



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

FACULTAD DE INGENIERÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN NUEVO
BIOSURFACTANTE EN EL PROCESO DE REMOCIÓN
DE DIESEL EN SUELO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN INGENIERÍA
(AMBIENTAL)**

P R E S E N T A:

ALMA LUZ CORTÉS LICONA



TUTOR: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

MÉXICO, D. F.

DICIEMBRE, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Rosario Iturbe Argüelles
Secretario: M.I. José Luis Martínez Palacios
Vocal: Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
1er. Suplente: Dr. Thangarasu Pandiyan Sarasvathi
2do. Suplente: M.C. Rolando Salvador Gómez

Lugar o lugares donde se realizó la tesis:

Laboratorio de Microbiología Experimental, Facultad de Química de la
Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.

TUTOR DE TESIS:

DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO

SUSTENTANTE:

BIOL. ALMA LUZ CORTÉS LICONA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco;

Al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) por la beca otorgada que ayudó a la realización y conclusión de mis estudios de maestría

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN107209) por el apoyo económico para la realización del presente trabajo.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado (PAIP 6190-14) por el apoyo económico para la realización del presente trabajo.

Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello por todo su apoyo en la conclusión de esta meta, por toda la paciencia y el tiempo dedicado para la realización de este proyecto.

A mi comité tutorial por sus valiosos comentarios que contribuyeron a la mejora del presente trabajo.

A la Dra. Margarita Eugenia Gutiérrez Ruíz responsable del Laboratorio de Análisis Físicos y Químicos Ambientales (LAFQA) en la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo en realización de la extracción de los hidrocarburos en suelo.

Al Dr. Juan Manuel Arce y a la Dra. Cecilia I. del Centro Nacional de Desastres (CENAPRED) por todo su apoyo en el análisis cromatográfico y por sus valiosos consejos.

A la M.C. Guadalupe Tzuzuki Reyes y Al M.C. Luciano Hernández Gómez técnicos académicos del Laboratorio de Microbiología Experimental, de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo técnico y todas las facilidades para el desarrollo experimental.

Al Sr. Antonio Zarco Reséndiz del taller de vidrio de la Facultad de Química la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo en la elaboración de las columnas.

A la Q.F.B. Elvira Ríos Leal del departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV y al Ing. Cirino Rojas.

Al M.I. Rafael Magaña, gracias por el tiempo invertido en las asesorías de matemáticas para la realización del examen de ingreso.

A mis compañeros y amigos en esta travesía; Gina, Nash, Taka e Hiram por el apoyo en las desveladas, ya fueran por obligación o por diversión, en especial a mis amigos Rubí, Goyis y Angelito por haber sido mi familia en esta enorme ciudad; gracias por todo el tiempo y las vivencias compartidas.

A la M.C. Patricia Castro y la M.I. Holdayara Hernández, gracias por su asesoría técnica pero sobre todo por su apoyo y su amistad.

A mis no menos importantes amigos del Laboratorio de Microbiología: Ale Galiote Ana Ortega, Mónica R. y Mónica M., Manuel S. y Edgar O., Lili F., Lorena P. y a mis compañeros Héctor R., Benjamín S. y Hugo S., gracias por ser la sal y la pimienta de mí día a día.

A mis amigos Lilia Corona, Jesica López y Edgar Doroteo por todo su apoyo y sus consejos.

A los chicos del LAFQA por aceptarme y convertirme en parte de su equipo: Danielo, Alicia, Ines, Milton, Memo, Alfredo, Ivan, Raquel, Agüeda, Katerin y Carlos; Gracias!!

Al M.C. Sergio Aburto Castañeda, por su asesoría en el manejo estadístico de los datos pero sobre todo por compartir su amor y su tiempo conmigo... gracias Serch!!!

Dedicatoria

A mis queridos padres **Ramón Cortés Y Dulce Ma. Licon** por todo el amor y los valiosos consejos que han forjado a la persona que soy hoy en día.

A mis queridos hermanos **Dulce y Ramón** por siempre estar.

A ustedes, mi hermosa familia, que siempre me han brindado su apoyo y sus fuerzas en tiempo de debilidad, les dedico éste trabajo esperando se sientan muy orgullosos.....**Los Amo**

TABLA DE CONTENIDO

RELACIÓN DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS.....	VI
GLOSARIO	VII
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS Y ALCANCES.....	6
2.2 Objetivos particulares.....	6
2.3 Alcances	6
2.4 Hipótesis	7
3. MARCO TEÓRICO.....	9
3.1 Tratamiento para remediación de sitios contaminados por hidrocarburos.....	10
3.2 El diesel.....	12
3.3 Efectos tóxicos del diesel.....	16
3.4 Adsorción de diesel en el suelo.....	19
3.4.1 Isotermas de adsorción.....	19
3.5 Lavado de suelos	21
3.6 Tensoactivos o surfactantes	23
3.7 Aplicación de surfactantes en suelos	25
3.7.1 Biosurfactantes.....	26
3.7.2 Investigaciones hechas con biosurfactantes para la remoción de contaminantes en el suelo.....	31
3.7.3 Procesos de remoción de contaminantes con sustancias tensoactivas	34
3.8 Toxicidad de los surfactantes en suelos post-tratamiento	35
3.9 Biosurf M9b	35
3.10 Situación de la técnica de lavado en México	37
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL	40
4.1 Fase 1: Actividades preliminares.....	40
4.1.1 Conformación del suelo artificial.....	40
4.1.2 Caracterización fisicoquímica del suelo	41
4.1.3 Pruebas para determinar el efecto de adsorción en suelo	43

4.1.4 Contaminación artificial del suelo de estudio	44
4.1.5 Determinación de las dosis de lavado	45
4.1.6 Determinación de la concentración de diesel en suelo en las pruebas de lavado.....	46
4.1.7 Empacado de las columnas experimentales	47
4.1.8 Determinación de la fracción diesel por cromatografía de gases	49
4.2 Fase 2: Lavado del suelo contaminado.....	49
4.3 Fase 3: Biodegradación.....	50
4.3.1 Cultivo de las bacterias degradadoras de hidrocarburos	50
4.3.2 Control de condiciones	51
4.3.3 Inoculación de microorganismos en el suelo proveniente del lavado	52
4.3.4 Monitoreo de la fase de biodegradación.....	52
4.3.5 Determinación del porcentaje de remoción de diesel	53
4.4 Identificación de efectos tóxicos en plantas.....	54
4.5 Diseño experimental	55
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
5.1 Conformación del suelo artificial	61
5.2 Caracterización fisicoquímica del suelo.....	61
5.3 Isotermas de adsorción	63
5.4 Determinación de dosis de lavado	67
5.5 Contaminación artificial del suelo de estudio.....	69
5.6 Empacado de las columnas experimentales.....	70
5.7 Fase 2: Lavado.....	71
5.7.1 Concentración de diesel después del lavado	71
5.8 Fase 3: Biodegradación.....	74
5.8.1 Cultivo de las bacterias degradadoras de hidrocarburos	74
5.8.2 Determinación de nutrientes posterior a la fase de lavado.....	75
5.8.3 Inoculación de las columnas experimentales.....	75
5.8.4 Monitoreo del proceso de biorremediación.....	76
5.8.5 Respirimetría.....	78
5.8.6 Remoción de hidrocarburos en la fase de biorremediación.....	79
5.9 Identificación de efectos tóxicos en plantas.....	82

6. CONCLUSIONES.....	87
6.1 Recomendaciones	88
7. BIBLIOGRAFÍA.....	90
ANEXO I Valores de tablas.....	99
ANEXO II Cromatogramas y curva de calibración para determinar la concentración de diesel.....	102
ANEXO III Materiales utilizados para la Conformación y enriquecimiento del suelo	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos existentes para la remediación de suelos	13
Tabla 2. Características del diesel	14
Tabla 3. Compuestos químicos identificados en el diesel menores al 10%	15
Tabla 4. Movilidad de los compuestos químicos del diesel.....	16
Tabla 5. Efectos tóxicos de algunos componentes del diesel.....	18
Tabla 6. Biosurfactantes producidos por microorganismos.	28
Tabla 7. Composición del suelo artificial	41
Tabla 8. Parámetros a determinar en la caracterización del suelo.....	41
Tabla 9. Concentraciones utilizadas para las isothermas de adsorción del diesel	44
Tabla 10. Tratamientos utilizados en las pruebas preliminares de lavado	45
Tabla 11. Especificaciones del dispositivo de compactación.....	47
Tabla 12. Tratamientos de la fase de lavado por inundación	49
Tabla 13. Medio Bushnell-Haas.....	50
Tabla 14. Escala de McFarland, preparación e interpretación	51
Tabla 15. Tratamiento para las pruebas de fito-toxicidad.....	55
Tabla 16. Datos típicos para un experimento de factor simple	56
Tabla 17. Tabla del análisis de ANOVA	57
Tabla 18. Tratamiento de la fase de biodegradación por bioaumento.....	58
Tabla 19. Parámetros fisicoquímicos medidos en el suelo	62
Tabla 20. Resultados de adsorción de diesel en suelo de estudio.....	64
Tabla 21. Valores para graficar la isoterma de Freudlich	65
Tabla 22. Valores para graficar la isoterma de Langmuir	66
Tabla 23. Concentraciones de diesel al inicio de los tratamientos	70
Tabla 24. Especificaciones resultantes del sistema de empaque de las columnas	70
Tabla 25. Diferencias estadísticas entre los tratamientos de la fase de lavado	72
Tabla 26. Cinética de remoción de los diferentes tratamientos de lavado.....	72
Tabla 27. Estimación para la remoción del 50% de hidrocarburos fracción diesel	73

Tabla 28. Capacidad de remoción de los tensoactivos.....	74
Tabla 29. Determinación de nutrientes para la fase de bioaumento	75
Tabla 30. Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo	77
Tabla 31. Porcentajes de remoción de la fase de biodegradación	80
Tabla 32. Diferencias estadísticas entre los tratamientos de la fase biorremediación	81
Tabla 33. Índice de inhibición en la elongación de la raíz (IER)	84
Tabla 34. Diferencias estadísticas entre los tratamientos de toxicidad	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de lavado de suelo “ <i>in situ</i> ”	22
Figura 2. Acción del detergente	29
Figura 3. Tecnologías de remediación de suelos utilizadas en México	38
Figura 4. Esquema de trabajo	40
Figura 5. Esquema de trabajo para realizar las isothermas de adsorción	43
Figura 6. Equipo de extracción Soxhlet.....	46
Figura 7. Dispositivo de compactación de suelo	48
Figura 8. Patrón de la compactación del suelo en las columnas experimentales	48
Figura 9. Plántula de lechuga	54
Figura 10. Tratamientos a comparar en la fase de lavado	58
Figura 11. Tratamientos de fito-toxicidad a comparar	59
Figura 12. Conformación del suelo artificial	61
Figura 13. Granulometría del suelo conformado artificialmente	63
Figura 14. Isotherma lineal de diesel adsorbido en el suelo de estudio	64
Figura 15. Isotherma de Freundlich de la adsorción de diesel en el suelo de estudio	65
Figura 16. Isotherma de Langmuir de la adsorción de diesel en el suelo de estudio	66
Figura 17. Concentraciones resultantes de diesel en la pruebas de lavado.....	68
Figura 18. Porcentaje de remoción de las diferentes dosis empleadas	69
Figura 19. Columnas experimentales empacadas con el suelo contaminado	70
Figura 20. Concentraciones resultantes de la fase de lavado.....	71
Figura 21. Curva de crecimiento del consorcio de bacterias degradadoras de diesel	74
Figura 22. Cultivo de bacterias hidrocarbonoclastas	76
Figura 23. Cuenta en placa de microorganismos hidrocarbonoclastas.....	76
Figura 24. Cuenta en placa de UFC en los procesos de biodegradación	77
Figura 25. Producción de CO ₂ por el metabolismo bacteriano.....	79
Figura 26. Diesel resultante de los tratamientos de biorremediación.....	80
Figura 27. Índices de germinación por tratamiento	82

Figura 28. Plántulas provenientes del suelo control ylavado con surfactantes 83

ÍNDICE DE ECUACIONES

$C_s = K_d C_w 1/n$Ec. 1	20
$\log C_s = \log K_d + 1/n \log C_w$Ec. 2	20
$K_d = C_s C_w$ Ec. 3	21
Remoción (%)= $C_i - C_w C_i \times 100$Ec. 4	47
No. de Bacterias/g = $N_x fV$Ec. 5	53
$IG = G_s x L_s 1(G_c x L_c)$Ec. 6	54
% ILR = $1 - 1G_x 100$Ec. 7	54
$SS_{Tratamientos} = (1n_i = 1a1n Y_i 2) - Y_2 N$Ec. 8	56
$SS_{Total} =$ Ec. 9	57
$SS_E = SS_{Total} - SS_{Tratamientos}$Ec. 10	57
$C_s = (C_0 - C_e)$ Ec. 11	63
$C_s = K_d \cdot C_e^N$Ec. 12	64
$\log C_s = \log K_d + N \log C_e$Ec. 13	65
$C_s = qmbCe1 + bCe$Ec. 14	66
$1C_s = 1qmb1Ce + 1qm$Ec. 15	66
$Y = mx + b$Ec. 16	67
$Y_f = Y_i e^{(kt)}$Ec.17	72
$T = (Ln Y_i Y_f)k$Ec. 18	73
Capacidad de remoción = g de hidrocarburo removidos /g de surfactante utilizado...Ec. 19	73
UFC/ g de suelo = (mL medio inoculado) x (UFC por mL)Ec. 20	76

RELACIÓN DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

Control IN	Control inoculado
Control SIN	Control sin inocular
Ctrl (+)	Control positivo para los ensayos de germinación
Ctrl IN	Control inoculado para los ensayos de germinación
Ctrl Ini	Control inicial para los ensayos de germinación
Ctrl Int	Control intermedio
Ctrl SIN	Control sin inocular
Biosurf M9b	Surfactante producido por <i>Pseudomonas koreensis</i>
Biosurf IN	Tratamiento de lavado con Biosurf M9b inoculado con bacterias
Biosurf SIN	Tratamiento de lavado con Biosurf M9b sin inocular
CMC	Concentración micelar crítica
IG	Índice de germinación
IER	Índice de inhibición de la elongación de la raíz
Kd	Constante de adsorción de Freundlich o coeficiente de distribución
SLBio	Suelo lavado con Biosurf M9b
SLTw	Suelo lavado con Tween 80
Tw 80	Surfactante químico Tween 80
Tw 80 IN	Tratamiento de lavado con Tween 80 inoculado con bacterias
Tw 80 SIN	Tratamiento de lavado con Tween 80 sin inocular
UFC	Unidades formadoras de colonias

GLOSARIO

Agente tensoactivos o surfactantes. Son sustancias que influyen por medio de la disminución de la tensión superficial el contacto entre dos fases (ej., dos líquidos insolubles uno en otro). Cuando se utilizan en la tecnología doméstica se denominan como emulgentes o emulsionantes; esto es, sustancias que permiten conseguir o mantener una emulsión.

Benceno. Hidrocarburo aromático de fórmula molecular C_6H_6 . En el benceno cada átomo de carbono ocupa el vértice de un hexágono regular, aparentemente tres de las cuatro valencias de los átomos de carbono se utilizan para unir átomos de carbono contiguos entre sí, y la cuarta valencia con un átomo de hidrógeno.

Benzo[a]pireno. Hidrocarburo Policíclico Aromático (PAH, por sus siglas en Inglés) de cinco anillos, cuya Formula global es $C_{20}H_{12}$, que se produce por Combustión incompleta a Temperaturas entre 300 y 600 °C. Este compuesto es altamente tóxico, principalmente debido a su elevada mutagenicidad y carcinogenicidad y fue asociado al cáncer por primera vez en el Siglo XVIII en Inglaterra, donde se demostró que los deshollinadores de chimeneas presentaban una mayor incidencia de cáncer de Escroto.

Biocidas. Sustancias químicas sintéticas o de origen natural o microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo.

Biosurfactante M9b. Sustancia tensoactiva de origen orgánico producida por la bacteria *Pseudomonas koreensis*.

Carbono Ramsbottom. Es un método para calcular el residuo de carbono de un combustible. El valor del residuo de carbono es considerado por algunos para dar una indicación aproximada de la combustibilidad y el depósito de la formación de las tendencias de los combustibles.

Centistokes. Unidad de viscosidad cinemática, una centésima de Stokes.

Compuestos anfifílicos. También llamados anfipáticas, son aquellos compuestos que poseen moléculas que tienen un extremo hidrofílico o sea que es soluble en agua y otro hidrófobo o sea que rechaza el agua. Así, por ejemplo, cualquier tipo de aceite es hidrófobo porque no puede incorporarse al agua. Comúnmente estas dos partes tenderían a separarse si se agrega a una mezcla de dos sustancias, una hidrofóbica y una

hidrofílica, lo que no puede cumplirse debido a que se encuentran unidas por un enlace químico.

Compuestos poliaromáticos. También llamados hidrocarburos aromáticos polinucleares, son los compuestos que se componen de un polímero cíclico conjugado que cumple la regla de Hückel, es decir, que tienen un total de $4n+2$ electrones π en el anillo. Para que se dé la aromaticidad, deben cumplirse ciertas premisas, por ejemplo que los dobles enlaces resonantes de la molécula estén conjugados y que se den al menos dos formas resonantes equivalentes. El máximo exponente de la familia de los hidrocarburos aromáticos es el benceno (C_6H_6).

Cresoles. Grupo de compuestos químicos que característicamente huelen a medicamentos. Hay tres formas de cresoles de estructura química muy parecida entre sí: el orto-cresol (o-cresol), el meta-cresol (m-cresol) y el para-cresol (p-cresol), donde un anillo bencénico posee un radical metil y un radical hidroxilo colocados en las respectivas posiciones (1,2 - 1,3 - 1,4). Los cresoles se utilizan para disolver otros productos químicos, como desinfectantes y desodorantes y en la manufactura de plaguicidas.

Criseno. Compuesto de alto peso molecular 5 HTP y un anillo. Debido a que se forma cuando la gasolina, basura o cualquier quema de material animal vegetal por lo general se encuentran en humo y el hollín. De todas las emisiones estimadas ambiental de criseno, el 93% son al aire. De otros 7% aproximadamente igual cantidades de criseno se libera en el agua y la tierra.

Diesel. Combustible empleado en máquinas de combustión interna. La NOM-SEMARNAT/SS-138 lo define como un hidrocarburo de fracción media, con cadenas de 10 a 28 carbonos.

Energía interfacial. Se entiende como el exceso de Energía libre de Gibbs que aparece como consecuencia de la existencia de la superficie que define la frontera entre dos fases diferentes. Por ejemplo: un sólido insoluble y un líquido, dos líquidos inmiscibles

Eutrofización. Enriquecimiento de las aguas con nutrientes a un ritmo tal que no puede ser compensado por su eliminación definitiva por mineralización, de manera que el exceso de materia orgánica producida hace disminuir enormemente el oxígeno en las aguas profundas.

