcentaje de remoción fue del 60%.

Con relación a los objetivos particulares en este trabajo se cumplieron de manera satisfactoria:

- Los resultados de la caracterización del suelo conformado fueron los siguientes: arena 37.97 %, arcilla 22.21 % y limo 22.13 %, un suelo de tipo Franco Arcillo Arenosa; en materia orgánica un valor de 2.54 %; en humedad 23.12 %; el suelo presentó un pH=7.6 del tipo ligeramente alcalino apto para mantener vivas a las BPCV (*Azospirillum lipoferum*); respecto al nitrógeno un valor de 0.12 mg/kg y de fósforo con 1.16 mg/kg.
- Respecto a la concentración letal media de diesel, el valor teórico fue de 15,007.42 mg/kg; el valor real con el que se desarrollaron los experimentos fue de 10,552 mg/kg. La especie vegetal Rye grass (*Lolium perenne*) obtuvo un porcentaje de germinación y sobrevivencia aceptables para la ejecución de los experimentos.

- El porcentaje de sobrevivencia, para todos los sistemas, está en un intervalo del 60 % al día 62. Con respecto al intervalo de longitud de raíz y tallo, para todos los sistemas, el valor es de 5.30 cm en raíz; para tallo de 11.0 cm al día 62
- El pH en el suelo no tuvo un cambio significativo durante el monitoreo de los sistemas a lo largo del experimento.
- La concentración de la fracción media de hidrocarburos (HTP) en la planta para la fito-remediación convencional obtuvo mayor concentración una concentración de 1,071 mg/kg con respecto del tratamiento 1 (sin bacterias AZm1).

Finalmente, concluye que las bacterias facilitan la absorción de los contaminantes por las plantas. Sin embargo, en este estudio las bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) no produjeron efectos significativos en ninguna de las variables consideradas. Una posible explicación de la diferencia encontrada, podría atribuirse al tiempo del experimento que se llevó a cabo en un período de 62 días, es decir sería necesario un mayor periodo experimental, así como aumentar el número de plantas con las que se experimente.

### **Recomendaciones**

- Para estudios posteriores es importante investigar la relación raíz-bacteria (para el caso de este experimento *Lolium perenne* con AZm1), la relación de microorganismos asociados a la rizósfera, la influencia de posibles enzimas secretadas por las raíces de las plantas esto con el fin de determinar si realmente una ración de diesel se queda en la planta o solo la planta sirve como puente de volatilización de la fracción media de hidrocarburo.

- Establecer un periodo más largo para el experimento y una concentración elevada a la planteada en este experimento, con una variación en la cantidad de semillas por sistema, con el fin de obtener diferencias significativas en cada tratamiento de fito-remediación convencional y fito-remediación asistida.
- Hacer un balance de evaporación de agua con respecto del diesel con suelo para evita la evaporación del agua en los sistemas, esto debido a la que se presentó olores de descomposición y putrefacción, debido al almacenamiento del agua en los sistemas.
- Otro aspecto importante para este experimento es hacer un estudio detallado del contaminante en la planta, con el fin de saber que cantidad específica de contaminante se queda en la planta, así como su traslado a la rizósfera y al tallo.
- Obtener una curva de crecimiento por cada sistema que contenga bacterias, para saber la cantidad inicial y final de la población, a las condiciones de suelo contaminado y suelo sin contaminar.

---

## 7. Bibliografía

---

- 1) Anderson T., Guthrie E., y Walton B. 1993. **Bioremediation in the rhizosphere**. Environ Sci. Techno 27 pp 180-209
- 2) Beramendi Orosco L. E. 1999. **Análisis y caracterización de suelos contaminados por hidrocarburos en el campus universitario**. Tesis de licenciatura. Facultad de química. UNAM. México.pp 22-48
- 3) Jiménez Cisneros B. 2001. **La contaminación ambiental en México, causa, efectos y tecnología apropiada**. Editorial Liumusa SA. De C.V. pp 191-240
- 4) Bashan Y. y de Bashan L. 2005. **Plant growth-promoting bacteria for use in agriculture**. Departamento de microbiología, division de biología experimental, Centro de investigación biológica del Noroeste, México. pp 103-115.
- 5) Bosser I. y Bartha R. 1999. **The fate of petroleum in soil ecosystem**. Atlas R.M. Petroleum Microbiology Macmillan Publishing Co. New York.pp 156-164
- 6) Brady, N .1999. **The nature and properties of soil**. Editorial Prentice-Hall México. pp 15-21
- 7) Camarillo Carpintero A. M. 2006. **Determinación de la actividad de la ACC deminasa en cepas de Azospirillum**. Tesis de licenciatura. Facultad de química. UNAM. México pp 33-40
- 8) Chirstensen, H. Roon. R Ekelund. F. y Christensen, S. 1995. **Bacterial Production determined by Thymidine Incorporation on Field Rhizospheres as Evaluated by comparation to rizophodeposition**. Biochem pp 70-98
- 9) Cole, M. 1994. **Assessment and remediation of petroleum contaminated site**. Editorial Lewis Publishers. USA pp 264-269

- 
- 10) Colin B. 2005. **Química ambiental**. Editorial Reverté, S.A. España pp 60-120
  - 11) Cunningham, S.D y Betri, W.R. 1993. **Remediation of contaminated soil with green plants a overwie in vitro cell**. Biol. Pp 46-90
  - 12) Calabrese E. y Kostecki P.1992 . **Hydrocarbon contaminated soils and groundwater**. Vol. 2 Editorial Lewis Publisher. E.U.A pp 92-99
  - 13) Frankenberger Jr. W., 1992. **The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. In hydrocarbons contaminated soils and groundwater**. Vol. 2 Lewis publishers, Boca Raton. USA pp 264-280
  - 14) Tortora, Gerard. J. Berdell R. Funke y Christine L. Case. 1993. **Introducción a la microbiología**. Editorial Acriba, S.A. Zaragoza España pp 70-140.
  - 15) Hoffman D. Rather B. y Cairns J. 2003. **Handbook of ecotoxicology**. Editorial Lewis Publishers 2da edition. USA. pp 25-60
  - 16) Casal I. García J. Guisán J. Martínez –Zapater y Rojo f.. 2004. **Bioteología en pocas palabras, bioteología y medio ambiente**. Editorial Sebiot España.pp 32-50
  - 17) Jiménez, C.B. 2001. **Contaminación ambiental en México: causa, efecto y tecnología apropiada**. Editorial Limusa, México pp 62-78.
  - 18) LEGEEPA.1999. **Ley general del equilibrio ecológico y protección al ambiente**. Gaceta ecológica Num.52.INE-SEMARNAT.México.
  - 19) Mackenzie L. Davis y Masten S (2005). **Ingeniería y ciencias ambientales**. Editorial Mc-Graw-Hill. México

- 
- 20) Viñas Canals 2005. Tesis **Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica**. Universidad de Barcelona, Facultad de biología pp 30-45
- 21) Metting, F. Jr.2001. **Soil microbial ecology**. Editorial Marcel Dekker, inc. New York.pp 40
- 22) Flores, M. 2004. **Medidas de mitigación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en la infraestructura de transporte terrestre**. Sandandila, Oro: Publicación tecnica No 257.pp 60
- 23) Norma oficial mexicana **NOM-021-SERMARNAT-2000** que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Segunda edición. Secretaria
- 24) Porta, C. López, A. y Roquero. L, 1994. **Edafología para la Agricultura y el Medio ambiente**. Editorial Mundi-Prensa. España Madrid pp 92-106
- 25) Volke Sepúlveda, Velasco J. y Trejo.2002. **Técnicas de remediación para suelos contaminados**. Instituto nacional de ecología (INE-SEMARNAT), México.pp 33-66
- 26) Piña Cobos M. 2004. **Estudio de la biodegradabilidad aerobia de hidrocarburos en un suelo conformado artificialmente. Tesis de maestría. Facultad de ciencias. UNAM. México**.pp 12-30
- 27) Ramirez T. 2007. **Contaminación del suelo y métodos para su remediación**. FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA. UNAM.MEXICO. pp 22-30
- 28) Juarez C.. (2007). **Evaluación de la fitorremediación con Hidrocarburos utilizando tres especies**. FACULTAD DE CIENCIAS. MEXICO pp 18-37
- 29) Wise L. D. & Trantolo D. J. 1994. **Remediation of hazardous Waste**

**Contaminated Soils**, Marcel D. Inc. USA. pp 103-115

### ***Información electrónica***

- 30) Anónimo. 2007. Boletín Informativo de la Universidad de las Américas. La mayor fuente de contaminación del suelo mexicano son los hidrocarburos. (Consulta 8, marzo 2009):
  
- 31) 2 de Noviembre 2009.  
Dirección: <http://images.google.com/imgres?imgurl=http://www.sener.gob.mx/webSener/statistic/Secciones/Hidrocarburos/d>
  
- 32) Petróleos Mexicanos, PEMEX, [www.Pemex.com](http://www.Pemex.com) Consulta 10 de agosto, 2009.
  
- 33) Grupo energéticos, energéticos internacionales, Consulta 26 de julio, 2009 Dirección: <http://old.grupoenergeticos.com/hub.cfm/informacion-tecnica/propiedades-diesel-industrial/index.htm>

---

## 8. Anexos.

---

### Anexo A

#### **TÉCNICAS EMPLEADAS EN LA CARACTERIZACIÓN DEL SUELO NATURAL Y SUELO CONFORMADO.**

##### **BREVE DESCRIPCIÓN Y FUNDAMENTO**

Todas las técnicas fueron tomadas de la Norma Oficial Mexicana Nom-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelo, estudio, muestreo y análisis.

##### 8.1 Determinación del pH del suelo medido en agua a través del método AS-02.

El pH es una de las mediciones más comunes e importantes en los análisis químicos rutinarios de suelo, ya que controla reacciones químicas y biológicas en el suelo. La determinación de pH es afectada por varios factores tales como: el tipo y cantidad de constituyentes orgánicos e inorgánicos que contribuyen a la acidez del suelo, la concentración de sales en solución, la relación suelo: solución, la presión parcial de bióxido de carbono y el efecto de la suspensión asociado con el potencial de unión, etc.

##### **Reactivos:**

Los reactivos utilizados en esta determinación deben ser grado analítico y el agua utilizada en la preparación de las soluciones debe ser destilada o desionizada.

1. Agua destilada o desionizada.
2. Soluciones reguladoras de referencia, pH 4.00, 7.00 y 10.00.

##### **Material y equipo:**

1. Potenciómetro o medidor pH equipado con electrodo de vidrio en combinación con electrodo de referencia.
2. Balanza con 0.1 g de sensibilidad.

3. Frasco de vidrio o plástico transparente de boca ancha con capacidad de 50 a 100 mL.
4. Pipeta volumétrica de 20 mL.
5. Varilla de vidrio que sirva como agitador manual.
6. Piceta.

**Procedimiento:**

1. Pesar 10 g de suelo en un frasco de vidrio o plástico de boca ancha.
2. Adicionar 20 mL de agua destilada al frasco contenido en el suelo.
3. Con una varilla de vidrio, agitar manualmente la mezcla de suelo: agua a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos.
4. Dejar reposar 15 minutos.
5. Calibrar el medidor de pH de ser necesario antes de iniciar la lectura de lo contrario calibrar con las soluciones reguladoras.
6. Agitar nuevamente la suspensión e introducir el electrodo en la suspensión.
7. Registrar el pH al momento de que la lectura se haya estabilizado.

**Interpretación de los resultados:**

Para la clasificación del suelo en cuanto a su valor de pH se presenta el cuadro siguiente:

<b>Clasificación</b>	<b>pH</b>
Fuerte ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 - 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

## ***8.2 Determinación del contenido de humedad del suelo por gravimetría, se realiza a través del método AS-05.***

El método se basa en la medición o determinación de la cantidad de agua expresada en gramos que contiene una muestra de suelo. Esta masa de agua se referencia de la masa de suelo seca de la muestra. La determinación de la masa de agua se realiza por la diferencia en peso entre la masa de suelo húmedo y la masa de suelo seco. Se considera como suelo seco aquel secado a la estufa a 105 °C hasta obtener un peso constante.

### **Material y equipo:**

1. Platos de aluminio para humedad
2. Estufa con circulación forzada de aire y temperatura controlada
3. Balanza con aproximación de 0.01 g.
4. Pinzas.
5. Desecador.

### **Procedimiento:**

1. Lavar y limpiar perfectamente e identificar los botes de aluminio a utilizar.
2. Los botes con todo y tapa introducirlos a la estufa durante 8 horas como mínimo a una temperatura de 105 °C posteriormente registrar el peso y volver a introducir los botes a la estufa hasta que se logre un peso constante en las muestras, todo este procedimiento previo al enfriamiento de los platos que se colocan en el desecador.
3. Utilizando las pinzas, sacar los platos del desecador de vacío hasta que se enfríen y pesar con todo y tapa, éste será el peso del botes (PB).
4. Obtener la muestra deseada, se recomienda sean de 30 a 50 gramos, aproximadamente, y colocar en el bote de aluminio, en caso de que la muestra vaya a ser transportada es necesario tapar y sellar herméticamente en plato con parafilm.

5. Pesar el bote con el suelo húmedo, este peso deberá ser el peso del bote más el suelo húmedo (PB + Psh).
6. Destapar el bote con el suelo húmedo, colocar la tapa en la parte inferior e introducir a la estufa a una temperatura de 105 °C.
7. Después de 24 horas sacar el bote de la estufa tapado y colocar en el desecador de vacío hasta que se enfríe, posteriormente pesar el bote con la muestra seca, este peso será el peso del bote mas el peso del suelo seco (PB + Ss).
8. Volver a introducir el bote a la estufa y una hora después sacar, enfriar en un desecador y pesar; repetir este procedimiento hasta obtener peso constante.

#### **Cálculos:**

$$\theta g = \frac{(PB + Psh) - (PB + Pss)}{(PB + Pss) - PB} \times 100$$

Donde  $\theta$  = contenido de humedad gravimétrica expresado en porcentaje (%).

PB = peso del bote con tapa (g).

Psh = peso del suelo húmedo (g).

PB+ Psh= peso del bote mas peso del suelo húmedo (g).

PB + Pss = peso del bote mas peso del suelo seco (g).

### ***8.3 Determinación del de materia orgánica del suelo por gravimetría, se realiza a través del método AS-07 de Walkley y Black.***

La determinación de materia orgánica del suelo se evalúa a través del contenido de carbono orgánico con el método de Walkley y Black. Este método se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclar con ácido sulfúrico concentrado. Después de un cierto tiempo se espera la mezcla se diluye, se adiciona ácido fosfórico para evitar interferencias de Fe<sup>3+</sup> y el dicromato de potasio

residual es valorado con sulfato ferroso. Con este procedimiento se detecta entre un 70% y 84% del carbono orgánico total por el que es necesario introducir un factor de corrección, el cual puede variar entre suelo y suelo. En los suelos de México se recomienda utilizar el factor 1.298 (1/0.77).

**Reactivos:**

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa.

1. Dicromato de potasio 0.166 M o 1N. disolver 48.82 g de  $K_2Cr_2O_7$  en agua destilada aforar a 1000 mL en un matraz volumétrico.
2. Ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ).
3. Ácido fosfórico concentrado ( $H_3PO_4$ ).
4. Indicador de difenilamina. Disolver 05 g de difenilamina en 20 mL de agua y añadir 100 mL de ácido sulfúrico concentrado.
5. Sulfato ferroso 1.0 M (aproximadamente). Disolver 278 g de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  en agua a la que previamente se le añadieron 80 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, enfriar y diluir a un litro. Esta solución debe ser valorada con  $K_2Cr_2O_7$  1 N antes de realizar la determinación.

**Material:**

1. Matraces Erlenmeyer de 500 mL.
2. Bureta para  $K_2Cr_2O_7$  (50 mL).
3. Bureta para  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (50 mL).
4. Pipeta volumétrica (10 mL).
5. Probeta de vidrio (25mL).

**Procedimiento:**

1. Pesar 0.5 g de suelo seco y pasado por un tamiz de 0.5 mm y colocarlo en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Procesar un blanco con reactivos por triplicado.
2. Adicionar exactamente 10 mL de dicromato de potasio 1 N girando el matraz cuidadosamente para que entre en contacto con todo el suelo.
3. Agregar cuidadosamente con una bureta 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado a la suspensión, girar nuevamente el matraz y agitar de esa forma durante un minuto.
4. Dejar reposar durante 30 minutos sobre una lamina de asbesto o sobre una mesa de madera, evitando las mesas de acero o cemento.
5. Añadir 200 mL de agua destilada.
6. Añadir 5 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> concentrado.
7. Adicionar de 5 a 10 gotas del indicador de difenilamina.
8. Titular con la disolución de sulfato ferroso gota a gota hasta un punto final verde claro.

**Cálculos:**

$$\%C \text{ orgánico} = \frac{B-T}{g} (N)(0.39)mcf$$

**Donde:**

B = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco en reactivos (mL).

T = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (mL).

N = normalidad exacta de sulfato ferroso (valorar por separado al momento de analizar las muestras).

g = peso de la muestra empleada (g).

mcf = factor de corrección de humedad.

$$\% \text{ Materia orgánica} = \% C \text{ orgánico} \times 1.724$$

### Interpretación de resultados de Materia Orgánica

Los valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos se presenta en el cuadro siguiente:

Clase	Materia Orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.4 – 6.0	0.6 – 1.5
Medio	6.1 – 10.9	1.6 – 3.5
Alto	11.0 – 16.0	3.6 – 6.0
Muy alto	> 16.0	> 6.0

#### ***8.4 La determinación de nitrógeno inorgánico del suelo se realiza a través del método Kjeldahl.***

##### Manejo de la muestra

Se recomienda que la muestra de suelo sea secada al aire, colocando una capa delgada en una bandeja.