Fenantreno. Es un hidrocarburo policíclico aromático compuesto de tres anillos bencénicos fusionados. Su fórmula empírica es $C_{14}H_{10}$. El nombre fenantreno es una composición de fenil y antraceno. Provee el marco aromático de los esteroides. En su

forma pura, es encontrado en el humo del cigarrillo, y es un conocido irritante, fotosensibilizando la piel a la luz.

Fenol es un alcohol sólido en forma pura, el grupo funcional del fenol es Ar-OH. También es conocido como ácido fénico o ácido carbólico. Puede sintetizarse mediante la oxidación parcial del benceno.

Fitotoxicidad. Efecto negativo o tóxico de algún producto químico para las plantas.

Fluoranteno. Es un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) con fórmula molecular C16H10. Su nombre deriva de la fluorescencia que presenta a la luz UV. Al igual que los otros HAP, se produce durante la combustión de ciertos productos orgánicos. Es altamente carcinogénico.

Heteroátomos. Es cualquier átomo salvo el carbono (C) y el hidrógeno (H).

Heteropolisacáridos. Son polímeros que presentan dos o más monosacáridos distintos.

Hidrocarburos alifáticos -alcanos, alquenos, alquinos y sus análogos cíclicos. Se reaccionan principalmente por adición y sustitución por radicales libres: la primera ocurre en los enlaces múltiples; la segunda, en otros puntos de la cadena alifática.

Hidrocarburos fracción media. Hidrocarburos cuyas moléculas contengan cadenas lineales de 10 a 28 átomos de carbono.

Índice cetano. Guarda relación con el tiempo que transcurre entre la inyección del carburante y el comienzo de su combustión, denominado “intervalo de encendido”. Una combustión de calidad ocurre cuando se produce una ignición rápida seguida de un quemado total y uniforme del carburante, cuanto más elevado es el número de cetano, menor es el retraso de la ignición y mejor es la calidad de combustión.

Interacción alopática. El efecto de que un organismo produzca sustancias químicas tóxicas que pueden eliminar a sus competidores.

Lipopéptidos. Es una molécula formada por la unión de un lípido más un péptido

Microorganismos hidrocarbonoclastas. Son aquellas bacterias capaces de crecer en presencia de hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.

Naftaleno. Compuesto orgánico volátil (con fórmula C10H8) que está presente de forma natural en combustibles fósiles como el petróleo y el carbón, el cual que se produce al quemar madera o tabaco. El naftaleno se utiliza en la producción de muchos productos,

como tintes, productos farmacéuticos, y repelentes de insectos, tales como las bolas antipolillas. Actualmente, se producen muchas emisiones de naftaleno al medio ambiente.

Potencial hídrico del suelo. Estado energético del agua en el suelo que permite saber si el agua está en equilibrio o en movimiento. La energía potencial del agua va a depender de la atracción de la fase sólida (partículas de suelo), contenido de sales y temperatura. El potencial hídrico es la suma de los potenciales parciales; la fuerza de gravedad, la fuerza de adsorción, la capilaridad y la presión.

Quinolina. Producto de degradación de los alcaloides de la quina con núcleo piridínico.

Suelo. Parte no consolidada y superficial de la corteza terrestre, biológicamente activa, que tiende a desarrollarse en la superficie de las rocas emergidas por la influencia de la intemperie y de los seres vivos (meteorización). Los suelos son sistemas complejos donde ocurren una vasta gama de procesos químicos, físicos y biológicos que se ven reflejados en la gran variedad de suelos existentes en la tierra.

Tolueno. El tolueno es un hidrocarburo aromático derivado del benceno líquido, incoloro, volátil e insoluble en agua, que se extrae del alquitrán de hulla. Se adiciona a los combustibles (como antidetonante) y como solvente para pinturas, revestimientos, caucho, resinas, diluyente en lacas nitrocelulósicas y en adhesivos.

Trifenileno. Hidrocarburo simple que consta de tres anillos bencénicos unidos por enlaces simples.

Tween 80. Polisorbato 80 N.F., Monooleato de Sorbitán Polioxietilénico 80. El Tween 80 es un surfactante hidrofílico. Se utiliza para la emulsificación de aceite en agua, y en la dispersión o solubilización de aceites.

Xileno. Conocido también como xilol o dimetilbenceno, $C_6H_4(CH_3)_2$ es el que se obtiene a partir del Benceno. Según la posición relativa de los grupos metilo en el anillo bencénico, se diferencia entre orto-, meta-, o para- xileno (o con sus nombres sistemáticos 1,2-; 1,3-; y 1,4-dimetilbenceno). Se trata de líquidos incoloros e inflamables con un característico olor parecido al tolueno.

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación evaluó el efecto de un nuevo biosurfactante producido por *Pseudomonas koreensis*, denominado Biosurf M9b en el proceso de remoción de diesel en suelo así como en la determinación de los efectos fitotóxicos post-tratamiento que pudiese tener. El Biosurf M9b fue comparado con un surfactante sintético comercial, el Tween 80 (Tw 80) utilizado con buenos resultados en este tipo de tratamientos. Se estudió el efecto de los tensoactivos por medio de la técnica de lavado de suelos por inundación, seguido de un proceso de biorremediación por bioaumento, para finalmente realizar ensayos de fitotoxicidad posteriores a cada tratamiento. La dosis a emplear en el lavado, para cada uno de los surfactantes, fue determinada en las pruebas preliminares de lavado, obteniendo que para el Tw 80 la mejor dosis encontrada fue de 64 mg/L, dosis que es igual a su concentración micelar crítica (CMC) removiendo el 64.97% del hidrocarburo presente inicialmente. Para el tratamiento con Biosurf M9b la mejor dosis encontrada fue 5 mg/L equivalente al 0.5% de su CMC, la cual removió el 63.62%. Los resultados obtenidos en las pruebas preliminares de lavado muestran que la remoción de hidrocarburos en el caso del Biosurf M9b se llevó a cabo por el proceso de movilización y en el caso del Tw 80 el fenómeno de eliminación del diesel se llevó a cabo por el proceso de micelación. En el lavado en las columnas experimentales se observó el mismo comportamiento que en las pruebas de lavado, en donde el Tw 80 presento el mayor porcentaje de remoción de diesel, 23.88% más que el Biosurf M9b, pero la diferencia no resulto estadísticamente significativa. En la evaluación de la capacidad de remoción del diesel con respecto al surfactante utilizado, se demostró que el Biosurf M9b presento una mayor capacidad de remoción que el Tween 80 ya que removió 210 gramos más de diesel por gramo de surfactante empleado. Aunque el Tw 80 resulta más rápido en cuanto a tiempo ya que con la cinéticas de remoción se pudo predecir que el diesel se puede remover en un periodo de tiempo menor utilizando el Tween 80. En cuanto a la bioestimulación (proceso de biodegradación), se observó una mejora en el desarrollo y la actividad metabólica en los suelos provenientes del lavado con los surfactantes utilizados que en los del suelo lavado que solo fue estimulado, aunque no existieron diferencias estadísticamente significativas, ni en cuanto las eficiencias de remoción, entre los tratamientos del Biosurf M9b y los del Tw 80. Los ensayos de fitotoxicidad del suelo lavado no mostraron que exista un efecto negativo en cuanto a la elongación de la raíz y no existieron diferencias significativas éntrelos tratamientos del suelo lavado con Tw 80 y el Biosurf M9b.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

En México, actualmente no existe un inventario donde se contabilice a los sitios contaminados ni se reconozcan las fuentes de contaminación, pero es bien sabido que la industria petrolera ha contribuido a esta problemática. El suelo se ha contaminado con productos derivados del petróleo debido a accidentes tales como: derrames, lixiviación o actividades extractivas (Khan *et al.*, 2004). En el Proyecto del Programa Nacional para Evaluación y Remediación de Sitios Contaminados (SEMARNAT, 2008), se menciona que en el periodo transcurrido entre 2003-2006 ocurrieron 755 emergencias relacionadas a derrames de hidrocarburos, dicho análisis señala que los contaminantes más involucrados, en orden de magnitud, fueron: gasolina Magna y Premium, diesel, hidrocarburos, petróleo crudo, combustóleo, aceites y turbosina.

El suelo y el subsuelo constituyen un recurso natural difícilmente renovable que desempeña varias funciones entre las que destaca su papel como medio filtrante durante la recarga del manto acuífero y la protección de los mismos; También están integrados al escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos y las redes tróficas, además de ser el espacio donde se realizan las actividades agrícolas, ganaderas y el soporte de la vegetación (Saval, 1995). Durante varios años se han explorado distintas técnicas fisicoquímicas y biológicas para el tratamiento de la contaminación de suelos por hidrocarburos. El lavado de suelos es considerado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (*United States Environmental Protection Agency*, 2002 por sus siglas en inglés) como un método innovador, que puede ser rápido y económicamente factible en comparación con otras tecnologías. La técnica del lavado de suelo es un método fisicoquímico que consiste fundamentalmente en transferir los contaminantes de la matriz sólida del suelo a una fase líquida, ayudada muchas veces por la adición de surfactantes. Los surfactantes son sustancias que disminuyen la tensión superficial facilitando la solubilidad de los contaminantes en el agua (Castillo, 2008).

La técnica de lavado de suelo puede llevarse a cabo de dos formas: El lavado "*in situ*", que consiste básicamente en aplicar un flujo con soluciones surfactantes o agua a través de pozos de inyección o mecanismos de irrigación sin extraer el suelo de su lugar, y el lavado, de suelo *ex situ*, el cual consiste en un proceso de extracción y separación del suelo, que además de la solución surfactante utiliza un medio mecánico para el lavado (Volke y Velasco, 2002). Los surfactantes químicos utilizados en la mayoría de los tratamientos de sitios contaminados por hidrocarburos son sintetizados químicamente, por lo que muchas veces resultan difíciles de degradar una vez que se encuentran libres en el ambiente,

causando problemas de contaminación tanto en aguas superficiales como subterráneas (Lai *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2003). El uso de biosurfactantes para el lavado de suelos se ha desarrollado como una importante opción para la remediación de suelos contaminados, no sólo por hidrocarburos sino por otros contaminantes como biocidas, compuestos clorados y metales pesados, entre otros (Torres *et al.*, 2007), por considerarse de fácil biodegradación y, por lo tanto, menos tóxicos para el ambiente. Por su estabilidad a temperaturas elevadas, cambios de pH y concentración de sales, además de que el costo efectivo de producción puede ser menor que el de los surfactantes sintéticos (Lima *et al.*, 2010; Frank *et al.*, 2010).

Dado este contexto, en este trabajo se probó la eficiencia de un nuevo biosurfactante, producido por una cepa mexicana de *Pseudomonas koreensis* en la remoción de diesel en suelo así como su efecto fitotóxico.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS, ALCANCES, E HIPÓTESIS

2. OBJETIVOS Y ALCANCES

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de un nuevo biosurfactante producido por *Pseudomonas koreensis* en el proceso de remoción de diesel en suelo.

2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Evaluar el desempeño en el proceso de remoción de diesel logrado por el biosurfactante producido por *Pseudomonas koreensis* cepa M9b (Biosurf M9b) y compararlo con el del surfactante Tween 80 (Tw 80) empleando la técnica de lavado de suelos por inundación.
- b) Determinar el efecto fitotóxico del suelo lavado con Biosurf M9b y Tw 80, mediante ensayos de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).
- c) Evaluar la remoción de diesel en suelo por la técnica de bioaumento en el suelo proveniente del tratamiento de lavado con surfactantes.
- d) Determinar el efecto fitotóxico del suelo tratado por bioaumento mediante ensayos de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).
- e) Determinar la secuencia de tratamiento con mayor remoción de diesel y una menor fito-toxicidad.

2.3 ALCANCES

- 1. Determinar la dosis adecuada de Biosurf M9b y Tween 80 a emplear en el lavado del suelo contaminado con diesel en ensayos por lote.
- 2. Determinar la concentración de diesel resultante para cada uno de los tratamientos, midiendo hidrocarburos fracción diesel por cromatografía de gases.
- 3. Aplicar la técnica de bioaumento al suelo proveniente de los tratamientos de lavado adicionando un inóculo de bacterias degradadoras de diesel.
- 4. Realizar las pruebas de fitotoxicidad empleando un lote de semillas certificadas de lechuga (*Lactuca sativa*) que presente un porcentaje de germinación del 90%.

2.4 Hipótesis

La adición de Biosurf M9b facilitará la remoción del diesel contenido en un suelo, cuando se aplique en la técnica de lavado de suelo “*in situ*” sin generar subproductos que incrementen los efectos fitotóxicos en el suelo tratado.

CAPÍTULO 3

MARCO TEÓRICO

3. MARCO TEÓRICO

La intensa actividad desarrollada por la industria petrolera y sus derivados genera grandes impactos al ambiente. La mayor parte de estos derivados se utilizan como combustible en forma de gasolina, diesel y turbosina, entre otros, junto con algunas fracciones volátiles (metano, propano y butano) que son la principal fuente de energía, tanto industrial como doméstica (Valderrama y Téllez-Sosa; 2000). La infraestructura petrolera, se encuentra integrada por; pozos de extracción, baterías de separación, complejos procesadores de gas, centrales de almacenamiento y bombeo, red de ductos y presas para el confinamiento de desechos sólidos y líquidos procedentes de la perforación y mantenimiento de los pozos. Dichas instalaciones poseen riesgos inherentes de fugas de los diversos productos manejados (petróleo, diesel y gasolina) ya sea por rupturas en los ductos, filtración de aguas aceitosas desde las presas y por derrames del agua aceitosa provocadas por inundaciones durante el periodo de lluvias.

Los hidrocarburos son compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno, de gran abundancia en la naturaleza, presentes principalmente en el petróleo. Se considera como una mezcla líquida compleja de gases, líquidos y sólidos, existiendo pequeñas cantidades de mezclas de nitrógeno, oxígeno y azufre, además de contener compuestos de hierro, níquel, vanadio y otros metales (Jiménez, 2001). Las descargas de estos hidrocarburos de forma directa al suelo crean condiciones desfavorables para el crecimiento microbiológico y de la vegetación, limitando la disponibilidad de nutrimentos y de oxígeno. La infiltración de los hidrocarburos al suelo puede prevenir la volatilización de los mismos evitando su transferencia a la atmósfera; por lo tanto, este proceso puede incrementar la toxicidad en el suelo. La actividad microbiana, temporalmente afectada participa en la eliminación de de estos compuestos, aunque se ha mostrado que los hidrocarburos de alto peso molecular tienden a ser menos susceptibles a la degradación; por lo que, entre más compleja sea la estructura del hidrocarburo mayor será su persistencia en el ecosistema.

Munguía y Martínez, en SEMARNAP (1996), concluyeron que las propiedades físicas del suelo más afectadas por derrames de hidrocarburos son las siguientes:

- 1) La estructura del suelo, debido a la ruptura de los agregados,
- 2) El aumento de la retención del agua en la capa superficial y
- 3) El potencial hídrico.

Probablemente el componente más importante del suelo con relación a la persistencia de los contaminantes orgánicos como los hidrocarburos, es la arcilla. Cuantas más pequeñas son las partículas del suelo la persistencia aumenta, debido a que aportan una gran área superficial para la absorción de los productos químicos.

Las propiedades químicas del suelo más afectadas por un derrame de hidrocarburos son:

- 1) Aumento del carbono orgánico, ya que el 75 % del carbono del petróleo crudo es oxidable,
- 2) Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos,
- 3) Aumento del manganeso y hierro intercambiable y
- 4) Aumento del fósforo disponible.

Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el ambiente dependen de:

- 1) La cantidad y composición del petróleo,
- 2) La frecuencia y tiempo de exposición,
- 3) El estado físico del derrame,
- 4) Las características del sitio donde sucedió el derrame,
- 5) Las variables ambientales como temperatura, humedad y oxígeno,
- 6) El uso de dispersantes químicos (cuyo uso está restringido ya que afectan a los organismos acuáticos) y
- 7) La sensibilidad de la biota del ecosistema impactado.

3.1 TRATAMIENTO PARA REMEDIACIÓN DE SITIOS CONTAMINADOS POR HIDROCARBUROS

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras con base en los siguientes principios: (I) estrategia de remediación; (II) lugar en que se realiza el proceso de remediación y (III) tipo de tratamiento. Es importante mencionar que cada una de estas clasificaciones proporciona diferente información acerca de las tecnologías de remediación (Volke y Velasco, 2002).

De acuerdo con la técnica de remediación es posible encontrar tres estrategias básicas:

- ✓ La destrucción o modificación de los contaminantes; este tipo de tecnologías busca alterar la estructura química del contaminante;

- ✓ La extracción o separación: los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, aprovechando sus propiedades físicas o químicas (volatilización, solubilidad, carga eléctrica, entre otros); y
- ✓ El aislamiento o inmovilización del contaminante: los contaminantes son estabilizados, solidificados o retenidos con el uso de métodos físicos o químicos.

Estas estrategias pueden utilizarse separadas o en conjunto para remediar la mayor parte de los sitios contaminados.

Por otra parte si se considera el lugar donde se realiza el proceso de remediación, existen dos tipos de tecnologías:

- ✓ *"In situ"*. En donde el suelo contaminado es tratado, o bien, los contaminantes son removidos sin necesidad de excavar el sitio. Es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación.
- ✓ *"Ex situ"*. La realización de este tipo de tecnologías requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento que puede realizarse en el mismo sitio (*on site*) o fuera del sitio (*off site*).

finalmente si la clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación se divide en tres tipos de tratamiento:

- ✓ Tratamientos biológicos (biorremediación): utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (plantas, hongos o bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.
- ✓ Tratamientos fisicoquímicos: este tipo de tratamientos utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación.
- ✓ Tratamientos térmicos: utilizan calor para incrementar la volatilización (separación), quemar, descomponer o inmovilizar los contaminantes en un suelo.

En algunos casos, dos o más tecnologías pueden usarse juntas en lo que se conoce como "trenes de tratamiento". En general, estos los trenes de tratamiento se emplean cuando no todos los contaminantes en un medio particular pueden tratarse eliminarse con una sola tecnología (Volke y Velasco, 2002).

En otros casos, un tren de tratamientos puede usarse para:

1. Hacer un medio más fácilmente tratable por una tecnología subsecuente.
2. Reducir la cantidad de desechos que necesitan un tratamiento posterior con una tecnología subsecuente y más costosa.
3. Disminuir el costo total del tratamiento (Volke y Velasco, 2002).

Los tratamientos que se incluyen dentro de estos últimos criterios se enlistan en la Tabla 1 (pág. 13).