Se deberá mezclar o moler las muestras sólidas con partículas grandes.

##### Cantidad de la muestra

En la siguiente tabla se muestra una sugerencia que se debe de tomar en cuenta según el contenido esperado de proteínas para alimentos, de la concentración de nitrógeno para agua y el contenido de esperado de materia orgánica y suelo.

**Sólidos**

Contenido proteínas	Masa de muestra
Hasta 5 % 1 000	5 000 mg
5 - 30 % 500	1 500 mg
Más de 30 % 200	1 000 mg

**Líquidos (agua)**

Concentración Nitrógeno	Volumen de la muestra
< 20 mg N / L	100 mL
20 - 50 mg N / L	50 mL
50 - 100 mg N / L	25 mL

**Suelo**

Concentración Nitrógeno	Volumen de la muestra
Pobre 0.032% - 0.095%	1000 - 5000 mg
Medio 0.096% - 0.158%	500 - 1500 mg
Rico 0.159% - 0.221%	200 - 1000 mg

Teniendo esta aproximación se puede tener más detalle del catalizador y de los reactivos a utilizar.

	Peso de la muestra en gramos				
	<b>5</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>0.5</b>	<b>0.1251</b>
<b>Catalizador</b>	4	3	2	1	1
<b>Ácido sulfúrico</b>	40	30	20	10	10

**Nota:** Si se cambia la cantidad de ácido para la digestión, la cantidad de sosa para la destilación debe ser cambiada en forma proporcional.

1g    20 mL acido 90 mL sosa 32% (estándar)

### Material y equipo

1. Muestra de suelo seco y molido con un mortero.
1. Balanza analítica.
2. Matraces Kjeldahl.
3. Vasos de precipitados.
4. Probetas.
5. Digestor.
6. Matraz aforado de 1 L.
7. Matraces Erlenmeyer de 1 L.
8. Perlas de ebullición.
9. Pipeta.
10. Destilador.
11. Bureta.
12. Soporte universal con pinza.

### Soluciones y reactivos

Las soluciones tienen que ser preparadas con agua libre de amonio.

- 1) Solución indicadora A: 0.1 g de fenolftaleína y disolver con etanol. Llevar a aforo de 100 mL con etanol.
- 2) Solución indicadora B: pesar 0.033g de verde bromocresol y 0.066g de rojo de metilo, los cuales se disuelven y llevan al aforo a 100 mL de etanol. El indicador debe ser preparado mensualmente.
- 3) Solución de ácido bórico con indicador. Pesar 20 g de ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) y disolver en 750 mL de agua destilada. Calentar para la completa disolución del ácido. Dejar enfriar y agregar 35 mL de la solución indicadora B y 10 mL de la solución indicadora. Mezcla y adicionar suficiente agua hasta dejar un espacio de 2 cm en el cuello del matraz aforado, ajustar el color de esta solución con ácido o base a un tono café rojizo y por último llevar al aforo de 1 L con agua destilada.

- 4) Solución de hidróxido de sodio 0.1 N: Pesar 4 g de hidróxido de sodio (NaOH), disolver en agua destilada y aforar a 1 L.
- 5) Mezcla de catalizadores: pesar 62.5 g de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) y 6.25 g de sulfato de cobre pentahidratado ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ). Homogeneizar la mezcla.
- 6) Solución de hidróxido de sodio 10 N: Pesar 200 g de hidróxido de sodio (NaOH), disolver en agua destilada y aforar a 500 mL. El agua para preparar la solución debe ser hervida previamente para eliminar el  $CO_2$ , dejándola enfriar antes de agregarla.
- 7) Solución de ácido clorhídrico 0.01 N: Diluir 100 mL de ácido clorhídrico concentrado hasta completar un volumen de 1 L con agua destilada. La concentración del ácido debe ser estandarizada con la solución valorada de carbonato de sodio.
- 8) Solución valorada de biftalato de sodio: Pesar 0.235 g de biftalato de sodio y disolver en agua destilada y aforar a 50 mL.

#### **Valoración de la normalidad del ácido clorhídrico 0.01 N:**

1. Tomar 3 alícuotas de 10 mL de la solución de biftalato de sodio.
2. Agregar 5 o 6 de la solución indicadora a.
3. Titular con la solución de hidróxido de sodio 0.1N.
4. Calcular la normalidad real sustituyendo en la siguiente fórmula:
5. Normalidad del NaOH= (masa del biftalato g/ 204) X (1/ Promedio de mL gastados en las tres alícuotas)
6. Calcular la normalidad real de la solución de ácido clorhídrico 0.01 N sustituyendo en la siguiente fórmula:
7. Normalidad del HCl = (Normalidad del NaOH/ 1000) X (1/ Promedio de mL gastados).

#### **Procedimiento A. Digestión.**

- 1) Pesar una muestra de suelo de 0.25 a 1 g, que dependerá de la materia orgánica contenida en el suelo, entre más materia orgánica tenga un suelo menos serán los gramos de muestra.

- 2) Colocar la muestra de suelo en un matraz Kjeldahl seco.
- 3) Adicionar 2 g de mezcla de catalizadores.
- 4) Agregar 5 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- 5) Poner a calentar en el digestor a una temperatura media, hasta que la muestra se torne clara. La temperatura debe ser regulada de modo que los vapores de ácido sulfúrico se condensen en el tercio inferior del cuello del matraz Kjeldahl.
- 6) Hervir la muestra por una hora a partir de ese momento.
- 7) Una vez terminada la digestión, apagar el digestor y tapar con un frasco los matraces para dejar enfriar por alrededor de 30 a 45 min.

#### **B. Destilación.**

- 1) Añadir al matraz Kjeldahl frío 20 mL de agua destilada y mezclar vigorosamente hasta una disolución completa, esto tendrá que ser realizado dentro de la campana de extracción.
- 2) Transferir el líquido a un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Colocar de 5 a 6 perlas de ebullición.
- 3) Adicionar 3 granallas de zinc. Añadir aproximadamente 15 mL de la solución de hidróxido de sodio, sosteniendo el matraz inclinado de modo que se deposite en el fondo de manera tal que vire a color café la muestra en el matraz.
- 4) Colocar en la salida del aparato de destilación un vaso de precipitados de 50 mL, que contenga 10 mL de la solución de ácido bórico más indicador.
- 5) Conectar el flujo de agua e iniciar la destilación. Destilar hasta que el volumen alcance la marca de hasta que vire la solución a color verde. Una vez alcanzado dicho volumen, retirar el matraz y apagar el aparato.
- 6) Titular el nitrógeno amoniacal con la solución de ácido clorhídrico 0.01 N hasta que vire de verde a rosado fuerte.
- 7) Realizar un blanco siguiendo los pasos del 3 al 15.

## Cálculos

Calcular la concentración de nitrógeno, sustituyendo en la siguiente fórmula:

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \frac{(T - B) \times N \times 1.4}{S}$$

Donde:

T = mL de ácido clorhídrico valorado gastados en la muestra.

B = mL de ácido clorhídrico valorado gastados en el blanco.

N = normalidad exacta del ácido clorhídrico.

S = peso de la muestra de suelo.

En la siguiente cuadro se presentan valores de nitrógeno que sirven para evaluar la calidad de un suelo.

Criterios para evaluar un suelo con base en su contenido de nitrógeno total (Moreno, 1978).

Categoría Valor (%) de nitrógeno en suelo	
Extremadamente pobre	< 0.032
Pobre	0.032 - 0.063
Medianamente pobre	0.064 - 0.095
Medio	0.096 - 0.126
Medianamente rico	0.127 - 0.158
Rico	0.159 - 0.221
Extremadamente rico	> 0.221

### ***8.5 Determinación de fósforo en suelo por el procedimiento estandarizado Laboratorio de Edafología Ambiental 2000.***

Determinar el fósforo soluble en bicarbonato de sodio a pH 8.5. El alto pH de la solución extractora hace a este método apropiado para suelos calcáreos, alcalinos o neutros que contengan fosfatos de calcio ya que la concentración de calcio en la solución es suprimida por la precipitación de  $\text{CaCO}_3$ . Como resultado, la concentración de fosfato en la solución se puede incrementar. Este propósito puede aplicarse también a suelos ácidos, ya que el pH relativamente alto de carbono suprime la solubilidad de Al y Fe y permite que quede en solución.

#### **Principio:**

Se hace una extracción con una solución de bicarbonato de sodio 0.05 M pH 8.5. El fósforo en el extracto se determina colorimétricamente (color azul) con molibdato de amonio y ácido ascórbico como agente reductor.

Con la solución de molibdato, el fósforo forma ácido molibdofosfórico que es reducido a azul molibdofosfórico con el ácido ascórbico dando una coloración azul. El antimonio acelera el desarrollo del color azul y lo estabiliza hasta por 24 horas. Con este método no se esperan interferencias de Si.