3.2 EL DIESEL

El diesel es un combustible empleado en máquinas de combustión interna que en México se utiliza principalmente como energético de vehículos, como los son camiones de carga de servicio ligero y pesado, autobuses de servicio urbano y de transporte foráneo, locomotoras, embarcaciones, maquinaria agrícola, industrial y de la construcción (PEMEX, 2006).

En el Inventario de Sustancias Químicas de Estados Unidos (Mota, 2008), se define al diesel como una compleja combinación de hidrocarburos producidos por la destilación de petróleo crudo. Menciona que este combustible consiste en un conjunto de hidrocarburos que tienen un número de carbonos predominantemente entre 9 y 20, que tienen un intervalo de destilación entre 163°C y 357°C (CAS No. 6834-30-5).

En Estados Unidos y otros países se conocen tres tipos de diesel: el diesel No. 1, No. 2 y No. 4 (la definición anterior incluye a los dos primeros). El diesel No. 1 se caracteriza por tener un intervalo de destilación entre 150°C y 400°C, contiene predominantemente hidrocarburos con cadenas de entre 9 y 16 carbonos. El diesel No. 2 o combustible diesel para automotores y ferrocarriles tiene un intervalo de destilación entre 160°C y 360°C. El diesel No. 4 o diesel marino, se utiliza en motores de mediana velocidad, es más viscoso que el diesel No. 2 y se clasifica como un combustible residual. Contiene normalmente más del 15% de componentes de aceites residuales (Millner *et al.*, 1992).

Tabla 1. Tratamientos existentes para la remediación de suelos (modificado de Volke y Velasco 2002)

Tratamientos biológicos	Modificación de los contaminantes	<i>In situ</i>	*Bioventeo *Bioestimulación *Bioaumentación *Biolabranza *Fitoremediación	- Son efectivos en cuanto a costos - Son tecnologías más amigables para el ambiente - Los contaminantes generalmente son destruidos - Se requiere un mínimo o ningún tratamiento posterior	- Requieren mayores tiempos de tratamiento - Es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos - No pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano
		<i>Ex situ</i>	*Composteo *Biopilas *Biorremediación en fase de lodos (biorreactores)		
Tratamientos fisicoquímicos	Extracción o separación	<i>In situ</i>	*Reacciones de oxidación-reducción (redox) *Remediación electrocinética (RE) *Solidificación/estabilización (S/E) *Lavado de suelos *Extracción de vapores (EV)	Son efectivos en cuanto a costos - Pueden realizarse en periodos cortos - El equipo es accesible y no se necesita de mucha energía ni ingeniería	- Los residuos generados por técnicas de separación, deben tratarse o disponerse: aumento en costos y necesidad de permisos - Los fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad de los contaminantes: necesidad de sistemas de recuperación
		<i>Ex situ</i>	*El tratamiento químico *Separación física *Lavado de suelos		
Tratamientos térmicos	Inmovilización aislamiento	<i>In situ</i>	*Desorción térmica (DT)		- Es el grupo de tratamientos más costoso
			*Incineración *Vitrificación *Pirólisis		

En México, sólo se emplea el diesel No. 2 y se le conoce con el nombre comercial de PEMEX diesel, que proviene de una destilación de la fracción del petróleo crudo denominada gasóleo ligero primario; éste es sometido a un proceso de hidrogenación catalítica denominado hidrotratamiento o hidrodesulfuración el cual tiene como finalidad reducir o eliminar los compuestos de azufre, nitrógeno y oxígeno. Además se obtiene una disminución de los hidrocarburos aromáticos. Finalmente a la mezcla obtenida se le añaden antioxidantes y estabilizantes (Mota, 2008).

Existen ciertas características químicas que se emplean para definir a los destilados del petróleo como temperatura de destilación, contenido de azufre, peso específico, punto de flash, punto de vertido, viscosidad, porcentaje de carbono residual, porcentaje de agua y sedimentos. En la Tabla 2 se muestran las características principales del diesel.

Tabla 2. Características del diesel (Jiménez, 2001)

Características	Análisis típico	Método ASTM
Color ASTM	2.0	1500-64
Peso específico a 20/4 °C	0.852	1.298-67
Temperatura de inflamación, °C	77	93-73
Temperatura de congelación, °C	6	97-66
Viscosidad S.U.S a 37.8°C	38	88-56
Azufre total,% en peso	0.5	129-64
Índice de cetano	55	976-66
Carbón Ramsbottom (en 10% de residuo), % en peso	0.1	524-64
Agua y sedimento, % en volumen	0.05	1 796-68
Destilación	86 - 67	ND
Temperatura inicial de ebullición, °C	185	ND
10% destila a, °C	225	ND
50 % destila a, °C	287	ND
90 % destila a, °C	344	ND
Temperatura final de ebullición, °C	371	ND
Poder calorífico neto, kcal/kg	10 80	ND
Poder calorífico neto, kcal/L	9 272	ND

La composición química del diesel varía dependiendo de las características del crudo del que se destila; pero en general se conoce que es una mezcla de hidrocarburos entre 9 y 20 carbonos, predominantemente. Está compuesto en su mayoría por parafinas, que son alcanos normales, ramificados y cíclicos, en una proporción del 65% al 85% (Jiménez, 2001). En las parafinas y cicloparafinas predominan compuestos con sustitución mono, di y trimetil, que son fácilmente identificables mediante cromatografía de gases. Los compuestos aromáticos están presentes en el diesel en un 10% a 30 %. Debido a que el diesel es un destilado medio que se obtiene a temperaturas altas, todos los hidrocarburos de bajo peso molecular, así como compuestos aromáticos volátiles como benceno, tolueno, xileno y compuestos polinucleares (HAPs) están presentes en muy baja proporción como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Compuestos químicos identificados en el diesel menores al 10% (Mota, 2008)

Compuesto químico	Intervalo de concentración (mg/L)
Orgánicos volátiles	
Benceno	6 – 82
Etilbenceno	100 – 800
Tolueno	100 – 800
Xileno	100 – 800
Hidrocarburos aromáticos policíclicos	
Pireno	ND* – 41
Fluoranteno	ND* – 37
Benzantraceno	0.001 – 1.2
Trifenileno	2.2
Criseno	1.4
Benzo[a]pireno	0.001 – 0.006
Benzo [e] pireno	< 0.1
2-Metilnaftaleno	6700
Naftaleno	2730
Fenantreno	1500
Fenol	6.8
Cresol	54.3
Quinolina	9.2

*ND: No disponible

Además de las concentraciones de los compuestos químicos del diesel es importante conocer su movilidad. En general se sabe que el diesel tiene una movilidad media en el

suelo, ya que su viscosidad cinemática es de 2.2 a 2.4 centistokes. Sin embargo, el diesel tiene componentes con diferentes solubilidades, por lo tanto, es de movilidad variable, como se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Movilidad de los compuestos químicos del diesel (Mota, 2008)

Compuesto químico	Solubilidad (mg/L)	Coefficiente de retardo (Rd)
Baja movilidad (mayor a 100)		
Fluoreno	1.95 E + 00	-
Fenantreno	1.6 E + 00	1097.2
Pireno	1.6 E – 01 -	--
Benzantraceno	5.7 E – 03	24601.0
Benzo[a]pireno	3.0 E – 03	67801.0
Fluorantreno	2.65 E –03	-
Movilidad media (10 - 100)		
Naftaleno	3.1 E + 01	87.94
1,3-Dimetilbenceno (<i>m</i> -xileno)	1.6 E + 02	60.91
1,4-Dimetilbenceno (<i>p</i> -xileno)	2.0 E + 02	54.39
1,2-Dimetilbenceno (<i>o</i> -xileno)	1.8 + 02	23.26
Etilbenceno	1.5 + 02	53.92
Tolueno	5.2 + 02	30.40
Movilidad alta (Rd menor a 10)		
Benceno	1.8 E + 03	8.80
Quinolina	6.0 E + 04	5.16
<i>m</i> -Cresol	2.6 E + 04	4.78
<i>p</i> -Cresol	2.5 E + 04	4.21
<i>o</i> -Cresol	2.6 E + 04	2.32
Fenol	6.7 E + 04	2.09

3.3 EFECTOS TÓXICOS DEL DIESEL

Los productos tóxicos se definen como agentes químicos que bajo ciertas condiciones pueden producir efectos adversos en sistemas biológicos, que van desde alteraciones menores de las funciones normales hasta la muerte de los organismos. El riesgo que implica una sustancia toxica para el humano se relaciona con la toxicidad de él o de los compuestos y con el tiempo de exposición a estos (Millner *et al.*, 1992).

La toxicidad del diesel ha sido poco estudiada en mamíferos, pero existen estudios particulares de algunos de sus componentes por separado. Algunos de los efectos que éstos producen se pueden observar en la Tabla 5 (ver pág. 18).

En lo que se refiere a plantas, los hidrocarburos en el suelo tienen generalmente graves efectos negativos en la germinación de semillas y/o el desarrollo de las plantas. El contacto directo de estas con el diesel les resulta tóxico debido a que los hidrocarburos de bajo punto de ebullición o de cadena corta (menor de C_{10}) actúan como disolventes de la membrana lipídica de las células. Se ha encontrado que la toxicidad de los hidrocarburos decrece de la siguiente manera: monoaromáticos > olefinas > naftalenos > parafinas, la toxicidad está directamente relacionada con el aumento de la polaridad e inversamente relacionada con el aumento del peso molecular.

Los efectos directos de los hidrocarburos también incluyen efectos de ácidos nafténicos en hormonas vegetales del crecimiento (Mota, 2008). Los efectos indirectos de los hidrocarburos en el suelo incluyen la privación de oxígeno a los microorganismos asociados con las raíces de las plantas, por lo que se generan condiciones anóxicas, estas condiciones pueden provocar la producción de compuestos fitotóxicos como el H_2S , por los mismos microorganismos. Los intermediarios metabólicos producidos por los microorganismos degradadores pueden aumentar temporalmente la toxicidad de los hidrocarburos. Estos productos de la degradación incompleta de hidrocarburos como son los ácidos grasos, los ácidos fenólicos y terpenoides poseen propiedades fitotóxicas (Mota, 2008).

Los hidrocarburos afectan también la estructura física del suelo debido a que se reducen los espacios porosos, lo que ocasiona una disminución de la capacidad para almacenar humedad y aire. Las plantas que crecen en los 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 (Mota, 2008).

Tabla 5. Efectos tóxicos de algunos componentes del diesel

Compuesto	Efecto tóxico
Benceno	Carcinogénico humano: el efecto principal de la exposición prolongada al benceno es sobre la sangre. El benceno produce alteraciones en la médula de los huesos y puede producir una disminución del número de glóbulos rojos, lo que puede producir anemia. La exposición breve (5 a 10 minutos) a niveles muy altos de benceno en el aire (10,000 a 20,000 ppm) puede producir la muerte. Niveles más bajos (700 a 3,000 ppm) pueden producir letargo, mareo, aceleración del latido del corazón, dolor de cabeza, temblores, confusión y pérdida del conocimiento. La exposición prolongada a niveles altos de benceno en el aire puede producir leucemia, especialmente leucemia mieloide aguda, conocida a menudo como LMA (ATSDR, 2010).
Xilenos	La exposición a cantidades de xileno mayores a 100 ppm (435 mg/m ³) durante una jornada de 8 horas diarias puede producir alteraciones del hígado, los riñones, los pulmones, el corazón y el sistema nervioso. La exposición breve de animales a concentraciones de xileno muy altas produce espasmos musculares, incoordinación, sordera, alteraciones del comportamiento, alteraciones del peso de algunos órganos y de la actividad de algunas enzimas y también la muerte (ATSDR, 2010).
Tolueno	Afecciones al sistema nervioso, además puede promover la formación de tumores de piel en ratones de laboratorio. El tolueno puede afectar al sistema nervioso. Niveles bajos o moderados pueden producir cansancio, confusión, debilidad, pérdida de la memoria, náusea, pérdida del apetito y pérdida de la audición y la vista. Estos síntomas generalmente desaparecen cuando la exposición termina. Por lo cual que la dosis máxima recomendada son 200 partes de tolueno por millón de partes de aire (200 ppm). Inhalar niveles más altos de tolueno por un período breve puede hacerlo sentirse mareado o soñoliento. También puede causar pérdida del conocimiento, y aun la muerte (ATSDR, 2010).
Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	Ratones que comieron altos niveles de un HAP durante la preñez tuvieron problemas para reproducirse y las crías sufrieron los mismos problemas. Estas crías también tuvieron altas tasas de defectos de nacimiento y bajo peso. No se sabe si estos efectos pueden ocurrir en seres humanos. La dosis máxima de exposición para aminorar estos efectos es de 0.1 miligramos de HAPs por metro cúbico de aire (0.1 mg/m ³) en una jornada laboral de 10 horas. Estudios en animales también han demostrado que los HAPs pueden producir efectos nocivos a la piel, fluidos corporales, y a la habilidad para combatir infecciones después de exposiciones ya sea de corta o larga duración (ATSDR, 2010).
Naftaleno	Puede causar anemia hemolítica en humanos expuestos a más de 500 partes por millón (ppm) durante cortos o largos periodos de tiempo (datos tomados de Mota, 2008).

3.4 ADSORCIÓN DE DIESEL EN EL SUELO

La movilidad de los compuestos orgánicos disueltos en el subsuelo se reduce o retarda por el proceso de adsorción. La adsorción se refiere a la adherencia de iones o moléculas contenidas en una solución a la superficie de sólidos. El proceso de adsorción involucra la retención de un soluto en la fase sólida por medio de distribución entre la fase sólida y la acuosa. El soluto se adsorbe fuertemente en la superficie del material, de tal forma que retarda su movimiento a través de la zona no saturada y saturada.

El grado de adsorción depende de las características físicas y químicas de los compuestos disueltos (sorbato) y de las características del suelo (sorbente) tales como pH, temperatura y contenido de materia orgánica. En suelos arenosos, en general, la adsorción es relativamente baja con respecto a la adsorción en suelos arcillosos y limosos o en suelos con alto contenido de sedimentos orgánicos. La presencia de surfactantes y co-solventes en el suelo disminuyen significativamente el grado de adsorción y, en general, en un sitio contaminado con sustancias diversas se presenta una variedad de interacciones entre contaminantes disueltos, ya que la distribución entre la fase en solución y la fracción orgánica del suelo se considera el principal mecanismo de adsorción para los compuestos hidrofóbicos (Cardona, 2004).

3.4.1 Isotermas de adsorción

Las pruebas para evaluar la adsorción de un compuesto sobre las partículas de suelo se conocen comúnmente como isotermas de adsorción, y se realizan variando la concentración en solución de la sustancia de interés (adsorbato), con una cantidad constante de suelo (adsorbente) y manteniendo constante la temperatura. Las isotermas de adsorción describen de manera conveniente y cuantitativa la adsorción del soluto en los sólidos a temperatura y presión constante. Una isoterma de adsorción muestra la cantidad de adsorbato (soluto), adsorbido en función de su concentración de equilibrio. El método consiste en colocar muestras de suelo en viales con diferentes concentraciones del compuesto a medir y se agitan durante un tiempo, a temperatura constante, hasta que se obtenga el equilibrio entre las fases. Posteriormente se centrifugan y del sobrenadante se toman las muestras para analizar el compuesto que permanece en la solución, y por diferencia de concentración con respecto a la original se obtiene la concentración adsorbida en el suelo, de esta manera al graficar la concentración adsorbida en la masa de suelo (C_s) con la concentración de equilibrio en el sobrenadante

(Cw) se obtendrá una isoterma lineal o no lineal y de ésta se calcula el coeficiente de distribución Kd.

Existen varios modelos para las isotermas de adsorción, algunos de ellos lineales lo cual permite un manejo muy práctico. Las ecuaciones de isotermas se han derivado a partir de estadística termodinámica o de manera empírica. Los modelos para isotermas más conocidos son los de Langmuir y Freundlich; cada uno de ellos se emplea para distintos tipos de soluto y solventes por lo que debe seleccionarse el más adecuado según sea el caso. La ecuación lineal de Freundlich es la isoterma más utilizada para compuestos orgánicos debido a que, por lo general, es la que mejor se ajusta (Orantes, 2002).

La ecuación de Freundlich es la siguiente, Ecuación 1:

$$C_s = K_d C_w^{1/n} \dots \text{Ec. 1}$$

Donde:

Kd es la constante de adsorción de Freundlich o coeficiente de distribución,

n es el exponente de Freundlich (igual a 1 para los casos lineales),

Cs es la concentración adsorbida del soluto en la superficie del adsorbente (mg g^{-1}) en el equilibrio, y

Cw es la concentración del soluto en el líquido (mg L^{-1}) después de la adsorción y una vez que se ha alcanzado el equilibrio.

A cada valor de Cw corresponde un valor de Cs. Con el logaritmo de ambos lados de la ecuación se obtiene la Ecuación 2:

$$\log C_s = \log K_d + \frac{1}{n} \log C_w \dots \text{Ec. 2}$$

Lo cual corresponde a la ecuación de una línea recta, donde n es la pendiente y Kd es la ordenada al origen, Log Kd es una constante; la representación de Log Cs (en la abscisa) con log Cw (en la ordenada), generalmente resulta en rectas con una pendiente "n", cuyo valor, calculado en muchos sistemas, se refleja en números entre 0 y 1, (Freeze y Cherry, 1979). Los principales parámetros para medir el grado de adsorción son el coeficiente de distribución conocida también como constante de adsorción de Freundlich (Kd) y el factor o coeficiente de retardo (R). EL Kd o coeficiente de distribución expresa la relación de equilibrio entre la fase sólida y la líquida y corresponde a la pendiente de la isoterma lineal. Dicha relación se expresa en la Ecuación 3:

$$K_d = \frac{C_s}{C_w} \dots\dots\dots \text{Ec. 3}$$

Si C_s se expresa como masa del compuesto entre la masa de la fase sólida y C_w como masa del compuesto entre volumen de solución, K_d tiene unidades de volumen de solución/masa de la fase sólida. El factor de retardo R es independiente de la concentración y se debe a las características del contaminante y del suelo y, como su nombre lo indica, considera el retraso de la migración del compuesto de interés (causado por adsorción) con respecto a la velocidad del agua subterránea. El factor de retardo está relacionado por el coeficiente de distribución, cuanto mayor sea la afinidad del soluto con la fase del suelo, el soluto será adsorbido en mayor grado y el valor de K_d será mayor. Los solutos que se más se adsorben son aquellos que presentan un comportamiento hidrofóbico acentuado (Iturbe y Silva, 1992).

3.5 LAVADO DE SUELOS

Durante algunos años, se han explorado distintas técnicas para el tratamiento y eliminación de la contaminación de suelos con hidrocarburos. Una de ellas es el lavado de suelo que consiste en la transferencia de hidrocarburos de la fase sólida (suelo) a una fase líquida (agua) ayudada por la adición de sustancias surfactantes (solución de lavado).

El lavado de suelos se puede realizar de dos formas:

- ✓ Lavado “*ex situ*”.
- ✓ Lavado “*in situ*”.

El lavado de suelos “*ex situ*” es un tratamiento en el que el suelo es removido y separado físicamente por medio de tamices para eliminar las partículas finas de las más gruesas, con poca capacidad de adsorción, de la fracción fina. El suelo se lava con soluciones de lavado que contienen surfactantes que permiten desorber y solubilizar los contaminantes por medio de un sistema de agitación. Posterior al tratamiento químico con las sustancias tensoactivas, el suelo se enjuaga con agua para eliminar los residuos de contaminantes y agentes extractantes, y al terminar el tratamiento se devuelve a su lugar de origen. La eficacia de esta técnica depende del grado de adsorción del contaminante, controlado por una serie de propiedades del suelo como el pH, la textura, la capacidad de intercambio catiónico, la mineralogía o el contenido en materia orgánica y otros factores como la antigüedad de la contaminación del suelo o la presencia de otros elementos tóxicos como metales (Ortiz *et al.*, 2007).

El lavado “*in situ*” consiste principalmente en aplicar un flujo con soluciones surfactantes o agua, a través de pozos de inyección o mecanismos de irrigación, sin remover el suelo de su lugar original. La solución se infiltra a través de la matriz del suelo y lavando los contaminantes a su paso, mientras se dirige a pozos o zanjas de recuperación (Iturbe *et al.*, 2004). Este proceso también se conoce como “*flush soil*” o enjuague del suelo. En este tipo de tratamientos se saturan los suelos contaminados con una solución de lavado que es la que transporta los contaminantes a una zona determinada donde pueden ser extraídos, haciéndole pasar agua u otras soluciones acuosas mediante un sistema de inyección o infiltración (Figura 1). El agua subterránea y los fluidos extractantes se capturan y bombean a la superficie utilizando pozos de extracción, donde son tratados y muchas veces reintegrados al sistema de lavado (FRTR, 1999; Son *et al.*, 2003).

Esta técnica se aplica a diferentes contaminantes, a compuestos inorgánicos y orgánicos como lo es el caso de los hidrocarburos. Esta técnica se suele combinar con otros tratamientos como la biodegradación, resultando difícil de aplicar en suelos de baja permeabilidad o ricos en elementos finos, además requiere una vigilancia precisa para impedir que los contaminantes migren en otra dirección distinta a la deseada (Johnston *et al.*, 2002).

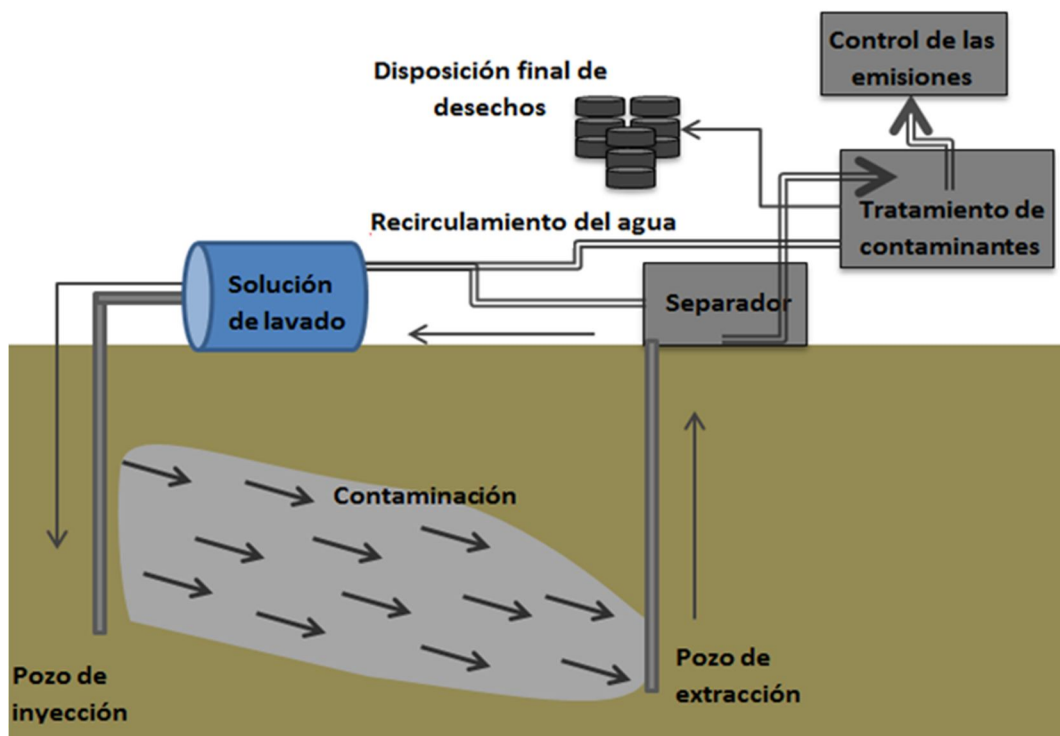


Figura 1. Proceso de lavado de suelo “*in situ*” (FRTR, 1999)

Según datos reportados por la USEPA en el Reporte de Fondos de Remediación (*Superfund Remedy Report*, 2010), del total de la superficie tratada “*in situ*” de 2005 a 2008 la extracción de vapores fue el método más utilizado con un 14%, la biorremediación fue utilizada para el 4% del total de la superficie y el lavado de suelo fue utilizado para el 1% del total de la superficie tratada; se trata de una técnica poco empleada ya que actualmente se tiene la creencia de que se puede contaminar más al suelo aplicando sustancias tensoactivas, además de contaminar el agua.

Sin embargo, el uso de esta técnica de lavado de suelos presenta varias ventajas:

- a) Ofrece la posibilidad de retirar una gran variedad de contaminantes del suelo.
- b) Es muy recomendable en función del costo porque puede usarse como tratamiento preliminar, reduciendo considerablemente la cantidad de material que necesita tratamiento posterior con otro método.
- c) Produce un material más uniforme para la aplicación de alguna otra técnica.
- d) Pueden tratarse suelos rápidamente con una alta contaminación hasta de 20,000 mg/Kg de hidrocarburos (Saval, 2000), lo que no ocurre con los métodos biológicos (Climent, 2007).

3.6 TENSOACTIVOS O SURFACTANTES

La palabra surfactante viene de la contracción de las palabras inglesas “*surface-active substances*”. Se trata de sustancias anfifílicas que se componen de moléculas que se pueden dividir en dos partes; por un lado una parte polar, que contiene heteroátomos tales como oxígeno, azufre, nitrógeno y fósforo, los cuales aparecen en grupos funcionales como alcohol, tiol, éter, éster, ácido, sulfato, sulfonato, fosfato, amina, amida, entre otros (Castillo, 2008), y un grupo apolar, compuesto en general por un hidrocarburo parafínico y cicloparafínico aromático, el cual puede eventualmente contener halógenos. Debido a esta naturaleza dual, los surfactantes en solución tienden a concentrarse en la interfase entre el agua con y la atmósfera, a en donde las cabezas se mantienen inmersas en el agua y las colas en el aire provocando la reducción de las energías interfaciales (Climent, 2007).

Los surfactantes se clasifican en:

- a) **Surfactantes aniónicos:** aquellos que en solución acuosa se disocian en un anión anfífilo y un catión, el cual es generalmente un metal alcalino o un amonio cuaternario. A este tipo pertenecen los surfactantes de mayor producción: detergentes como alquilbenceno sulfonatos, jabones o sales de ácidos carboxílicos grasos, espumantes como el lauril éster sulfato, entre otros.
- b) **Surfactantes no iónicos:** por orden de importancia vienen justo después de los aniónicos. En solución acuosa no forman iones, ya que su parte hidrofílica está formado por grupos polares no ionizados como: alcohol, tiol, éter o éster. Una gran parte de estos surfactantes son alcoholes o fenoles etoxilados (ej. lavaplatos, champús). Ciertos derivados del sorbitol producen surfactantes no-tóxicos para uso farmacéutico o alimenticio.
- c) **Surfactantes catiónicos:** aquellos que se disocian en un catión anfífilo y un anión generalmente de tipo halogenado. Estos surfactantes se usan solamente en aplicaciones especiales donde la carga positiva del anfífilo produce ventajas como en enjuagues o emulsiones asfálticas. En la mayoría de los casos corresponden a un grupo amonio cuaternario.
- d) **Otros tipos de surfactantes:** la combinación en la misma molécula de un grupo con tendencia aniónica y de un grupo con tendencia catiónica produce un surfactante anfotérico, por ejemplo; los aminoácidos, las betainas o los fosfolípidos. Según el pH del medio una de las dos disociaciones prevalece. Este tipo de surfactante se usa sólo en casos particulares debido a su alto costo. Recientemente se han producido surfactantes poliméricos al insertar sobre una macromolécula un cierto número de grupos hidrofílicos, o al producir la policondensación de grupos con ciertas características polares y apolares como el óxido de etileno y el óxido de propileno (Slager y Fernández, 2004).

En el caso de hidrocarburos se han aplicado agentes tensoactivos, conocidos comúnmente como surfactantes, que pueden ser detergentes o emulsificantes, con el fin de hacer un lavado del suelo y separar la matriz (suelo, sedimento o agua) del hidrocarburo. Los emulsores facilitan la mezcla de sustancias que normalmente no se mezclan, como el

aceite y el agua. Por esta razón, las soluciones tenso-activas son eficaces para retirar contaminantes oleosos (López e Iturbe, 2004).

3.7 APLICACIÓN DE SURFACTANTES EN SUELOS

Los surfactantes que se usan en el lavado del suelo, debido a su alta solubilidad, movilizan contaminantes orgánicos adsorbidos o no al suelo. Hasta la fecha se han utilizado surfactantes sintetizados químicamente, algunos de los cuales resultan difíciles de degradar una vez que se encuentran en el ambiente causando problemas de contaminación (Ramos *et al.*, 2003; Myres, 2005; Lai *et al.*, 2009). Estos surfactantes cambian (reducen) la tensión superficial, este descenso de la tensión superficial facilita la eliminación de las partículas de suciedad de las superficies sólidas. Los surfactantes son susceptibles de compatibilizar el agua con los aceites, permitiendo la formación de estructuras que asocian agua y aceite en una sola fase, llamadas micelas. Esta acción se llama solubilización o co-solubilización y tienen muchas aplicaciones.

La acción humectante y el poder solubilizante están combinados en la acción limpiadora de ciertos tipos de anfífilos llamados detergentes o limpiadores en general. Prácticamente todas las aplicaciones provienen de las propiedades de los anfífilos en solución y de su capacidad de adsorberse en una superficie o interfase, esto ocurre si ambas partes de la molécula del anfífilo tienen una fuerte caracterización polar o apolar. Los surfactantes muchas veces causan problemas por su alta resistencia a la degradación biológica, además de que algunos de estos tienen un efecto tóxico que representa un peligro para la flora y fauna. En los cuerpos de agua superficiales la formación de espuma por estas sustancias dificulta la transferencia de oxígeno y además, el contenido de fosfatos en estas sustancias contribuye a la eutrofización del cuerpo de agua (Ramos *et al.*, 2003). Adicionalmente, algunos tienen poder bactericida por lo que pueden afectar la biodiversidad de microorganismos en el suelo (Soberón, 2009).

El uso de biosurfactantes se ha hecho popular particularmente en aplicaciones ambientales ya que resultan menos agresivos que los surfactantes químicos por ser biocompatibles o fácilmente biodegradables y por lo tanto menos tóxicos o perjudiciales al ambiente (Georgiou *et al.*, 1992). Ya que su costo efectivo de producción “*ex situ*” puede ser más bajo que los surfactantes sintéticos aunado al hecho de que los remanentes del lavado resultan ser menos tóxicos (Bail *et al.*, 1997; Mulligan, 2005; Shin *et al.*, 2006; Samadi *et al.*, 2007; Paria, 2008).

3.7.1 Biosurfactantes

Los biosurfactantes son moléculas producidas por microorganismos, que al igual que los surfactantes producidos químicamente, contienen un segmento liposoluble (soluble en aceite) y otro hidrosoluble (soluble en agua o disolventes polares). Se trata de moléculas complejas que cubren un amplio rango de estructuras químicas incluyendo péptidos, ácidos grasos, fosfolípidos, glicolípidos, antibióticos, lipopéptidos, entre otros. Los microorganismos también producen en algunos casos surfactantes que son combinaciones de muchas estructuras químicas como son los surfactantes microbianos poliméricos. Muchos biosurfactantes han sido purificados y sus estructuras químicas son conocidas, mientras que los de alto peso molecular son generalmente heteropolisacáridos polianiónicos que contienen tanto polisacáridos como proteínas, los de bajo peso molecular suelen ser glucolípidos.

Podemos clasificar los biosurfactantes atendiendo a tres criterios:

1. Naturaleza química.

- a) Lípidos,
- b) Hidratos de carbono,
- c) Aminoácidos,
- d) Glucolípidos y
- e) Lipopéptidos.

2. Peso molecular

a) Bajo peso molecular: suelen ser glucolípidos. El más estudiado es el rhamnolípido, producido por diversas especies como *Pseudomonas* sp. La función principal de estos biosurfactantes es reducir la tensión superficial entre fases (por ejemplo: agua-roca).

b) Alto peso molecular: suelen ser polisacáridos, proteínas, lipoproteínas, lipopolisacáridos, o mezclas de estos polímeros. Estos biosurfactantes no son tan eficaces en cuanto a la reducción de la tensión superficial entre fases, pero sí son buenos emulsionantes. Además, se ha demostrado que son muy eficaces a bajas concentraciones y poseen una considerable afinidad por el sustrato. Un ejemplo es el Alasan producido por *Acinetobacter radioresistens*.

3. Carga iónica

a) Agentes aniónicos: contiene generalmente uno de cuatro grupos polares solubles, carboxilato, sulfonato, sulfato o fosfato, combinado con una cadena hidrocarbonada hidrófoba. Si la cadena es corta son muy hidrosolubles y en el caso contrario tendrán baja hidrosolubilidad y actuarán en sistemas no acuosos como aceites lubricantes. Se usan principalmente en la industria de jabones y detergentes.

b) Agentes catiónicos: están compuestos por una molécula lipofílica y otra hidrofílica, consistente de uno o varios grupos amonio terciarios o cuaternarios. Son utilizados comúnmente en detergentes, agentes limpiadores, líquido lavaplatos, tratamiento de textiles, como sustancias activas antimicrobianas y en la industria cosmética.

c) Agentes no iónicos: no se disocian en iones hidratados en medio acuoso. Las propiedades hidrofílicas son provistas por hidratación de grupos amido, amino, éter o hidroxilo.

d) Otros tipos de surfactantes: La combinación en la misma molécula de un grupo con tendencia aniónica y de un grupo con tendencia catiónica produce un surfactante anfotérico, como por ejemplo: los aminoácidos, las betainas o los fosfolípidos. Según el pH del medio una de las dos disociaciones prevalece. Este tipo de surfactante se usa sólo en casos particulares debido a su alto costo (Soberón, 2009).

Actualmente, los biosurfactantes han aumentado la versatilidad en comparación a muchos surfactantes sintéticos y tienen la ventaja de poder producirse por fermentación. Existen células microbianas intactas con una superficie celular altamente hidrofóbica que son ellas mismas surfactantes. En algunos casos, los propios surfactantes juegan un papel natural en el crecimiento de las células microbianas sobre sustratos insolubles en agua. Los surfactantes extracelulares están implicados en la adhesión celular, emulsión, dispersión, floculación, agregación celular y fenómenos de desorción. Aunque el tipo y cantidad de surfactante microbiano producido depende primeramente del organismo productor, factores como el carbono y el nitrógeno, elementos traza, temperatura, y aireación, también afectan a su producción por el organismo. En la Tabla 6, se enlistan algunos de los surfactantes producidos por microorganismos.

Tabla 6. Biosurfactantes producidos por microorganismos (Modificado de Mulligan, 2001).

Clase de surfactante	Microorganismo
Lípidos trethalosados	<i>Arthrobacterparaffineus</i> <i>Corynebacterium</i> sp <i>Mycobacterium</i> sp <i>Rhodococcus erythropolis</i>
Rhamnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Soforolípidos	<i>Candida apicola</i> <i>Candida bombicola</i> <i>Candida lipolytica</i>
Lípidos glucosados sacarosados y fructosados	<i>Arthrobacter</i> spp. <i>Corynebacterium</i> sp <i>R.erythropolis</i>
Lípidos de celobiosa	<i>Ustilago maydis</i>
Polyol lípidos	<i>Rhodotorula glutinous</i> <i>Rhodotorula graminus</i>
Diglicosil diglicéridos	<i>Lactobacillus fermentii</i>
Lipopolisacaridos	<i>Acenetobacter calcoaceticus</i> (RAG1) <i>Pseudomonas</i> sp <i>Candida lipolytica</i>
Lipopéptidos	<i>Arthrobacter</i> sp <i>Bacillus pumilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorencens</i>
Ornitina peptides de lisina	<i>Thiobacilus thiooxidans</i> <i>Gluconobacter cerinus</i> <i>Streptomyces sioyaensis</i>
Fosfolípidos	<i>T. thiooxidans</i> <i>Corynebacterium alkanolyticum</i>
Lípidos sulfurados	<i>Capnocytophaga</i> sp.
Ácidos grasos	<i>Penicillium spiculisporum</i> <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Antrobacter parafineus</i> <i>Talaromyces trachyspermus</i>

El uso potencial de los biosurfactantes es industrial, pero una de las aplicaciones viables está en la industria del petróleo para recuperación total del aceite de la piedra arenisca subterránea, estimado en un aumento del 30% de la producción actual. Ejemplos de esto son los surfactantes trehalolípidos de *Nocardia rhodochrous* (Jit, 2000).

Los contaminantes hidrofóbicos presentes en los hidrocarburos del petróleo, suelos y agua, requieren de su solubilización antes de ser degradados por los microorganismos. La mineralización está determinada por la desorción de los hidrocarburos del suelo. Los surfactantes pueden aumentar el área de los materiales hidrofóbicos, como pesticidas en suelos y agua, aumentando así su solubilidad en el agua (Soberón, 2009). Lo que resulta ser uno de los métodos más efectivos para aumentar la biodisponibilidad y con ello facilitar la asimilación de dichos contaminantes por los microorganismos (Lai *et al.*, 2009).

La producción de moléculas tensoactivas de origen biológico, ha recibido atención considerable debido a sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos, aromatización de bebidas alcohólicas, reciclaje de papel, fabricación de pulpa de papel, farmacología y la industria del aceite. La habilidad de los biosurfactantes para emulsionar hidrocarburos mezclados con agua ha sido ampliamente divulgada, se ha demostrado que las propiedades emulsionantes favorecen, también, la degradación de los hidrocarburos en el ambiente, por tanto los hacen muy útiles para el control de la contaminación por vertidos de aceites.