#### **Material y equipo:**

1. Balanza.
2. Potenciómetro.
3. Espectrofotómetro.
4. Celdas para espectrofotómetro.
5. Agitador mecánico.
6. Matraces Erlenmeyer de 250 mL o envases de polietileno de 250 mL para agitación.
7. Tubos de ensaye.
8. Papel filtro Whatman No. 40.
9. Embudos de plástico.

10. Pipetas volumétricas o micropipeta
11. Matraces volumétricos para preparar los reactivos
12. Matraces aforados de 25 mL.
13. Probetas para preparar reactivos.
14. Piceta.

Todo el material debe estar lavado con agua acidulada.

**Reactivos:**

1. Solución extractora de bicarbonato de sodio 0.5 M pH de 8.5. disolver 42 g de  $\text{NaHCO}_3$  en agua destilada y aforar a 1 litro. Ajustar el pH a 8.5 agregando  $\text{NaOH}$  1 M (4g /100 mL).
2. Ácido sulfúrico 4 M: agregar con mucho cuidado utilizando guantes y goggles 56 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (96 %) a aproximadamente 150 mL de agua destilada en un vaso graduado bajo agitación constante. Después de enfriar, aforar a 250 mL con agua destilada.
3. Solución molibdato de amonio 4 %. Disolver 4 g de molibdato de amonio en agua destilada y aforar a 100 mL. Almacenar en envase de plástico.
4. Solución de tartrato de potasio y antimonio. 0.275 % (1000 mg /L Sb). Disolver 0.275 g de tartrato de potasio y antimonio en agua destilada y llevar a 100 mL.
5. Solución de ácido ascórbico. 1.75 %. Disolver 1.75 g de ácido ascórbico en agua destilada y llevarlo a 100 mL.
6. Mezcla reactiva. Sucesivamente agregar con una probeta a un envase de plástico o pyrex y homogenizar después de cada adición:
  - 200 mL de agua destilada
  - 50 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  4M
  - 15 mL de la solución de ácido ascórbico
  - 5mL de solución de tartrato de potasio y antimonio
7. Solución estándar de fósforo de 100 mg/L. diluir 100 mL de la solución patrón de 1000 mg/L, en un matraz aforado y llevar a 1 litro de agua

destilada, o bien, disolver 0.4390 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (previamente secado a 105 °C) en agua destilada y aforar a un litro.

8. Solución estándar de fósforo de 4 mg/l. colocar 10 mL de la solución estándar de P de 100 mg/L en un matraz aforado de 250 mL y llevar a volumen con la solución extractora.
9. Serie de estándares. Colocar en matraces aforados de 100 mL 0, 10, 20, 30, 40, y 50 mL de la solución estándar de 4 mg/l. llevar a volumen con solución extractora. La concentración de los estándares es entonces 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0.

### **Muestra:**

El suelo debe estar secado al aire y tamizado (<2mm). A una alícuota de este material se le determina la humedad actual de acuerdo al PRESOP MET-008.

Procedimiento:

### **A. extracción:**

1. Pesar 2.5 g de suelo y colocarlo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL (incluir muestra patrón por duplicado y 2 blancos de reactivos), añadir 50 mL de solución extractora, agitar durante 30 minutos y filtrar inmediatamente a través de papel W. No. 40.

### **B. Determinación:**

Colocar una alícuota de 3 mL de la serie de estándares, los blancos y los extractores de las muestras en un tubo de ensaye (de 20 mL por lo menos), agregar lentamente y con cuidado 3 mL de la mezcla reactiva y agitar. Dejar reposar las soluciones por 1 hora para que el color azul se desarrolle al máximo. Medir la transmitancia en el espectrofotómetro a 720 nm contra el cero de la curva.

**Cálculos:** Se hace el cálculo correspondiente trazando la curva de mg P/L contra la absorbancia. (El valor del coeficiente  $R^2$  de la curva de calibración debe ser cuando menos 0.0999 para considerarla aceptable).

$$P \text{ (mg/kg)} = (a-b) \times (\text{vol del extractante} / \text{peso muestra}) \times d \times \text{fch}$$

a = mgP/l obtenidos en la muestra

b = mgP/l obtenidos en el blanco

d = factor de dilución (en caso de que haya)

fch = factor de corrección de humedad

vol extractante = 50 mL

Peso de la muestra 2.5 g

### ***8.6 Determinación de textura del suelo por el procedimiento de Bouyoucos, se realiza a través del método AS-09.***

La textura del suelo define como la proporción relativa de grupos dimensionales de partículas. Proporciona una idea general de las propiedades físicas del suelo. Su determinación es rápida y aproximada. En general el problema es separar los agregados y analizar sólo partículas. En el presente método se elimina la agregación debida a materia orgánica y la floculación debida a los cationes calcio y magnesio. No se eliminan otros cementantes como carbonatos. El tiempo de lectura se ha escogido a 40 segundos para la separación de partículas mayores de 0.05 mm (arena) y de 2 horas para partículas de diámetro mayores de 0.002 mm (limo y arena). Estos límites han sido establecidos por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos y se han usado para construir el triángulo de texturas.

**Reactivos:**

1. Agua oxigenada al 30%.
2. Oxalato de sodio saturado. Disolver 30 g de oxalato de sodio en 1 litro de agua.
3. Metasilicato de sodio con 36 g L<sup>-1</sup> de lectura con el hidrómetro. Disolver 50 g de metasilicato de sodio en 1 litro de agua ajustar la solución hasta que se obtenga una lectura de 36 con el hidrómetro.

**Material y equipo:**

1. Hidrómetro de Bouyoucos con escala de 0-60.
2. Probeta de 1000 mL.
3. Cilindro de Bouyoucos.
4. Agitador con motor de dispersión.
5. Agitador de mano.
6. Termómetro de -10 a 100 °C.

**Procedimiento:**

1. Pesar 60 g de textura fino o 120 g de textura gruesa en un caso de precipitados de 500 mL agregar 40 mL de agua oxigenada y poner a evaporar hasta sequedad, agregar otros 40 mL y observar la reacción. Evaporar nuevamente a sequedad. Repetir hasta que no haya efervescencia al agua oxigenada.
2. En general dos ataques son suficientes para la mayoría de los suelos. Después de eliminar la materia orgánica y llevar a sequedad el suelo, pesar 50 g de suelo de textura arcillosa o 100 g de suelo de textura arenosa y ponerlos en un vaso precipitados de 250 mL. Adicionar agua hasta cubrir la superficie con una lamina de 2 cm. Agregar 5 mL de oxalato de sodio y 5 mL de metasilicato de sodio y dejar reposar durante 15 minutos. Si el suelo tiene mucha arcilla puede prolongarse el tiempo hasta media hora.

3. Pasar las muestras de los vasos de precipitado a las copas de agitador mecánico, pasando todo el material con ayuda de la Piceta. Activar los agitadores y proceder a dispersar cinco minutos. Al finalizar el tiempo de agitación, bajar la copa del dispersor y pasar el contenido a una probeta de 1000 mL o al cilindro de Bouyoucos enjuagando la copa con ayuda de una Piceta.
4. Agregar agua destilada hasta completar un litro con el hidrómetro dentro de la suspensión en el caso de la probeta y si utiliza el cilindro de Bouyoucos llevar a marcar inferior (1113 mL) con el hidrómetro dentro de la suspensión. Sacar el hidrómetro y suspender el suelo con un agitador de mano operado durante un minuto.
5. Tomar las lecturas del hidrómetro a los 40 segundos y después de 2 horas de terminada la dispersión con el agitador de mano.
6. Para hacer una lectura, colocar el hidrómetro dentro de la probeta 20 segundos antes del momento de la determinación, cuidando de alterar lo menos posible la suspensión. Después de hacer la lectura se seca el hidrómetro, se lava, se seca y se toma la temperatura. Si por alguna razón al hacer la lectura se acumula espuma alrededor del hidrómetro, agregar unas gotas de alcohol etílico.

**Cálculos:**

Corregir las lecturas del hidrómetro agregando 0.36 por cada grado centígrado arriba de 19.5 °C restando la misma cantidad por cada grado debajo de dicha temperatura (tabla corrección de temperatura). La lectura a los 40 segundos multiplicada por 2 es igual al porcentaje de arcilla mas limo. Restando de 100 se obtienen el porcentaje de arena. La lectura obtenida de 2 horas multiplicada por 2 es igual al porcentaje de arcilla. El porcentaje de limo se obtiene por diferencia. Cuando se usan 100 g no debe multiplicarse por 2 ya que el hidrómetro está calibrado en porcentajes considerando 100 g de suelo. Con los porcentajes de limo, arena y arcilla se determina la textura correspondiente con el triangulo de texturas.