Desde el punto de vista de la producción, el uso principal de los surfactantes es la formulación de jabones, detergentes y otros productos para lavado y limpieza. La Figura 2 muestra la forma de acción detergente sobre un sólido sucio. Las moléculas del detergente deben poder adsorberse sobre el sustrato y situarse entre ellos para poder separarlos (Soberón, 2009).

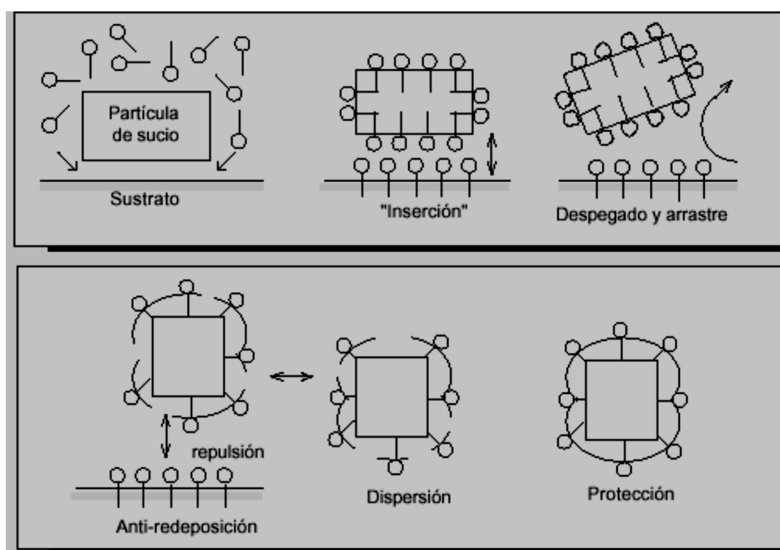


Figura 2. Acción del detergente (Soberón, 2009)

Actualmente el uso de biosurfactantes se ha hecho popular para remover diversos tipos de contaminantes, no sólo de hidrocarburos sino también de otros compuestos como pesticidas, compuestos clorados, metales pesados (Torres *et al.*, 2007), alcanos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y bifenilos (Mata-Sandoval *et al.*, 2000). Esto debido a características como; su estabilidad a temperaturas elevadas, cambios de pH y concentración de sales, poseer una efectiva selectividad, ser menos tóxicos al ambiente, además de que el costo efectivo de producción puede ser más bajo que el de los surfactantes sintéticos (Bail *et al.*, 1997; Kosaric, 2001; Mulligan, 2005; Shin *et al.*, 2006, Samadi *et al.*, 2007; Soberón, 2009).

Estudios recientes han demostrado que se puede utilizar el poder solubilizante de los biosurfactantes para la formación de micelas y extraer ciertas sustancias contaminantes producidas por petróleo, aun cuando se encuentren en una mínima concentración (Soberón, 2009). Los biosurfactantes aumentan la superficie insoluble o hidrofóbica de los contaminantes aumentando con ello su biodisponibilidad, lo que a su vez promueve el crecimiento de bacterias y el índice de metabolización de estos contaminantes por los microorganismos.

Los biosurfactantes incrementan la biodisponibilidad de los hidrocarburos debido a que:

- ✓ Propician la dispersión del petróleo, incrementando con ello la superficie de contacto.
- ✓ Poseen funciones evolutivas para los propios microorganismos. Pueden ayudar a los microorganismos a desprenderse de las gotas de petróleo una vez se ha agotado la fuente de carbono. Hay que considerar que una clase de microorganismos suele utilizar un solo tipo de hidrocarburo entre la mezcla que existe, por ello les sería útil poder desprenderse de estas interacciones hidrofóbicas que mantiene la membrana con la gota de petróleo, para así tener acceso a nuevas fuentes de carbono.
- ✓ Deja una microcápsula alrededor de la gota de petróleo en donde la fuente de carbono ya ha sido agotada favoreciendo así a toda la población.

3.7.2 Investigaciones hechas con biosurfactantes para la remoción de contaminantes en el suelo

Se han utilizado diferentes tipos de biosurfactantes para remover residuos de hidrocarburos en suelo con buenos resultados. Bail *et al.* (1997) probaron un biosurfactante aniónico del grupo de los monorhamnolípidos producido por *Pseudomonas aeruginosa* para remoción de hexadecano residual en columnas de suelo, en donde se aplicaron soluciones con diferentes concentraciones del biosurfactante. Se determinó que la concentración óptima fue aproximadamente diez veces la concentración micelar crítica (CMC) del biosurfactante. El mecanismo primario para la remoción fue la movilización (dislocación y dispersión), mientras que la solubilización se consideró insignificante. El funcionamiento del biosurfactante fue comparado con el de dos soluciones tensoactivas sintéticas resultando considerablemente mejor. Lo cual sugiere que el uso de biosurfactantes puede ofrecer ventajas sobre los surfactantes sintéticos en la remediación de sitios contaminados. Los resultados de estos experimentos indicaron que los rhamnolípidos cuentan con un gran potencial en la remediación de suelos.

Herman *et al.* (1997) realizaron una investigación para evaluar el efecto de concentraciones bajas de un biosurfactante rhamnolípidos sobre la biodegradación “*in situ*” en columnas de arena saturadas con hexadecano. A concentraciones mayores que la CMC del biosurfactante, se llevó a cabo el proceso de movilización del hexadecano, en cambio a concentraciones menores a la CMC elevó la mineralización “*in situ*” de este contaminante por actividad microbiana. Los resultados de este estudio revelan que a concentraciones bajas de biosurfactante es posible promover el tratamiento “*in situ*” del hexadecano residual. El éxito del tratamiento con biosurfactantes dependió de la respuesta de los microorganismos presentes.

Urum y Pekdemir (2004) realizaron un estudio para evaluar la capacidad de las soluciones acuosas preparadas con varios tipos de biosurfactantes (aescin, lecitina, rhamnolípidos, saponina y tanino) para lavado de suelo contaminado con crudo. El comportamiento de los biosurfactantes fue comparado con un surfactante químico, el sulfato dodecyl de sodio (SDS) en diversas concentraciones. Los resultados demostraron que los biosurfactantes podían quitar una cantidad significativa de petróleo crudo del suelo contaminado. De todos los biosurfactantes que se probaron, se encontró que los rhamnolípidos tuvieron una eficiencia casi del 50% mayor a la del surfactante sintético.

Kuyukina *et al.* (2005) hicieron experimentos en columnas de suelo para probar la capacidad del biosurfactante producido por *Rhodococcus ruber* de remover crudo de

petróleo realizando variaciones de temperatura. Se encontró que este tipo de biosurfactante tiene de 1.4 a 2.3 veces mayor capacidad de remoción que un surfactante sintético (Tween 60), a temperaturas de entre 22 y 28 °C. El análisis químico demostró que el petróleo crudo removido por biosurfactante contuvo una proporción más baja de peso molecular comparado con su composición inicial. Este resultado sugiere que el crudo movilizado por los biosurfactantes se puede degradar fácilmente por las bacterias presentes en el suelo. Por lo que los biosurfactantes de *Rhodococcus* se pueden utilizar para la remediación “*in situ*” de suelos contaminados por crudo.

En 2005, Bordas *et al.* realizaron un estudio en columnas de suelo para conocer la relación de remoción de pireno y la concentración de una mezcla de biosurfactantes del tipo rhamnolípido (57SJ), con una CMC de 0.4 g/L, como sustancia solubilizante del contaminante. Se hicieron lavados en la columna con diferentes concentraciones del biosurfactante en la solución de lavado y se observó que cuando la concentración del biosurfactante fue de 5.0 g/L, la concentración del pireno aumentaba 178 veces en el efluente, por lo que la recuperación acumulativa del pireno alcanzó el 70%. Este estudio proporcionó una serie de datos útiles para encontrar las condiciones óptimas para la remediación eficaz del suelo usando la mezcla de rhamnolípidos (57SJ).

Autores como Shin *et al.* (2006) realizaron pruebas en columnas de suelo para determinar la remoción del fenantreno por biodegradación asistida. Se modificó el pH de la solución, se inocularon los microorganismos y se incubaron las columnas durante 10 días para permitir la biodegradación. Para este experimento se utilizó un biosurfactante de tipo rhamnolípido producido por una cepa del género *Pseudomonas sp.* Los mejores resultados se observaron a pH ligeramente ácidos (pH 5) bajando significativamente las concentraciones de fenantreno.

Martienssen y Schirmer, en 2007 realizaron un estudio para determinar la eficacia de BioVersal FW (biosurfactante). Para la remediación “*in situ*” de un sitio contaminado con aceite mineral se logró remover hasta 50 g/kg del contaminante durante 15 meses. En este sitio contaminado se utilizó el biosurfactante para acelerar el proceso de atenuación natural. Comprobó que este biosurfactante funcionó incluso para contaminaciones antiguas de aceite mineral y en concentraciones extremas del hidrocarburo. Se concluyó que la movilización del agente contaminador tiene un papel dominante como parte de proceso de atenuación natural y facilitó la metabolización por parte de las bacterias nativas del suelo.

En el 2008, Araujo *et al.* investigaron el efecto de los biosurfactantes en la eficiencia de los procesos de recuperación de aguas contaminadas con crudo liviano. El biosurfactante utilizado fue producido a partir de 2 cepas bacterianas (MI9 y MI10). La adición del biosurfactante y la utilización de un cultivo mixto influyo positivamente la biodegradación del crudo liviano, lo cual demuestra que el uso de biosurfactante es una opción que incrementa la eficiencia en los procesos de biorremediación de aguas subterráneas contaminadas con hidrocarburos.

Whang *et al.* en 2008 realizaron un estudio para evaluar el uso potencial de dos biosurfactantes, el Surfactín producido por *Bacillus subtilis* ATCC 21332 y el rhamnolípidos producido por *Pseudomonas aeruginosa*, para la biodegradación asistida en agua y suelo contaminados con diesel. El estudio determinó que ambos biosurfactantes podían reducir la tensión superficial a menos de 30 dyn/cm a partir de 72 dyn/cm con los valores de la concentración micelar crítica (CMC). Además, se demostró la capacidad en el aumento de la solubilidad del diesel con la adición de estas sustancias tensoactivas (biosurfactantes). La adición de 40 mg/L de Surfactín realzó perceptiblemente el crecimiento de la biomasa así como el porcentaje de biodegradación de diesel (94% con respecto al control sin biosurfactante); sin embargo, al agregar una concentración mayor a la de 40 mg/L, disminuyó el crecimiento de la biomasa y la eficacia de la biodegradación del diesel (hasta el 40%). Por otro lado la adición del rhamnolípidos también presentó comportamientos similares al Surfactín aunque no mostró diferencias significativas al variar la concentración a partir de los 80 mg/L hasta 160 mg/L. En conclusión, estos biosurfactantes pueden estimular a los microorganismos nativos y facilitar el proceso de biodegradación en sistemas contaminados con diesel.

Lai *et al.*, (2009), comparó la capacidad de dos diferentes biosurfactantes para remover crudo de petróleo del suelo (hidrocarburos fracción pesada), los cuales a su vez fueron comparados con surfactantes sintéticos. Los resultados de los biosurfactantes exhibieron una eficacia mucho más alta del retiro de Hidrocarburos fracción pesada que los tensoactivos sintéticos examinados. La eficacia de la remoción de estos hidrocarburos también aumentó al incrementarse la concentración biosurfactante (a partir 0 a 0.2 % en masa) y no varió perceptiblemente por el tiempo de contacto entre 1 y 7 días. Para los rhamnolípidos el porcentaje de remoción fue del 23%, para el Surfactín fue de 14%, el del Tween 80 fue del 6% y el de Tritón X-100 fue del 4%.

3.7.3 Procesos de remoción de contaminantes con sustancias tensoactivas

Muchas propiedades físicas usadas para clasificar a los surfactantes como la formación de la emulsión, la solubilización del aceite, la formación de espuma y su poder detergente depende de la concentración micelar crítica (CMC) que es la concentración en la cual se forma la primer micela (Urum y Pekdermir, 2004). A bajas concentraciones los tensoactivos existen sólo en forma de monómeros y conforme aumenta su concentración llegan a un punto donde la superficie interfacial se satura y las moléculas se aglomeran en micelas. En estas estructuras las porciones hidrofóbicas se encuentran en el interior de la micela, sin tener contacto con el agua, mientras que las cabezas hidrofílicas se encuentran en la superficie de la micela (Wilson *et al.*, 1994). La concentración del surfactante a la que las micelas se forman se le llama concentración micelar crítica (CMC) y ésta varía para cada surfactante dependiendo del tipo que se trate (iónico o no iónico), de su identidad y del contenido total de sales que existan en la solución (Deshpande *et al.*, 1999).

En la acción de los surfactantes en el lavado de suelos suceden dos procesos; el primero ocurre por debajo de la CMC donde se forman numerosos monómeros que incrementan el ángulo de contacto entre el suelo y el contaminante hidrofóbico, lo que promueve la separación del contaminante de las partículas de suelo (Kuyukina *et al.*, 2005). El primero es el mecanismo de movilización, el cual ocurre en concentraciones por debajo de la CMC. Los fenómenos que se asocian a este mecanismo incluyen la reducción de la tensión superficial entre aceite-agua, aire-agua o suelo y los circuitos de agua, según sea el caso. Los tensoactivos en contacto con el sistema del suelo-aceite aumentan el ángulo de contacto y reducen la adhesión capilar entre el aceite y el suelo. Debido a la adsorción de tensoactivos en suelos, el mecanismo de la movilización depende de la carga iónica del surfactante (Urumy y Pekdemir, 2004).

El otro mecanismo conocido como solubilización ocurre por arriba de la CMC, en este caso el contaminante es capturado dentro de estructuras conocidas como micelas, donde el contaminante queda atrapado en la parte hidrofóbica de las mismas (Kuyukina *et al.*, 2005). Las soluciones de lavado preparadas con surfactantes que contienen concentraciones sustancialmente mayores a la CMC contienen un volumen bastante significativo de fase no polar en el interior de las micelas. El extremo hidrofóbico del tensoactivador agrupa las moléculas dentro de la estructura micelar con el extremo hidrofílico expuesto a la fase acuosa en el exterior. Por lo tanto, el interior de una micela constituye un ambiente compatible hidrofóbico con las moléculas orgánicas, el proceso de la incorporación de las moléculas en una micela se conocen como solubilidad.

El retiro del petróleo crudo de suelos contaminados con el proceso de lavado utilizando biosurfactantes no se ha explotado lo suficiente para los diferentes componentes derivados del petróleo (Urum y Pekdemir, 2004).

3.8 TOXICIDAD DE LOS SURFACTANTES EN SUELOS POST-TRATAMIENTO

Existen diversos estudios sobre la biodegradabilidad de varias sustancias tensoactivas, tanto de origen químico como biológico ya que la degradación biológica es el mecanismo de mayor importancia para saber qué tan larga será su permanencia tanto en los sistemas acuáticos como terrestres y con ello evaluar los riesgos ecológicos que representa su uso (Berna *et al.*, 2007). Algunos autores como Singh *et al.*, (2002) han mencionado que la aplicación de surfactantes puede inhibir el desarrollo o crecimiento de poblaciones bacterianas y que la toxicidad aumenta con el incremento de cadenas de alquil que tienen un gran efecto en la toxicidad por los grupos de óxido de etileno o etoxilados que están involucrados en los procesos de lavado. Esto depende también del tipo de surfactante que se esté utilizando, los surfactantes catiónicos son más tóxicos que los aniónicos y los no iónicos (López e Iturbe, 2004). Debido a que existe poca información sobre la toxicidad post-tratamiento en plantas, en este estudio se realizó un ensayo de germinación de semillas de lechuga que es una especie sensible a los cambios de condiciones y con ello observar si el uso del Biosurf M9b tiene algún efecto tóxico en el desarrollo de plantas una vez aplicado al suelo por medio de los lavados.

3.9 BIOSURF M9B

El Biosurf M9b es producido por *Pseudomonas koreensis* cepa M9B, aislada del sistema de pozas ubicadas en la localidad de Cuatrociénegas Coahuila, México, identificada así por medio de secuencias del 16S ribosomal y confirmada utilizando el DNA total hibridizado. Se trata de bacterias Gram negativas, no generadoras de esporas, de aproximadamente 1 X 2 μm de tamaño, presentan movilidad por uno o más flagelos polares, forman colonias circulares y de color blanco-amarillentas cuando crece en agar de Luria-Bertan y cuando se cultiva en TSA, puede llegar a tener una aparición mucosa después de dos días de incubación.

La habilidad de producir biosurfactante en *P. koreensis* (M9b) se cree que se desarrolló como una estrategia que le confiere mayor competitividad ante otros microorganismos en

un medio limitado por fosfatos. Se realizaron experimentos para determinar la reacción de competencia ecológica entre *P. korensis* y *Exiguobacterium auratiacum* m5G la cual fue aislada del mismo lugar. Las pruebas se realizaron en el medio de cultivo PPGI y bajo en fosfato, sujetas a las mismas tensiones del medio líquido en el que se encuentran normalmente en vida libre. Se observó que *E. auratiacum* m5G mostró un menor crecimiento que *P. korensis* (Toribio *et al.*, 2011).

Para corroborar esta observación, se agregó extracto del surfactante producido por *P. korensis*, en ambas cepas y *P. korensis* mostró una mejoría en su desarrollo. Por otro lado en las placas con *E. auratiacum* se observó un efecto negativo en su crecimiento, lo cual sugiere que gracias a las tensiones que se producen por el segregado de las sustancias tensoactivas de la cepa M9b (*P. korensis*) se estableció una interacción alopática con otras bacterias, ya que el efecto del biosurfactante resultó tóxico para *E. auratiacum*.

El surfactante producido por *P. korensis* cepa M9b se comparó con las cepas M9c y CCB10, las cuales fueron aisladas en las pozas de la misma región y que también producen biosurfactantes pero de diferente composición. Se comprobó que estas tres cepas de *Pseudomonas sp.*, poseen una alta homología en la secuencia del rRNA 16S, aunque presentan diferencias en el tamaño de su genoma. El mapeo demostró que posiblemente las tres cepas de *Pseudomonas sp.* aisladas de esta localidad divergieron de la población coreana de *P. korensis* y debido a su aislamiento geográfico (posiblemente desde el período jurásico) se especializaron de diferente manera. Además, se realizó una amplia investigación la cual mostró que la capacidad de *P. koerensis* para producir biosurfactantes es endémica de la cepa procedente de la región de Cuatrociénegas, Coahuila, México (Toribio *et al.*, 2010).