**CUADRO DE CORRECCIÓN POR TEMPERATURA**

TEMP. °C	CORRECCIÓN	TEMP. °C	CORRECCIÓN
15.0	- 1.62	21.5	+ 0.18
15.5	- 1.44	22.0	+ 0.90
16.0	- 1.26	22.5	+ 1.08
16.5	- 1.08	23.0	+ 1.26
17.0	- 0.90	23.5	+ 1.44
17.5	- 0.72	24.0	+ 1.62
18.0	- 0.54	24.5	+ 1.80

**INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

CLAVE	CLASE TEXTURA
R	Arcillosa
RI	Arcillosa limosa
Ra	Arcillosa arenosa
Cr	Franco arcillosa
CrI	Franco arcillo limosa
C	Francosas
CI	Franco limosa
L	Limosa
Ca	Franco arenosa
Ac	Areno francosa
A	Arenos

## 8.7 Anexo B

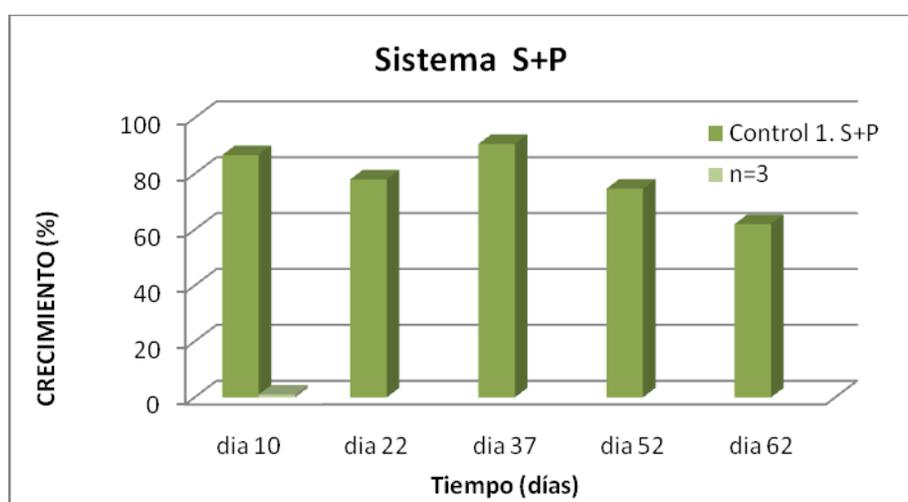
### 8.7.1 Resultados durante el monitoreo.

En este anexo se presentan las tablas de los resultados obtenidos durante el monitoreo experimental, correspondientes a la medición de las características físicas correspondientes a la planta: porcentaje de sobrevivencia, longitud de raíz y tallo.

En todos los sistemas experimentales el promedio de población de semillas es de 25. Con  $n = 3$ ,  $n$  repeticiones.

**Tabla 8.1 Resultados promedio del porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para una  $n$  de 25 semillas y una  $n$  de 3 repeticiones**

	Control 1	control 2	Trat. 1	Trat. 2
	% GER	% GER	% GER	% GER
días	S+P	S+P+B	S+P+D	S+P+D+B
día 10	87	61	69	35
día 22	78	92	79	65
día 37	91	93	69	65
día 52	75	75	71	72
día 62	62	68	61	64



**Figura 8.1 Porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para el Control 1**

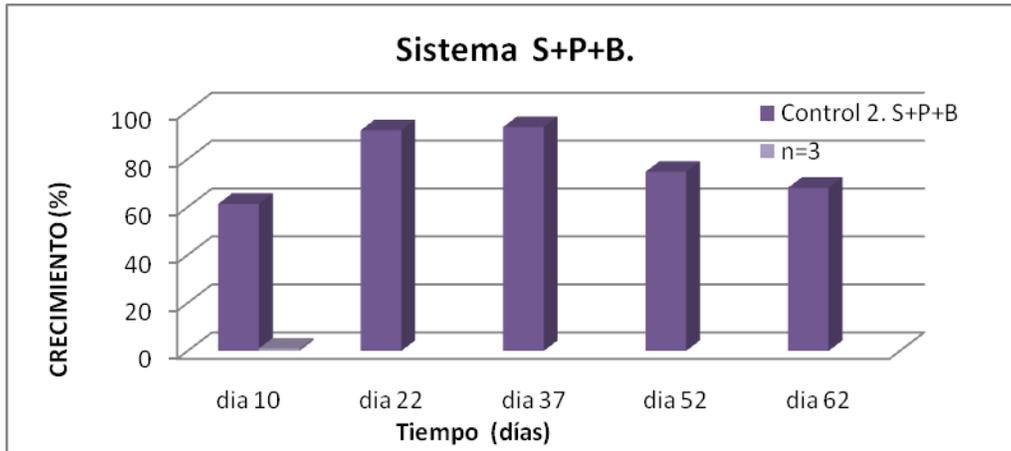


Figura 8.2 Porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para el Control 2

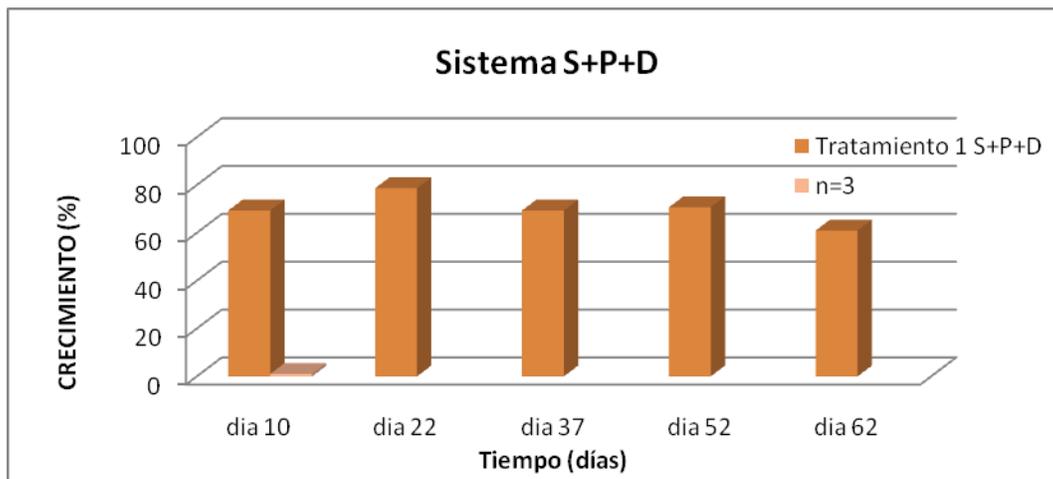


Figura 8.3 Porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para el Tratamiento 1 Fito-remediación convencional

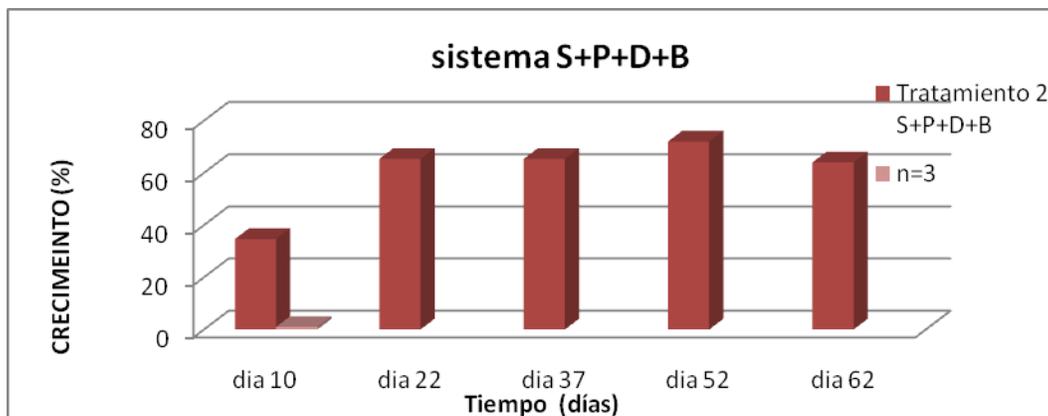
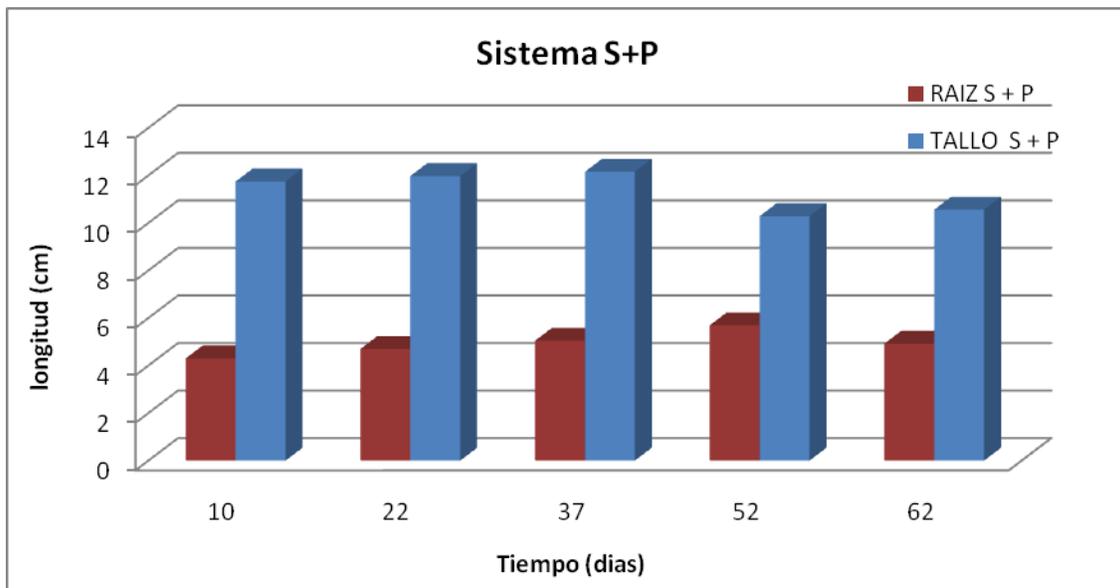


Figura 8.4 Porcentaje de sobrevivencia durante el experimento para el Tratamiento 2 Fito-remediación asistida por AZm1

A continuación se presentan las tablas correspondientes a la medición de Longitud de Tallo-Raíz durante el monitoreo experimental. En todos los sistemas experimentales el promedio de población de semillas es de 25. Con n= 3, repeticiones.

**Tabla 8.2 Resultados promedio de longitud de Raíz y Tallo durante la experimentación para una n de 25 semillas y una n de 3 repeticiones**

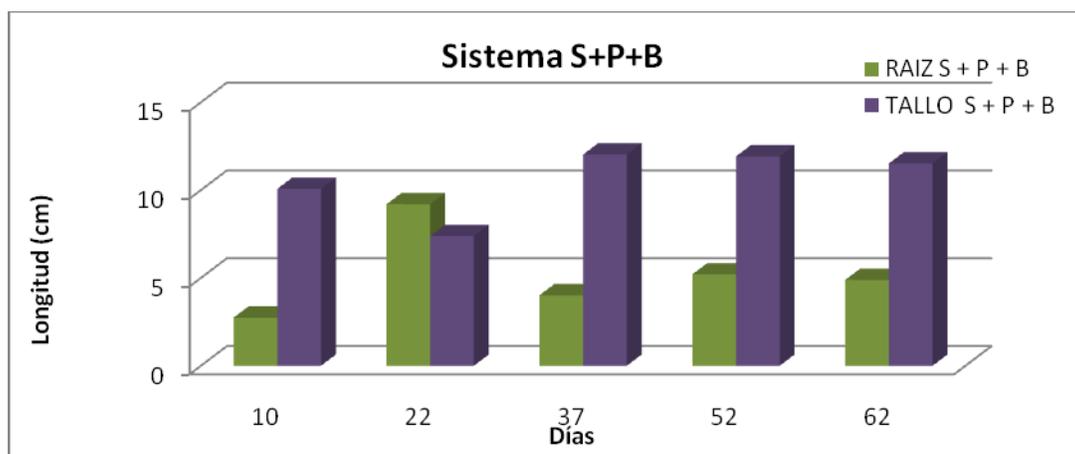
días	Raíz	Tallo
	S+P	S+P
	<b>control 1</b>	
10	4.30	11.75
22	4.70	11.97
37	4.82	11.60
52	4.88	9.32
62	4.92	10.56



**Figura 8.5 Longitud de tallo-raíz durante el experimento para el Control 1**

**Tabla 8.3 Resultados promedio de longitud de Raíz y Tallo durante la experimentación durante el experimento para una n de 25 semillas y una n de 3 repeticiones para el Control 2**

días	Raíz	Tallo
	S+P+B	S+P+B
	<b>control 2</b>	
10	2.61	9.68
22	3.67	11.50
37	3.78	11.30
52	4.85	11.43
62	4.89	11.52



**Figura 8.6 Longitud de tallo-raíz durante el experimento para el Control 2**

**Tabla 8.4 Resultados del promedio de longitud de tallo-raíz durante el experimento para una n de 25 semillas y una n de 3 repeticiones. Tratamiento1**

días	Raíz	Tallo
	S+P+D	S+P+D
	<b>fito-remediación convencional</b>	
10	4.18	11.44
22	4.55	11.58
37	4.77	9.33
52	5.77	13.09
62	5.94	11.25

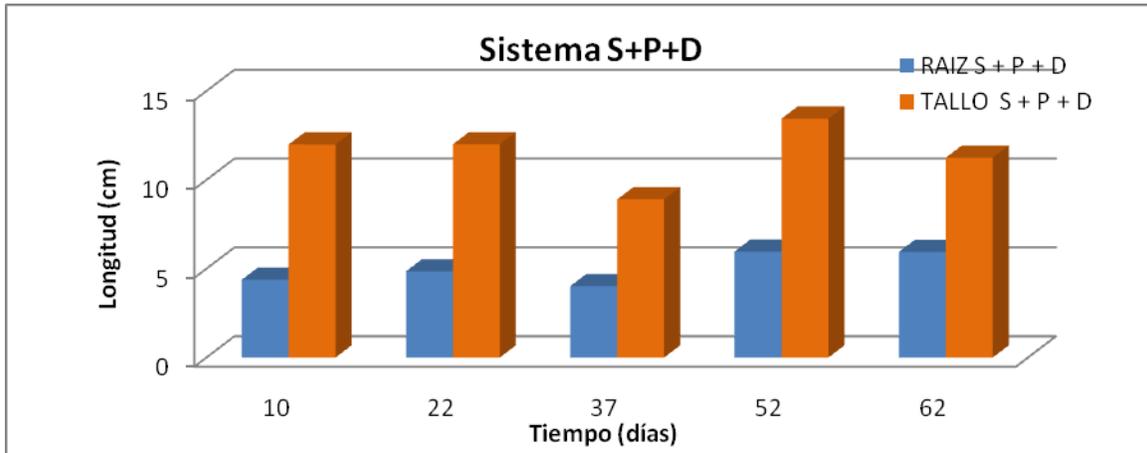


Figura 8.7 Longitud de tallo-raíz durante el experimento para el Tratamiento 1. Fito-remediación convencional

Tabla 8.5 Resultados del promedio de longitud de tallo-raíz durante el experimento para una n de 25 semillas y una n de 3 repeticiones para el Tratamiento 2

días	Raíz	Tallo
	S+P+D+B	S+P+D+B
fito-remediación asistida		
10	2.23	3.73
22	2.79	5.54
37	3.31	10.34
52	5.22	12.08
62	5.34	11.64

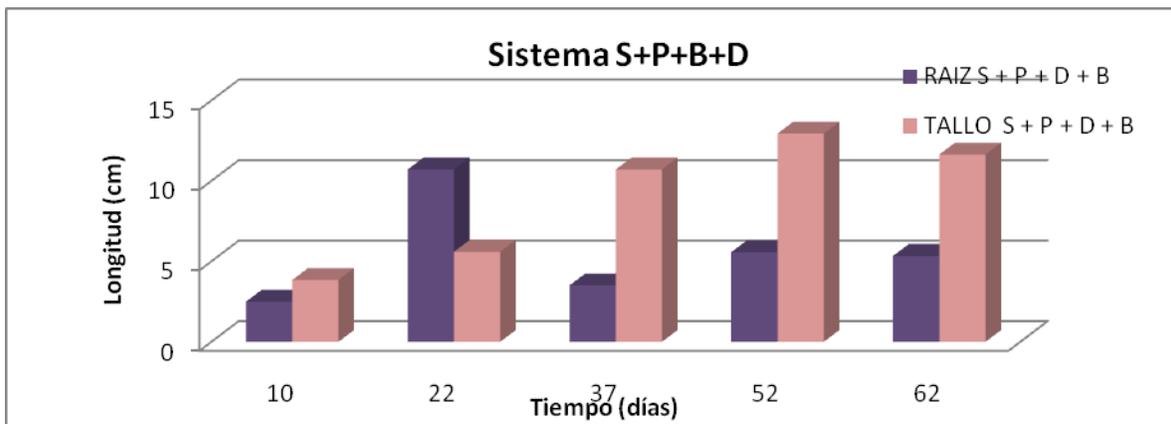


Figura 8.8 Longitud de tallo-raíz durante el experimento para el tratamiento 2. Fito-remediación asistida por AZm1