En lo que respecta al extracto crudo del surfactante producido por *P. Korensis* cepa M9b, presenta una solubilidad parcial en agua destilada y una solubilidad total en metanol, aunque la solubilidad total en agua se da al ajustarse el pH a un valor de 8, dicha solubilidad también es total si el extracto crudo se disuelve directamente en buffer TRIS pH 8.4 ó en una solución 0.1 M ó 0.02 M de bicarbonato de sodio. Como resultado de la purificación se detectó que solo existe una marca con actividad de surfactante, por lo que parece corresponder a una sola molécula. El espectro de infrarrojo de la fracción purificada con actividad de surfactante muestra bandas de absorción bien definidas, ver Figura 4. Las banda A (3,300 cm⁻¹) es característica del movimiento stretching del enlace N-H, el movimiento stretching del enlace C=O genera una banda alrededor de 1655, correspondiente al pico F (1,652 cm⁻¹). La banda G (1,540 cm⁻¹) parece ser una

combinación del movimiento de deformación del enlace N-H y del movimiento stretching del enlace C-N. La región de las bandas B (2,952 cm⁻¹), C (2,932 cm⁻¹) y D (2875 cm⁻¹); así como H (1,462 cm⁻¹) e I (1,396 cm⁻¹) son típicas de enlaces –CH₂- y –CH₃. La banda E (1,652cm⁻¹) es propia de la absorción que genera un carbonilo de lactona (Zavala 2011).

La concentración micelar crítica del medio libre de células se encuentre entre 2-4% (v/v). El valor de CMC es del mismo orden de magnitud que el reportado para otros biosurfactantes, por ejemplo para la serrawetina de *Serratia marcescens* es de 6% (v/v), cultivada en medio simple con glicerol (Zavala, 2011).

3.10 SITUACIÓN DE LA TÉCNICA DE LAVADO EN MÉXICO

En México, de las 40 empresas autorizadas para remediar suelos contaminados con diferentes tipos de contaminantes, 31 utilizan métodos biológicos (biorremediación) para el tratamiento. Sin embargo, el lavado de suelos, la oxidación química y la separación física constituyen otra parte importante de las tecnologías más empleadas en México (Figura 3). De dichas empresas, las que ofrecen servicios de biorremediación, utilizan sistemas de composteo y biolabranza. El 87.5% realizan tratamientos “*in situ*” y el resto “*ex situ*”.

La tecnología de lavado de suelo en México se utilizó por primera vez en el 2002, para la limpieza de 45,000 toneladas de sedimentos contaminados con hidrocarburos en diversas zonas del país. Al principio el proyecto se ejecutó con gran éxito debido a las características de los sitios contaminados, sin embargo, ciertas propiedades del sedimento como la textura (alto contenido de arcillas) y el contenido de materia orgánica resultó una limitante para esta tecnología (INE, 2007).

La tecnología de lavado de suelo no es muy recurrida debido a que existe mucha desinformación y poca investigación sobre este tema. Por ello, se cree que esta tecnología no funciona debido a que como los contaminantes son trasferidos a una fase acuosa, en lugar de ayudar crean otra fuente de contaminación. Pero es importante recalcar que este tipo de tratamientos siempre va secuenciado por un tratamiento de agua el cual puede ser floculación o el uso de filtros de carbono, lo que permite la reutilización de dicha agua para reintegrarla al proceso o descargarla con una buena calidad que puede exceder los parámetros de calidad de descarga señalados en nuestra legislación.

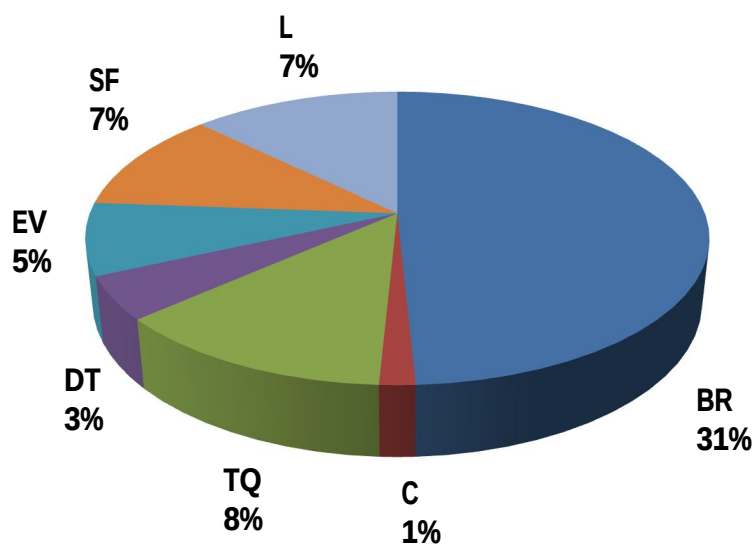


Figura 3. Tecnologías de remediación de suelos utilizadas en México por empresas autorizadas. BR: biorremediación; L: lavado; SF: separación física; EV: extracción de vapores; DT: desorción térmica; TQ: tratamiento químico; C: centrifugación (tomado de INE, 2007).

Otra creencia es la de que el uso de surfactantes puede ser una fuente de contaminación al dejar en los sitios tratados residuos de surfactantes que confieren cierto grado de toxicidad al suelo, aunque esto dependerá del tipo de surfactante que se utilice ya que hay unos como el Tw 80 son altamente biodegradables (Franzety *et al.*, 2006); y se ha demostrado que algunos biosurfactantes son menos tóxicos y más fácilmente biodegradables (Martienssen y Schimer, 2003) por lo que resulta importante empezar a desarrollar nuevo conocimiento respecto a los efectos tóxicos de los biosurfactantes, y de esta manera incentivar su utilización.

En México existen pocos casos documentados del uso de esta técnica, en el 2000 el grupo de saneamiento y acuíferos del Instituto de Ingeniería de la UNAM reporta haber tratado 1540 m³ en una terminal de almacenamiento y distribución de Pemex (Iturbe *et al.*, 2004b). En 2004 Pemex en colaboración con una agencia Alemana realizó la limpieza de 45,000 toneladas de sedimentos.

CAPÍTULO 4

DESARROLLO EXPERIMENTAL

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En la Figura 4 se aprecia el esquema de trabajo que se siguió para el desarrollo experimental.

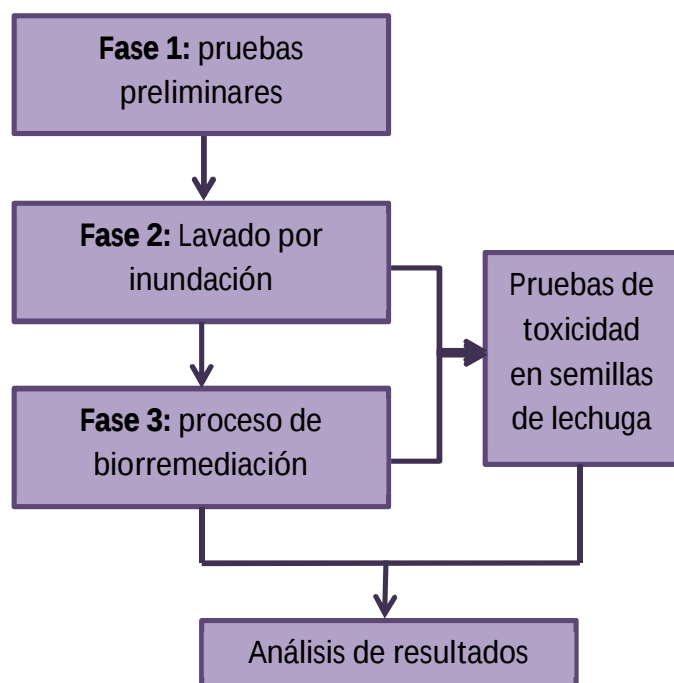


Figura 4. Esquema de trabajo

4.1 FASE 1: ACTIVIDADES PRELIMINARES

4.1.1 Conformación del suelo artificial

Para conformar el suelo artificial se tomó como referencia la caracterización de un suelo originario de la localidad de Dos Bocas, procedente de una terminal de almacenamiento y distribución de PEMEX en Tabasco (Leyva 2006; Castillo, 2008), el cual es de textura arenosa con alto contenido de materia orgánica. Se optó por usar este tipo de suelo debido a que la técnica de lavado de suelos “*in situ*” es recomendable para suelos de granulometría gruesa (Badillo y Rodríguez, 1963; Lee *et al.*, 2002). Para los componentes minerales del suelo, se utilizó arena sílica malla número 50, como limo feldespato potásico

y arcilla de tipo caolinita, obtenidos comercialmente (Anexo IV). Las proporciones a utilizar se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Composición del suelo artificial

Componente	Porcentaje (%)	Textura esperada
Arena	85.70	Arenosa (con alto contenido de materia orgánica)
Limo	4.55	
Arcilla	9.75	

Una vez conformada la mezcla mineral se le adicionó el 6.9% del peso total de materia orgánica en forma de composta comercial, la cual fue previamente cribada con malla No. 10, con la finalidad de asemejar a nuestro suelo de referencia, en cuanto al contenido de materia orgánica.

4.1.2 Caracterización fisicoquímica del suelo

Para realizar la caracterización fisicoquímica del suelo se tomaron como referencia los métodos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, además estudios, muestreo y análisis. En la Tabla 8 se enlistan los parámetros considerados en la caracterización inicial.

Tabla 8. Parámetros a determinar en la caracterización del suelo

Parámetros	Técnica	Descripción
Color	AS-22 Carta Munsell	Esta técnica expresa la longitud de onda dominante en la radiación reflejada (color espectral dominante). Se consideran cinco colores principales (R, rojo, Y amarillo, G verde, B, azul y P, púrpura) y cinco intermedios complementarios; YR, GY, BG, PB, RP. Para cada color se establece una graduación de color de 0 a 10.
Textura	AS-09 Hidrómetro de Bouyoucos	En este método se elimina la agregación debida a la materia orgánica y a la floculación de los cationes de calcio y magnesio, utilizando al oxalato de sodio como dispersante. El tiempo de lectura es de 40 s para la separación de las arenas y 2 horas para las partículas más pequeñas de arena y limo.

Tabla 8 (continuación). Parámetros a determinar en la caracterización del suelo

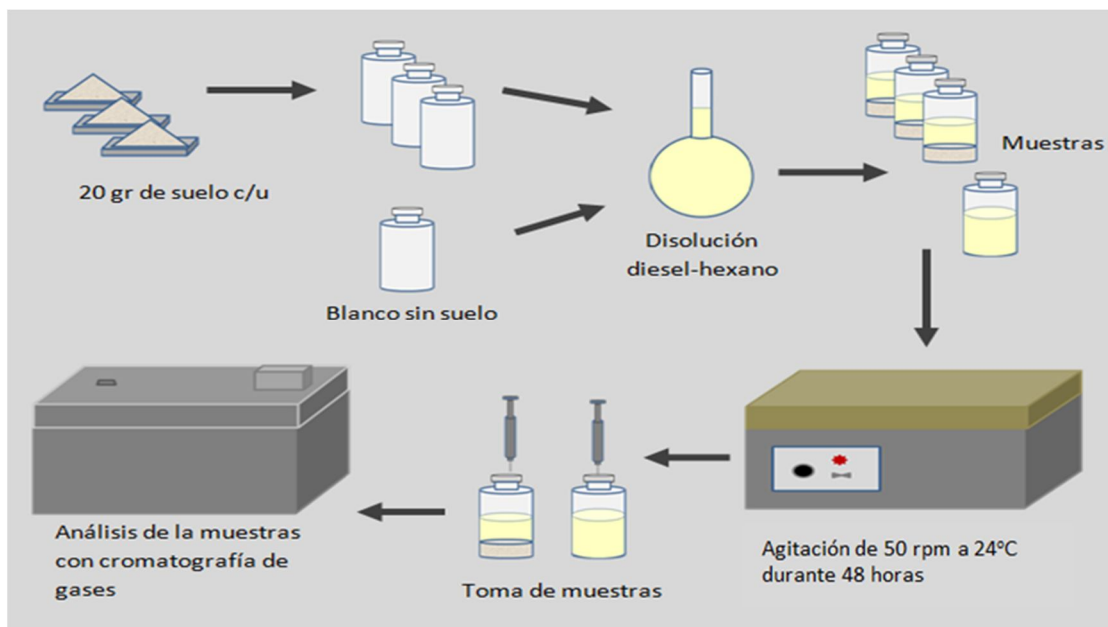
Parámetros	Técnica	Descripción
Humedad	AS-05 Gravimetría	Se determina por la diferencia de peso de una muestra de suelo seco al ambiente con el peso de esa misma muestra secado en el estufa a 105°C durante 24 h.
Capacidad de campo	Método de la columna	La capacidad de campo representa el contenido de humedad del suelo, cuando el agua que este contiene, se deja de fluir por gravedad. Cuando este fenómeno ocurre, el agua libre o gravitacional deja de existir en el suelo.
Densidad aparente	Método de la probeta	Utiliza una probeta vacía de 10 mL de peso conocido a la cual se le agrega suelo hasta llegar a la marca de los 10 mL, posteriormente se le dan 10 golpes ligeros, y se vuelve a agregar nuevamente suelo para volver a llenar nuevamente hasta la marca y se pesa la probeta llena con el suelo. Para realizar el cálculo se utiliza la siguiente fórmula: Densidad aparente = Peso del suelo seco / Volumen mg/m^3 .
Densidad real	AS-04 Picnómetro	La masa es determinada pesando directamente el suelo y midiendo el volumen de manera indirecta por el cálculo de la masa y la densidad del agua desplazado por la muestra de suelo.
Materia orgánica	AS-07 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 mezclarla con ácido sulfúrico.
Nitrógeno total	Kjeldahl	La determinación de nitrógeno total por este procedimiento involucra; la digestión de la muestra para convertir el nitrógeno a NH_4^+ y la determinación de NH_4^+ en la muestra digerida. La digestión de la muestra es desarrollada por calentamiento de la muestra con ácido sulfúrico concentrado y sustancias como el K_2SO_4 que promueven la oxidación de la materia orgánica y la conversión del nitrógeno orgánico a amonio por incremento de la temperatura de digestión.
Granulometría	Método de mallas normalizadas	Se pone una muestra conocida de suelo la cual se hace pasar por una serie de mallas de diferentes aperturas, las cuales son colocadas en orden decreciente.
Fósforo	AS-10 Olsen y colaboradores	Para determinar de fósforo disponible en suelo, este es extraído con una solución de NaHCO_3 0.5 M ajustada a un pH de 8.5, para suelos neutros, calcáreos o alcalinos, conteniendo fosfatos de calcio. Este extractante disminuye la concentración de Ca en solución a través de una precipitación del CaCO_3 , por tanto la concentración de P en solución se incrementa.

Tabla 8 (continuación). Parámetros a determinar en la caracterización del suelo

Parámetros	Técnica	Descripción
pH	AS-02 Potenciómetro	La evaluación electrométrica del pH se basa en la determinación de la actividad del ion H^+ mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensitiva al H^+ . En el caso de los suelos el pH se mide con el potenciómetro en la suspensión sobrenadante de una mezcla de relación suelo: agua 1:2. El pH de la solución de suelo se medirá en agua destilada y el intercambiable en KCl (1N).

4.1.3 Pruebas para determinar el efecto de adsorción en suelo

Con la finalidad de conocer el coeficiente de distribución de diesel en el suelo de estudio, se determinó la isoterma de adsorción del mismo. Los ensayos se realizaron colocando muestras de suelo en viales con diferentes concentraciones de diesel utilizando hexano como disolvente. Los viales se sellaron con septas de teflón y se colocaron en un agitador orbital a 50 rpm y a una temperatura constante de 24 °C durante 48 h (García, 1996; Orantes, 2002). Transcurrido este tiempo se tomaron muestras de la fase líquida para determinar la concentración resultante de diesel por medio de cromatografía de gases (Figura 5).

**Figura 5.** Esquema de trabajo para realizar las isotermas de adsorción de diesel en suelo.

Las concentraciones utilizadas para determinar la adsorción se muestran en la Tabla 9. El cálculo del diesel adsorbido en el suelo se hizo por la diferencia de la concentración final con respecto a la concentración inicial de diesel en la fase disuelta.

Tabla 9. Concentraciones utilizadas para las isotermas de adsorción del diesel

Concentración (mg/L)	Identificación de la muestra	Fase solida (g de suelo)	Fase Líquida (mL de la disolución diesel-hexano)
10 000	Blanco A	20	30
	M1A, M2A y M3A	20	30
8 000	Blanco B	20	30
	M1B, M2B y M3B	20	30
6 000	Blanco C	20	30
	M1C, M2C y M3C	20	30
4 000	Blanco D	20	30
	M1D, M2D y M3D	20	30
2 000	Blanco E	20	30
	M1E, M2E y M3E	20	30

Nota: Se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento.

4.1.4 Contaminación artificial del suelo de estudio

El suelo se contaminó agregando 80 g de diesel por kg de suelo para obtener una contaminación teórica de 80,000 mg/kg esto con la finalidad de evitar el desarrollo de microorganismos ya que Velasco y Volke (2007), mencionan que a concentraciones mayores de 50,000 mg/kg el hidrocarburo resulta tóxico para los microorganismos.

Para realizar la contaminación de suelo fue necesario aumentar el contenido de agua al 17% de su capacidad de campo (Hernández, 2010). El suelo fue extendido en una capa de 5 cm de ancho para comenzar la distribución del contaminante con un aspersor manual. Una vez distribuido el contaminante en el suelo, se mezcló para tratar de lograr una distribución homogénea. Posteriormente, se le dio un periodo de estabilización de 50 días a condiciones ambientales.

4.1.5 Determinación de las dosis de lavado

Para determinar las concentraciones del biosurfactante (Biosurf M9b) y la del surfactante comercial (Tween 80) a utilizar en la solución de lavado, se realizaron pruebas de lavado por lotes para seleccionar la dosis a utilizar basándose en el porcentaje de remoción de diesel en el suelo. Los tratamientos utilizados en estas pruebas se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Tratamientos utilizados en las pruebas preliminares de lavado

Tensoactivo	Relación	Fase solida (g de suelo)	Fase Líquida (mL)
Biosurf M9b	0.5 CMC	10	30
	CMC*	10	30
	1.5 CMC	10	30
Tween 80	0.5 CMC	10	30
	CMC**	10	30
	1.5 CMC	10	30

*CMC Biosurf M9b= 10 mg /L

**CMC Tw 80 = 64 mg/L

El tensoactivo Tween 80 fue elegido como surfactante comercial para aplicar y comparar contra el Biosurf M9b, debido a que este tensoactivo ya fue probado anteriormente mostrando buenos resultados en la remoción de diesel e hidrocarburos fracción pesada (Castillo, 2008; Climent, 2007; Torres *et al.*, 2003 a) además de su baja toxicidad y cambios fisicoquímicos que produce en el suelo (López, 2004; Torres *et al.*, 2003 b). Las concentraciones probadas (Tabla 10) son las que han mostrado buenos resultados para el Tween 80 y otros surfactantes químicos en procesos de remoción de hidrocarburos fracción pesada (Doroteo, 2010; Jurado, 2009; Castillo, 2008; Climent, 2007; Urum, *et al.*, 2004).