### 8.7.2 Resultados generales durante el monitoreo experimental

Día	Sistema	pH	(%) Sobreviven- cia	Base seca (g)	Raiz (cm)	Tallo (cm)	Concentra- ción FMH mg/kg	% Remoción
10	S+P+D	8.12	69	0.12	4.18	11.44	10522	0
10	S+P+D+B	8.10	35	0.07	2.23	3.73	10522	0
10	S+D	8.07	.....	.....	.....	.....	10522	0
10	S+P	7.97	87	0.18	4.30	11.75	.....	.....
10	S+P+B	7.88	61	0.11	2.61	9.68	.....	.....
22	S+P+D	8.45	79	0.12	4.55	11.58	10272	2
22	S+P+D+B	8.18	65	0.08	2.79	5.54	9838	7
22	S+D	8.13	.....	.....	.....	.....	7646	27
22	S+P	8.02	78	0.16	4.70	11.97	.....	.....
22	S+P+B	7.95	92	0.13	3.67	11.50	.....	.....
37	S+P+D	8.05	69	0.12	4.77	9.33	6414	39
37	S+P+D+B	8.03	65	0.11	3.31	10.34	6832	35
37	S+D	8.00	.....	.....	.....	.....	5899	44
37	S+P	7.96	91	0.13	4.82	11.60	.....	.....
37	S+P+B	7.87	93	0.10	3.78	11.30	.....	.....
52	S+P+D	7.97	71	0.14	5.77	13.09	5994	43
52	S+P+D+B	8.04	72	0.16	5.22	12.08	3616	66
52	S+D	7.81	.....	.....	.....	.....	5197	51
52	S+P	7.85	75	0.12	4.88	9.32	.....	.....
52	S+P+B	7.76	75	0.09	4.85	11.43	.....	.....
62	S+P+D	7.98	61	0.12	5.94	11.25	1771	83
62	S+P+D+B	8.04	64	0.18	5.34	11.64	1735	84
62	S+D	7.82	.....	.....	.....	.....	4169	60
62	S+P	7.86	62	0.13	4.92	10.56	.....	.....
62	S+P+B	7.74	68	0.11	4.89	11.52	.....	.....

## 8.8 Anexo C

### 8.8.1 DATOS DE CONCENTRACIÓN DE HTP EN SISTEMAS DE TRATAMIENTO.

**Tabla 8.6 Resultados de concentración de HTP fracción diesel durante el monitoreo de los sistemas experimentales. Con una n=3 repeticiones y n=25 semillas**

Concentración de HTP durante el monitoreo experimental (mg/kg)			
Tiempo (días)	Volatilización de diesel en suelo	Fito-remediación convencional	Fito-remediación asistida
	<b>S+D</b>	<b>S+P+D</b>	<b>S+P+D+B</b>
<b>0</b>	10,522	10,522	10,522
<b>10</b>	7,646	10,272	9,838
<b>22</b>	5,899	6,414	6,832
<b>37</b>	5,197	5,994	3,616
<b>52</b>	4,169	1,771	1,735

**Tabla 8.7 Resultados de porcentaje de remoción de HTP fracción diesel durante el monitoreo de los sistemas experimentales. Con una n=3 repeticiones y n=25 semillas**

Remoción de HTP durante el monitoreo experimental (%)			
Tiempo (días)	Volatilización de diesel en suelo	Fito-remediación convencional	Fito-remediación asistida
	<b>S+D</b>	<b>S+P+D</b>	<b>S+P+D+B</b>
<b>0</b>	0	0	0
<b>10</b>	27	2	7
<b>22</b>	44	39	35
<b>37</b>	51	43	66
<b>52</b>	<b>60</b>	<b>83</b>	<b>84</b>

**Tabla 8.8 Resultados de concentración de HTP fracción diesel durante el monitoreo de la especie vegetal. Con una n=3 repeticiones y n=25 semillas por cada sistema**

<b>Concentración de HTP en plantas durante el experimento (mg/kg)</b>		
<b>Dias</b>	<b>Fito-remediación convencional S+P+D</b>	<b>Fito-remediación asistida S+P+D+B</b>
<b>10</b>	<b>787.204</b>	<b>476.308</b>
<b>62</b>	<b>830.915</b>	<b>1071.921</b>

## 8.9 Anexo D

### 8.9.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS PLANTAS.

Para longitud de raíz

Muestra	Frecuencia	Media	Sigma
Raíz S P	5	4.724	0.251157
Raíz S P B	5	3.96	0.948156
Raíz S P B D	5	3.778	1.42396
Raíz S P D	5	5.042	0.773867
	20	4.376	1.02164

#### Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media Cuadrado	F-Ratio
Entre	5.4766	3	1.82553	2.03
Dentro	14.3545	16	0.897155	
Total	19.8311	19		

P-Valor = 0.1495

#### Contraste de Varianza

Contraste C de Cochran: 0.565028  
P-valor = 0.1189

Gráfico de Cajas y Bigotes

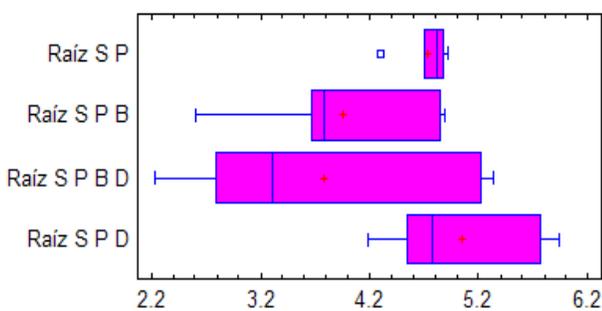


Gráfico de Dispersión

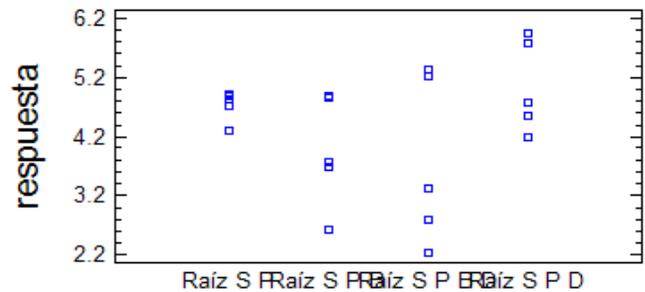


Gráfico de Medias

Con 95.0 Porcentajes Intervalos LSD

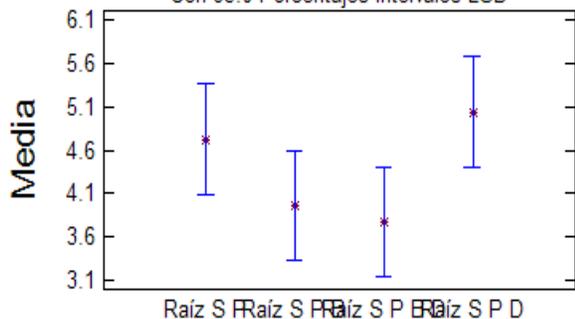
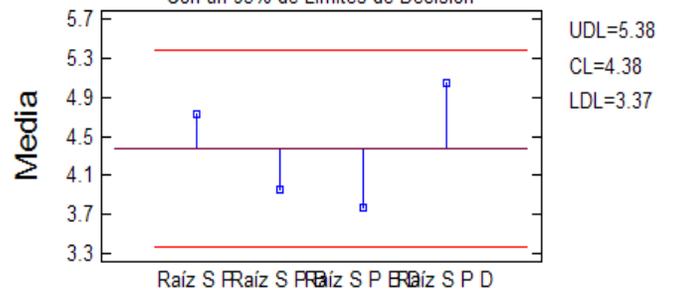


Gráfico de Análisis de Medias

Con un 95% de Límites de Decisión



<b>Resumen Estadístico</b>				
	<b>Raíz S P</b>	<b>Raíz S P B</b>	<b>Raíz S P B D</b>	<b>Raíz S P D</b>
Frecuencia	5	5	5	5
Media	4.724	3.96	3.778	5.042
Varianza	0.06308	0.899	2.02767	0.59887
Desviación típica	0.251157	0.948156	1.42396	0.773867
Mínimo	4.3	2.61	2.23	4.18
Máximo	4.92	4.89	5.34	5.94
Rango	0.62	2.28	3.11	1.76
Asimetría tipi.	-1.5372	-0.437872	0.267827	0.27105
Curtosis típicada	1.29141	-0.329946	-1.28966	-1.1899

Esta tabla muestra resúmenes estadísticos para cada una de las variables seleccionadas. Incluye medidas de tendencia central, de variabilidad y forma. De particular interés están la asimetría estandarizada, las cuales pueden utilizarse para determinar si la muestra procede de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican una desviación significativa de la normalidad, que tendería a invalidar muchos de los procedimientos estadísticos aplicados habitualmente a estos datos.

<b>95.0 Intervalos de confianza</b>				
	<b>Media</b>	<b>Error estándar</b>	<b>Límite Inf.</b>	<b>Límite Sup.</b>
Raíz S P	4.724	0.112321	4.41215	5.03585
Raíz S P B	3.96	0.424028	2.78271	5.13729
Raíz S P B D	3.778	0.636816	2.00991	5.54609
Raíz S P D	5.042	0.346084	4.08111	6.00289
	<b>Sigma</b>	<b>Límite Inf.</b>	<b>Límite Sup.</b>	
Raíz S P	0.251157	0.150477	0.721715	
Raíz S P B	0.948156	0.568072	2.72458	
Raíz S P B D	1.42396	0.853143	4.09184	
Raíz S P D	0.773867	0.463649	2.22375	

Esta tabla muestra el 95.0 % intervalos de confianza para las medias y desviaciones típicas para cada una de las variables. Estos intervalos limitan el error muestral en las estimaciones de los parámetros de las poblaciones de las que proceden los datos. Estos datos pueden usarse para juzgar la precisión con la que se han estimado las medias y desviaciones típicas de la población. Los

intervalos asumen que las poblaciones de las que proceden las muestras pueden representarse por distribuciones normales.

Para longitud de tallo

Muestra	Frecuencia	Media	Sigma
Tallo S P	5	11.04	1.10356
Tallo S P B	5	11.086	0.790683
Tallo S P D	5	11.338	1.33962
Tallo S P D B	5	8.666	3.7894
	20	10.5325	2.24161

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media Cuadrado	F-Ratio
Entre	23.4829	3	7.82762	1.74
Dentro	71.9887	16	4.4993	
Total	95.4716	19		

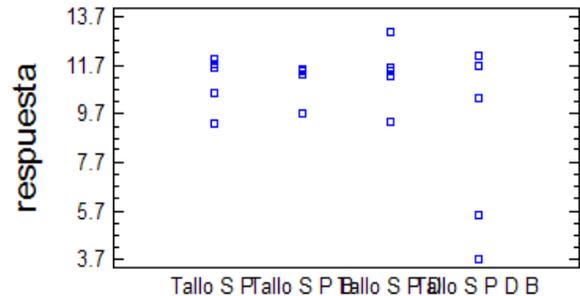
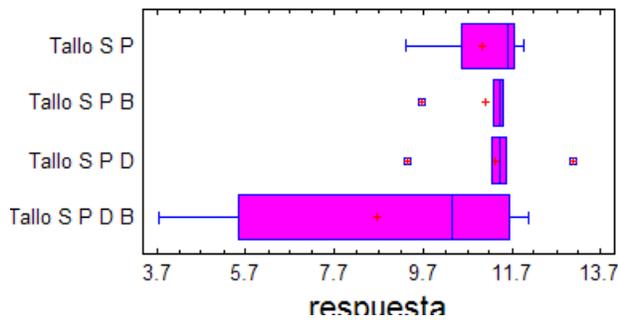
P-Valor = 0.1992

**Contraste de Varianza**

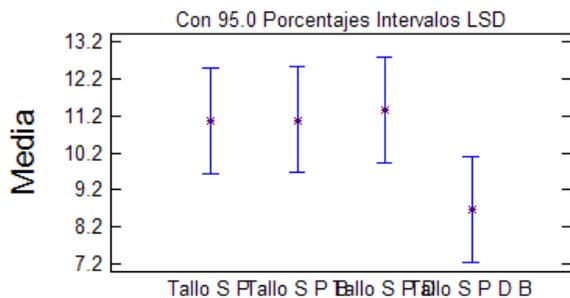
Contraste C de Cochran: 0.797879

P-valor = 0.0016

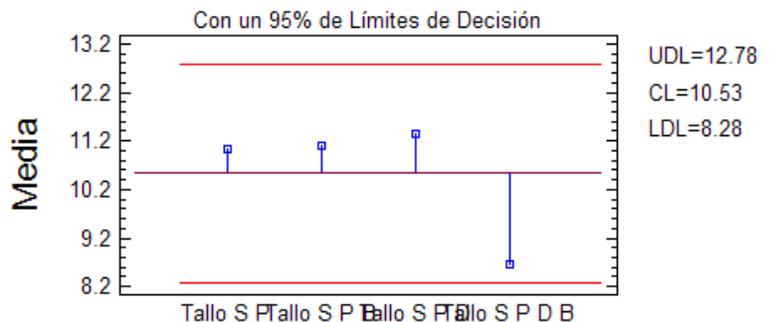
**Gráfico de Cajas y Bigotes**



**Gráfico de Medias**



**Gráfico de Análisis de Medias**



**95.0 Intervalos de confianza**

	Media	Error estándar	Límite Inf.	Límite Sup.
Tallo S P	11.04	0.493528	9.66974	12.4103
Tallo S P B	11.086	0.353604	10.1042	12.0678
Tallo S P D	11.338	0.599094	9.67464	13.0014
Tallo S P D B	8.666	1.69467	3.96082	13.3712

	Sigma	Límite Inf.	Límite Sup.
Tallo S P	1.10356	0.661181	3.17115
Tallo S P B	0.790683	0.473725	2.27207
Tallo S P D	1.33962	0.802608	3.84946
Tallo S P D B	3.7894	2.27036	10.8891

**Resumen Estadístico**

	Tallo S P	Tallo S P B	Tallo S P D	Tallo S P D B
Frecuencia	5	5	5	5
Media	11.04	11.086	11.338	8.666
Varianza	1.21785	0.62518	1.79457	14.3596
Desviación típica	1.10356	0.790683	1.33962	3.7894
Mínimo	9.32	9.68	9.33	3.73
Máximo	11.97	11.52	13.09	12.08
Rango	2.65	1.84	3.76	8.35
Asimetría tipi.	-1.09276	-1.98232	-0.427833	-0.559361
Curtosis típicada	0.159071	2.17123	0.898546	-1.13069

Esta tabla resume los datos estadísticos para cada una de las variables seleccionadas. Incluye medidas de tendencia central, de variabilidad y de forma. De particular interés están la asimetría estandarizada, las cuales pueden utilizarse para determinar si la muestra procede de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de -2 a +2 indican una desviación significativa de la normalidad, que tendería a invalidar muchos de los procedimientos estadísticos aplicados habitualmente a estos datos. En este caso, las siguientes variables muestran valores de asimetría estandarizada fuera del rango esperado: ninguna. Las siguientes variables estandarizadas fuera del rango esperado Tallo S P B.

Esta tabla muestra el 95.0 % intervalos de confianza para las medias y desviaciones típicas para cada una de las variables. Estos intervalos limitan el error muestral en las estimaciones de los parámetros de las poblaciones de las

que proceden los datos. Estos datos pueden usarse para juzgar la precisión con la que se han estimado las medias y desviaciones típicas de la población. Los intervalos asumen que las poblaciones de las que proceden las muestras pueden representarse por distribuciones normales.

Para peso base seca de la planta.

Muestra	Frecuencia	Media	Sigma
Base Seca S P	5	0.144	0.0250998
Base seca S P B	5	0.108	0.0148324
Base seca S P B	5	0.12	0.0484768
Base seca S P D	5	0.124	0.00894427
	20	0.124	0.0294511

**Tabla ANOVA**

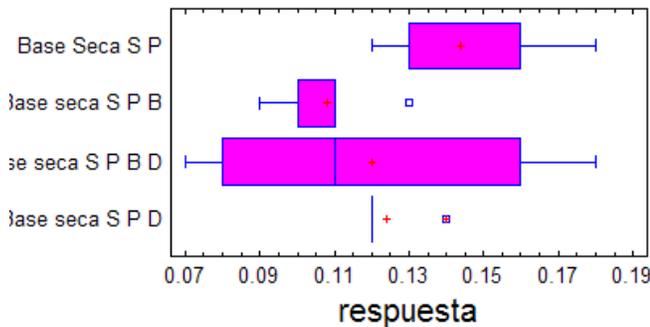
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Media Cuadrado	F-Ratio
Entre	0.00336	3	0.00112	1.37
Dentro	0.01312	16	0.00082	
Total	0.01648	19		

P-Valor = 0.2889

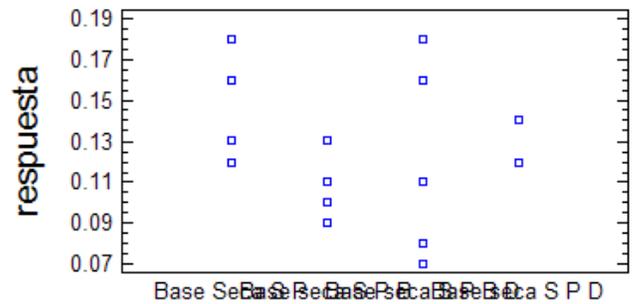
**Contraste de Varianza**

Contraste C de Cochran: 0.716463  
P-valor = 0.0110

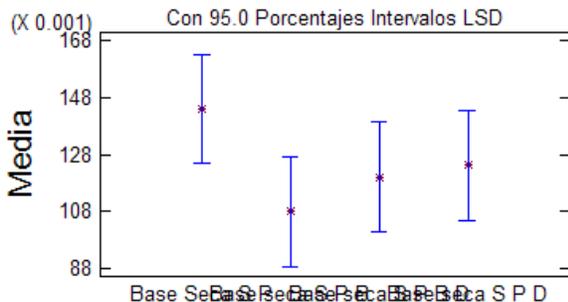
**Gráfico de Cajas y Bigotes**



**Gráfico de Dispersión**



**Gráfico de Medias**



**Gráfico de Análisis de Medias**