Las pruebas de lavado se realizaron en viales que fueron colocados en un equipo de agitación orbital durante 24 horas a 50 rpm y 24 °C. Posteriormente a la agitación se les dio un tiempo de sedimentación para separar las partículas de suelo. La solución de lavado se separó de la matriz por decantación y al suelo resultante se le dio un enjuague con agua a 50 rpm durante 1 h. Una vez sedimentada la muestra, se decantó el agua de enjuague y se procedió a procesar la muestra para determinar la concentración final de diesel por gravimetría, en esta etapa se optó por esta técnica por limitaciones de equipo.

4.1.6 Determinación de la concentración de diesel en suelo en las pruebas de lavado.

4.1.6.1 Extracción de diesel del suelo

La extracción de la fracción diesel se realizó mediante la técnica de extracción Soxhlet, método 3540C de la EPA en la NMX-AA-145-SCFI-2008 utilizando diclorometano como disolvente. Esta técnica consiste en el lavado sucesivo de una mezcla sólida con un determinado solvente, que va "lavando o extrayendo" de la mezcla a los componentes solubles en él. Por medio de esta técnica se pueden extraer componentes incluso cuando su solubilidad no es muy alta debido a efecto acumulado de las múltiples extracciones. La extracción de los hidrocarburos del petróleo por este método es útil para las fracciones de hidrocarburos de los C_6 a los C_{50} .

Para tener una óptima extracción se trituraron 5 gramos de suelo, los cuales fueron colocados dentro de un cartucho de celulosa con 5 gramos de sulfato de sodio anhidro para retener la humedad. Este cartucho se colocó dentro del compartimento del Soxhlet y en la parte inferior se colocó un matraz, del cual se conocía su peso constante, con 150 mL diclorometano grado analítico. El equipo se montó sobre una parrilla de calentamiento para hacer ebullición al diclorometano ($45\text{ }^{\circ}\text{C}$), el cual fue condensado por un refrigerante y devuelto al matraz por un sifón, una vez que alcanzó un nivel de aproximadamente 10 cm (Figura 6). Se realizaron 6 ciclos por hora y el equipo se mantuvo funcionando por 8 horas continuas. Finalmente, el matraz fue desmontado y por medio de un rotavapor el hexano se evaporó quedando únicamente el hidrocarburo removido del suelo.

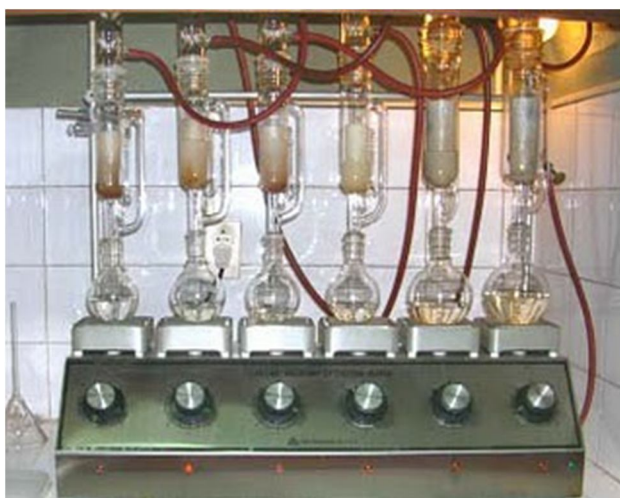


Figura 6. Equipo de extracción Soxhlet

4.1.6.2 Determinación gravimétrica

Para las pruebas de lavado se utilizó la determinación gravimétrica que permitió obtener los porcentajes de remoción de la fracción pesada o recalcitrante del diesel, la cual resulta más difícil de remover debido a que esta fracción es la que se adsorbe fácilmente al suelo. Para realizar esta determinación se utilizaron matraces llevados a peso constante manteniéndolos en el horno por 12 horas a 110 °C y una vez que el disolvente fue evaporado por medio del rotavapor se pusieron 30 minutos en un desecador a vacío para eliminarla humedad y algunos componentes de la fracción ligera que pudieran haberse quedado (Villalobos *et al.*, 2008).

El porcentaje de remoción de diesel del suelo se determinó por Ecuación 4:

$$\text{Remoción (\%)} = \frac{C_i - C_w}{C_i} \times 100 \dots \text{Ec. 4}$$

Donde:

C_i (mg/kg) = concentración inicial

C_w (mg/kg) = concentración final

4.1.7 Empacado de las columnas experimentales

Para realizar el empacado de la columna, se construyó un sistema de compactación tipo Proctor (Figura 7), con la finalidad de que todas las columnas presentaran las mismas características. El dispositivo el cual consistió de un pistón de madera dentro de una guía cilíndrica que dirige la caída del pistón las especificaciones de este prototipo se muestran en la Tabla 11. La compactación se realizó en 2 capas de suelo a las que se les aplicaran 25 golpes, a cada capa en patrón conocido Figura 8 (Head, 2006).

Tabla 11. Especificaciones del dispositivo de compactación

Componente	Material	Medidas	Peso
Pistón	Madera	13.8 cm Ø	180 g
Guía cilíndrica	PVC	15 cm	---

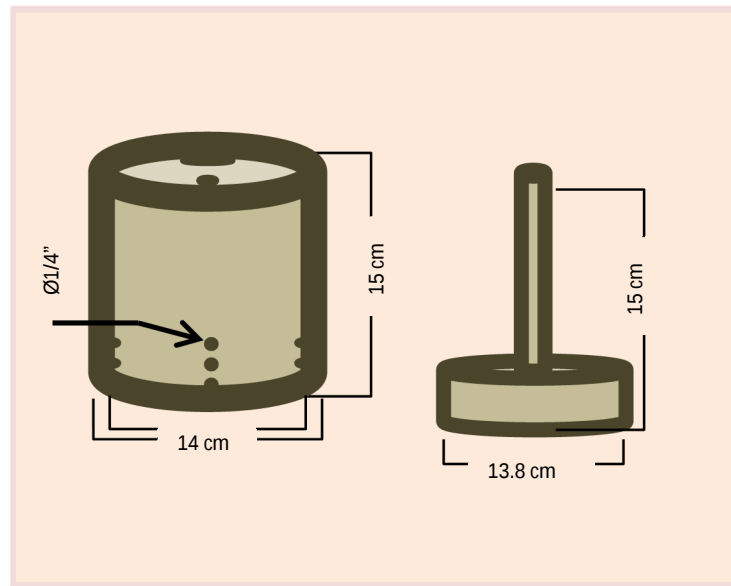


Figura 7. Dispositivo de compactación de suelo empleado para el empaqueo de las columnas experimentales

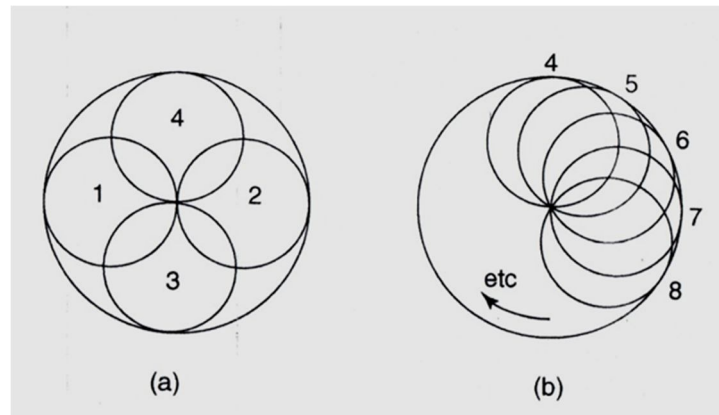


Figura 8. Patrón de la compactación del suelo en las columnas experimentales

Para el empaqueo de cada columna se colocó una capa de 150 gr de grava sílica con una granulometría mayor a 2 mm, con la finalidad de permitir el drenaje de la columna, posteriormente a cada columna se le puso 1.250 kg de suelo contaminado el cual fue compactado como se describió anteriormente, posteriormente una vez más se les agregó 1.250 kg de suelo contaminado y se procedió a compactarse, finalmente se le agregaron otros 150 g de la misma grava sílica con el objetivo de evitar la formación de canales por el flujo del agua. Una vez empaçada la columna se determinaron las propiedades físicas de porosidad y de densidad aparente.

4.1.8 Determinación de la fracción diesel por cromatografía de gases

Para realizar la determinación del diesel se utilizó un cromatógrafo de gases modelo 2014 de la marca SHIMADZU, con detector de Ionización de flama (FID). La columna utilizada fue una RTx 5 de 30 m de longitud y 0.32 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 0.25 μm . Se inyectó 1 μL del extracto proveniente del suelo contaminado, en el modo de inyección Split a una temperatura de 250 $^{\circ}\text{C}$, utilizando N_2 como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min. El horno fue programado con una rampa de temperatura inicial 50 $^{\circ}\text{C}$, por 2min, 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 240 $^{\circ}\text{C}$, 7 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 270 $^{\circ}\text{C}$ permaneciendo en esta temperatura por 8.3 min. Para realizar la integración del área solo se consideraron los carbonos del C_{14} al C_{28} ya que el C_{10} y el C_{12} ya no aparecen en nuestras muestras iniciales debido posiblemente a que se volatilizaron en el periodo de estabilización.

4.2 FASE 2: LAVADO DEL SUELO CONTAMINADO

La segunda fase consistió en la aplicación de la técnica de lavado por inundación en las columnas experimentales en donde se determinaron las concentraciones iniciales del contaminante y las concentraciones resultantes con la aplicación de los tratamientos, la determinación de la concentración de diesel se realizó por cromatografía de gases (Tabla 12).

Tabla 12. Tratamientos de la fase de lavado por inundación

Consideraciones		Observaciones		
Tratamientos	Descripción	R1	R2	R3
Testigo	Suelo sin lavar	Remoción de Diesel (%)		
Control	Suelo lavado con agua			
Tratamiento 1	Suelo lavado con Biosurf M9b			
Tratamiento 2	Suelo lavado con TW80			

Una vez determinada la dosis de surfactante a utilizar (ver sección 6.4), se realizaron 15 ciclos de lavado, en el primero se aplicaron 300 mL de solución surfactante y para los lavados consecutivos solo se requirieron 200 mL para volver a saturar las columnas. La solución de lavado se dejó en contacto durante 24 hrs con el suelo contaminado. Transcurrido este tiempo las columnas se dejaron drenar por 24 horas, incorporándole 1 litro de agua destilada como enjuague, por lo que cada ciclo de lavado duró 48 horas. Una

vez concluida la fase de lavado se determinó la concentración de diesel por medio de cromatografía de gases (sección 4.1.5) y la extracción se realizó mediante la técnica de extracción Soxhlet, método 3540C de la EPA en la NMX-AA-145-SCFI-2008 utilizando diclorometano como solvente (sección 4.1.6.1).

4.3 FASE 3: BIODEGRADACIÓN

La tercera fase consistió en un proceso de biodegradación aplicando la técnica de bioaumento, la cual reside en la adición de bacterias y nutrientes al suelo resultante del lavado en las columnas experimentales y dándole las condiciones de humedad y nutrientes que favorezcan el desarrollo de las bacterias durante un periodo de 30 días.

4.3.1 Cultivo de las bacterias degradadoras de hidrocarburos

Para realizar la adición de microorganismos degradadores de hidrocarburos en el suelo se realizaron cultivos de dichos organismos en matraces con medio mineral reducido (Tabla 13) teniendo diesel como única fuente de carbono (Atlas R. M. 1997). Los cultivos fueron incubados en una incubadora elíptica a 200 rpm con una temperatura de 32 °C Las bacterias utilizadas en el presente trabajo provienen de un consorcio de microorganismos degradadores de hidrocarburos existente en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM, el cual había sido aislado de otro suelo contaminado con diesel.

Tabla 13. Medio Bushnell-Haas

Elemento	Cantidad
H ₂ O	990 mL
Diesel	10 mL
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1g
NH ₄ NO ₃	1g
MgSO ₄ .7H ₂ O	.2 g
FeCl ₃	.05 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	.02 g

Nota: para solidificar el medio se agregan 15 g de agar-agar
pH 7.0 ± 0.2

Se realizó una curva de crecimiento para estimar en qué momento dichos cultivos tendrían una adecuada cantidad de organismos para realizar la inoculación de las columnas. El crecimiento se monitoreó por turbimetría utilizando la curva de McFarland la cual relaciona turbidez de algunos patrones de sulfato bórico con el número de bacterias en el cultivo y se prepara de acuerdo a lo mostrado en la Tabla 14.

Tabla 14. Escala de McFarland, preparación e interpretación

Clave de tubo	BaCl ₂ 1.0% (mL)	H ₂ SO ₄ 1.0% (mL)	No. aproximado de bacterias representadas X 10 ⁶ /mL
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

Las muestras fueron leídas en un Nefelometro Klett summersol modelo No. 2193437. Una vez determinados el tiempo de crecimiento se pusieron 20 matraces en las mismas condiciones de la curva con el fin de obtener la biomasa suficiente para inocular en las columnas experimentales.

4.3.2 Control de condiciones

Para la adición de nutrientes se determinó el carbono, nitrógeno y fósforo contenido posterior a la fase de lavado para determinar si existieron cambios en la concentración de los mismos, ya que una vez aplicados los tensoactivos pueden ocurrir cambios en las concentraciones iniciales de nutrientes ya sea por aporte y/o arrastre (López e Iturbe 2004). Para la adición de los nutrientes se consideró una relación de C: N: P de 100: 10: 1. Al realizar el cálculo de la relación de nutrientes necesarios, se tomó en cuenta a la materia orgánica determinada como el 100% y el nitrógeno y fósforo se igualaron utilizando el fertilizante Nitrofoska Azul 12-12-17-2 que contiene nitrógeno y fósforo al 12% (ver anexo IV).

Para asegurar que el contenido de oxígeno en el suelo fuera el adecuado para realizar la biodegradación, el suelo fue aireado diariamente (una vez por la mañana y otra por la tarde) y se controló el contenido de agua de manera que este se mantuviera por lo menos al 30%, Corona (2004), Volke y Velasco (2007), recomiendan que sea al 30% sin embargo debido a las condiciones de evapotranspiración de nuestro suelo se llevó al 40% para evitar la pérdida mínima de humedad recomendada.

4.3.3 Inoculación de microorganismos en el suelo proveniente del lavado

Una vez que se determinó la suficiente biomasa bacteriana, se uniformizó el cultivo y se procedió a inocular 200 mL del mismo a cada una de las columnas destinadas para esta fase de la experimentación. La inoculación se realizó vaciando de forma directa del medio mineral líquido que contiene a los microorganismos tratando de hacer una mezcla homogénea con el suelo. Con la finalidad de estimar el número de microorganismos que están siendo inoculados, se tomaron alícuotas de 1 mL de este cultivo para realizar una cuenta en placa.

4.3.4 Monitoreo de la fase de biodegradación

4.3.4.1 Conteo de unidades formadoras de colonias

Una vez inoculadas las bacterias se esperó un periodo de 48 horas para realizar el primer conteo de bacterias en las columnas. De una muestra de 1 g de suelo contaminado se transfirieron los microorganismos a 9 mL solución salina isotónica estéril a temperatura ambiente obteniendo una suspensión homogénea utilizando un homogeneizador peristáltico (vortex). Una vez que la muestra se sedimenta se hacen diluciones con alícuotas de 1 mL en 9 mL de solución isotónica (diluciones seriadas) las cuales fueron sembradas en el medio mineral sólido conteniendo 50 µL de diesel como única fuente de carbono y se dejaron incubando durante cinco días a 35 °C (Ruíz, 2002). La cuenta de microorganismos se realizó por la técnica de gota de Miles y Misra modificada, en el cual con un marcador se divide la parte exterior en seis sectores (Ramírez *et al.*, 2008) y para cada sector se toma una gota de 10 µL con una asa calibrada y se extiende por todo el segmento y se cuentan las unidades formadoras de colonias (UFC).

El número de bacterias de la muestra se calcula con la Ecuación 5:

$$\text{No. de bacterias/g} = \frac{N \times f}{V} \dots\dots\dots \text{Ec. 5}$$

Donde:

N= No. promedio de colonias

f= inverso del factor de dilución

V= volumen de la gota

Nota: También se monitoreo a las UFC por este mismo método de cuenta en placa a los 20 y 40 días.

4.3.4.1 Respirimetría basal del suelo

Se dio seguimiento a la actividad metabólica bacteriana por medio de pruebas de respirometría basal de suelo siguiendo el método de trampas de NAOH en recipientes cerrados (García *et al.*, 2003). Esta medida de respiración microbiana consiste fundamentalmente en la medida de la cantidad de CO₂ desprendido o del O₂ consumido por los microorganismos del suelo en un determinado periodo de tiempo (García *et al.*, 2003). Los monitoreos se realizaron a las 48 horas, después al día 15 y 30 de haber iniciado la bioestimulación en las columnas.

4.3.5 Determinación del porcentaje de remoción de diesel

Una vez transcurrido el periodo de 30 días, se determinó la concentración final de diesel por medio de cromatografía de gases (sección 4.1.5) y la extracción se realizó mediante la técnica de extracción Soxhlet, método 3540C de la EPA en la NMX-AA-145-SCFI-2008 utilizando diclorometano como solvente (sección 4.1.6.1). El cálculo se realizó según lo establecido en la ecuación 4:

$$\text{Remoción (\%)} = \frac{C_i - C_w}{C_i} \times 100 \dots\dots \text{Ec. 6 (sección 4.1.7.2).}$$

4.4 IDENTIFICACIÓN DE EFECTOS TÓXICOS EN PLANTAS

La fitotoxicidad en el suelo se evaluó obteniendo el índice de germinación el cual involucra el número de semillas germinadas y la elongación de la raíz (USEPA 1996), para cada uno de los tratamientos provenientes de la fase de lavado y de los tratamientos provenientes de la biodegradación, ver Tabla 15. Para cada muestra se colocaron 50 g de suelo en una caja de Petri, el suelo fue saturado con agua destilada y sobre de él, se colocó un papel filtro y se depositaron 20 semillas. Las cajas se incubaron durante 120 horas a 25 °C en ausencia de luz. Se hizo lo mismo para los controles. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se contaron las semillas germinadas y se midió la longitud de la raíz (Figura 9) para crear el índice de germinación mostrada en la Ecuación 6:

$$IG = \frac{(Gs \times Ls1)}{(Gc \times Lc)} \dots \dots \dots \text{Ec. 7}$$

Dónde:

GI =Índice de germinación,

Gs = No. de semillas germinadas,

Ls = La longitud de la raíz y

Lc =son los valores obtenidos en el control.

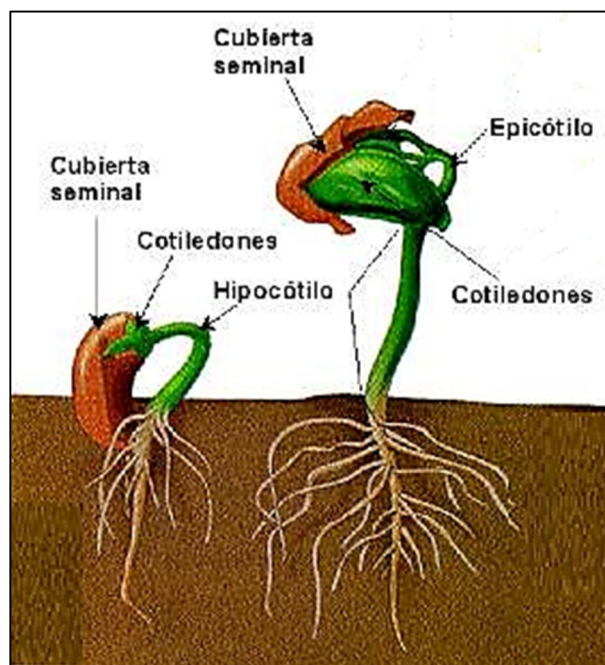


Figura 9. Plántula de lechuga

El porcentaje de inhibición de la longitud de la raíz (ILR), se calcula de acuerdo a la Ecuación 7:

$$\% \text{ ILR} = (1 - IG) \times 100 \dots \dots \dots \text{Ec. 8}$$

Tabla 15. Tratamiento para las pruebas de fito-toxicidad.

Denominación	Descripción
Muestras control	
Testigo	Suelo limpio
Pruebas después del tratamiento de lavado	
SLB	Suelo lavado con Biosurf M9b
SLT	Suelo lavado con TW 80
SLA	Suelo lavado con agua
Pruebas después de la biodegradación	
SSL	Suelo sin lavar inoculado con bacterias
SSLSB	Suelo sin lavar sin inocular bacterias
SLBB	Suelo lavado con Biosurf M9b e inoculado con bacterias
SLBSB	Suelo lavado con Biosurf M9b sin inoculación de bacterias
SLTWB	Suelo lavado con TW 80 inoculado con bacterias
SLTWSB	Suelo lavado con TW 80 sin inoculación de bacterias

4.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación fueron empacadas 21 columnas; 6 de las cuales fueron tratadas con el biosurfactante (Biosurf M9b) con la dosis determinada en las pruebas de lavado, 6 más fueron lavadas con Tween 80 (Tw 80), 6 fueron el control y las ultimas 3 fueron lavadas con H₂O. En los tratamientos de lavado y el control se pusieron 6 columnas debido a que en la fase de biorremediación 3 de cada 6 fueron inoculadas y solo así podríamos tener las tres replicas para cada tratamiento (en esta última fase no se consideró al suelo lavado con agua).

Una vez efectuados los tratamientos de lavado se realizó un análisis de varianza (o ANOVA, Analysis of variance por sus siglas en inglés) Este análisis de varianza establece que la variabilidad total en los datos, medida por la suma de cuadrados total, puede ser dividida en una suma de cuadrados de la diferencia entre los promedios de los tratamientos y el gran promedio total más una suma de cuadrados de la diferencia de las observaciones entre tratamientos del promedio del tratamiento.

Presunciones del ANOVA:

- ✓ Los errores o residuales son independientes y distribuidos de manera normal o gaussiana.

- ✓ ANOVA presume que todas las varianzas de los niveles del factor son iguales.

El ANOVA compara los promedios de cada nivel contra el promedio general y entre tratamientos. En este análisis queda con dos estimados de varianza, dentro y entre los niveles; con estos se determina un cociente, si las 2 varianzas se parecen, es decir, el cociente es aproximadamente 1, entonces se concluye que el factor no es significativo, por el contrario si es menor a 0.05 si es significativo.

Para ilustrar se presenta a continuación un ejemplo teniendo en cuenta un solo factor aleatorio (Tabla 16):

Tabla 16. Datos típicos para un experimento de factor simple

	Observaciones (no de réplicas)					
Niveles del factor	1	2	...	n	Totales Y_i	Promedio $\bar{Y}_i$
1	Y_{11}	Y_{12}	...	Y_{1n}	$Y_{11}+Y_{12}+...Y_{1n}$	$\bar{Y}_1$
2	Y_{21}	Y_{22}	...	Y_{2n}	$Y_{21}+Y_{22}+...Y_{2n}$	$\bar{Y}_2$
...	...	...	...	...	...	...
a	Y_{1a}	Y_{2a}	...	Y_{an}	$Y_{1a}+Y_{2a}+...Y_{an}$	$\bar{Y}_a$
Totales					$Y_{...}$	$\bar{Y}_{...}$

A partir de la anterior tabla, se presenta la forma manual de hacer ANOVA con el fin de entender el concepto que maneja el análisis de varianza. Inicialmente se debe calcular la suma de cuadrados de los tratamientos ver Ecuación 8:

$$SS_{\text{Tratamientos}} = \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^a \frac{1}{n} Y_i^2 \right) - \frac{Y^2}{N} \dots \dots \dots \text{Ec. 9 Fuente de variación entre tratamientos}$$

Donde:

n = Número de tratamientos por cada nivel

N = Número de tratamientos en total

i = 1, 2, 3... a

Luego se debe calcular la suma de cuadrados total, ver Ecuación 9:

$$SS_{\text{Total}} = \left(\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 \right) - \frac{Y_{..}^2}{N} \quad \text{..... Ec. 10}$$

Donde:

N = Número de tratamientos en total

i = 1, 2, 3... a

j = 1, 2, 3...n

Para estimar la suma de cuadrados de los errores se hace la diferencia de la suma de cuadrados total y la suma de cuadrados de los tratamientos, Ecución 10:

$$SS_E = SS_{\text{Total}} - SS_{\text{Tratamientos}} \quad \text{.....Ec. 11 Fuente de variación dentro de los tratamientos}$$

La tabla de datos final resultante del análisis se observa en la tabla 17

Tabla 17.Tabla del análisis de ANOVA

ANOVA				
Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	Estadístico de la prueba F
Tratamientos	SS tratamientos	a-1	$SS_{\text{tratamientos}}$	$\frac{MS_{\text{tratamientos}}}{MS_{\text{error}}}$
Error	SS error	N-a	$\frac{SS_{\text{error}}}{N-a}$	
Total	SS total	N-1		

Para la fase de lavado se compararon los índices de remoción finales para cada uno de los tratamientos (Figura10).

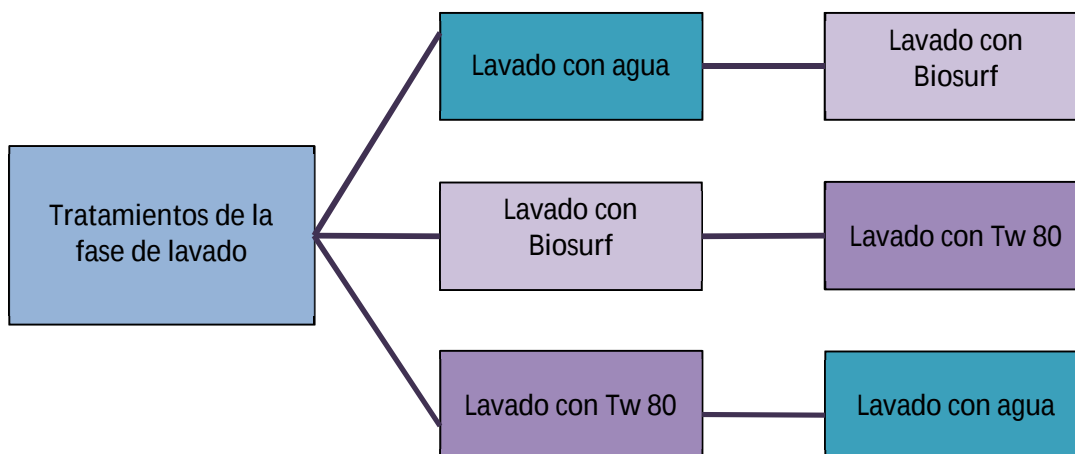


Figura 10. Tratamientos a comparar en la fase de lavado

Para el análisis de la biodegradación se realizó un diseño experimental, con arreglo factorial de tratamientos 2 x 3, Tabla 16, donde los factores fueron el suelo que proviene de los tratamientos de lavado con y sin inoculación de bacterias, y los controles con y sin inoculación (tres repeticiones por tratamiento). Se hizo un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados.

Tabla 18. Tratamiento de la fase de biodegradación por bioaumento

Tratamientos		Factores A		
		Suelo sin lavar Control	Suelo lavado con Biosurf M9b	Suelo lavado con TW 80
Factores B	Con bacterias	Remoción de diesel (%)		
	Sin bacterias			

Para las pruebas de fito-toxicidad se aplicó una prueba de ANOVA para los índices de inhibición de la elongación de la raíz (ILR) de todos los tratamientos, los cuales se enlistan en la Figura 11.

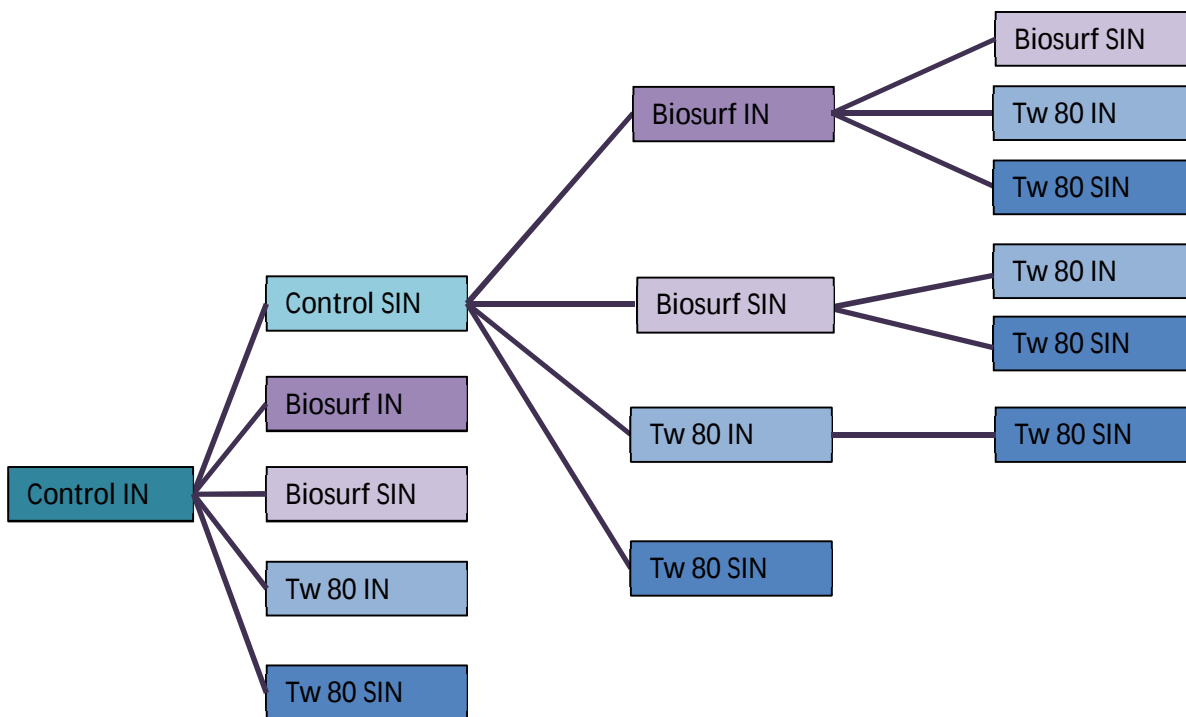


Figura 11. Tratamientos de fito-toxicidad a comparar

Para realizar el análisis estadístico se ocupó la herramienta complementaria de análisis de datos del programa Excel versión 2010.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 CONFORMACIÓN DEL SUELO ARTIFICIAL

La conformación del suelo artificial (Figura 12) se hizo de acuerdo a lo establecido en el punto 4.1.1 de la metodología, para lo cual se prepararon aproximadamente 85 kg de suelo artificial.



Figura 12. Conformación del suelo artificial

5.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL SUELO

La determinación de los parámetros fisicoquímicos fue realizada de acuerdo con las metodologías establecidas en el punto 4.1.2, los resultados se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19. Parámetros fisicoquímicos medidos en el suelo

Parámetro	Suelo natural	Suelo conformado
Color	10YR2/3 (en seco), 10YR4/4 (en húmedo)	10RY 8/1 (en seco) 10YE 6/2 (en húmedo)
Textura	Arena (arena 85.70%, limo 4.55% y arcilla 9.75%)	Arena (arena 87.92%, limo 3.03% y arcilla 9.08%)**
Densidad real	2.71 g/cm ³ *	2.71 gr/cm ³ **
Contenido de agua	24.9%*	41.5%
Capacidad de retención de agua	22.5% *	28.5%
Densidad aparente	1.15 g/cm ³ *	1.53g/cm ³ **
Porosidad	57.6% *	43.5%**
pH a 25 °C (en agua)	5.98 *	6.8*
Carbono orgánico	3.38% *	4.3%**
Materia orgánica	5.82% *	7.47%**
Nitrógeno total	2,600 mg/kg *	118.4 mg/kg**
Fósforo disponible	3.01 mg/kg *	3.34 mg/kg*

*Valores promedio de 2 réplicas. La Diferencia Porcentual Relativa (DPR) fue menor al 5%

** Valores promedio de 3 réplicas. La diferencia Porcentual Relativa (DPR) fue menor al 5%.

El suelo artificial presentó grandes similitudes con el suelo de referencia contando con una densidad real idéntica y una densidad aparente muy similar (Tabla 19). El suelo obtenido fue de textura arenosa y granulometría gruesa (Figura 13, ver valores en la tabla A1.1 del anexo I) la cual es recomendable para emplear la técnica de lavado "*in situ*" como la que se utilizó en la presente investigación (Lee *et al.*, 2002; Badillo y Rodríguez 1963).

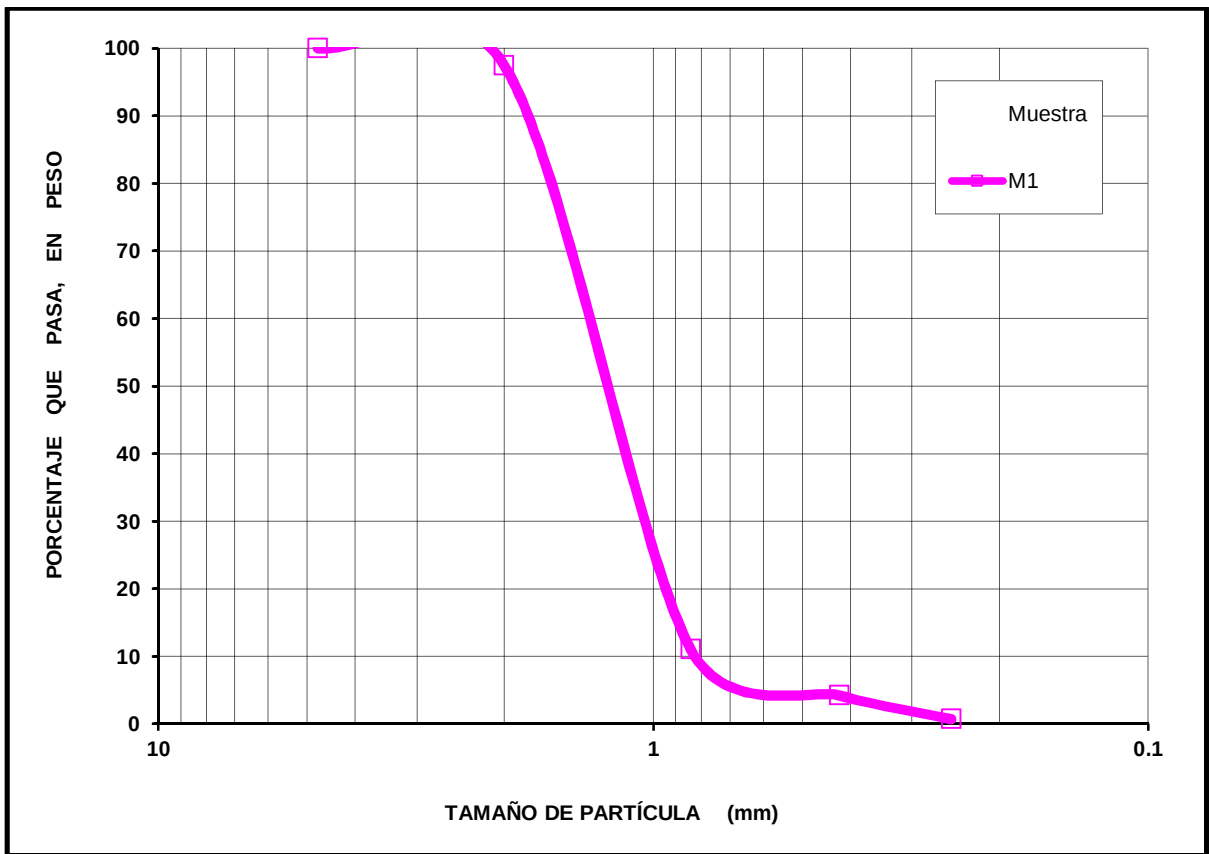


Figura 13. Granulometría del suelo conformado artificialmente

5.3 ISOTERMAS DE ADSORCIÓN

Los resultados obtenidos de la adsorción de diesel se calcularon por lo establecido en la Ecuación 11, los valores de diesel adsorbido en el suelo de estudio se observan en la Tabla 20.

$$C_s = (C_0 - C_e) \dots\dots\dots \text{Ec. 12}$$

Donde:

C_s = Concentración de diesel adsorbido

C_0 = Concentración de diesel inicial

C_e = concentración de diesel en equilibrio

Tabla 20. Resultados de adsorción de diesel en suelo de estudio

Co (mg/L)	Ce (mg/L)	DESVEST	Cs(mg/L)*	Volumen (L)	Masa (g)
4,030.81	422.80*	± 1.22	281.41	0.03	20
2,695.81	1288.27*	±9.89	953.07		
2,650.98	2046.73*	±2.53	1398.14		
1,671.42	792.34*	±8.69	527.54*		
671.48	285.83*	±5.99	190.84		

Media aritmética de 3 muestras con un % menor al 3%

Los resultados obtenidos se ajustaron al modelo lineal y al comprobar que efectivamente cumple con la linealización (Figura 14) se procedió a aplicar los modelos lineales de Freundlich (Figura 14) y Langmuir (Figura 16).

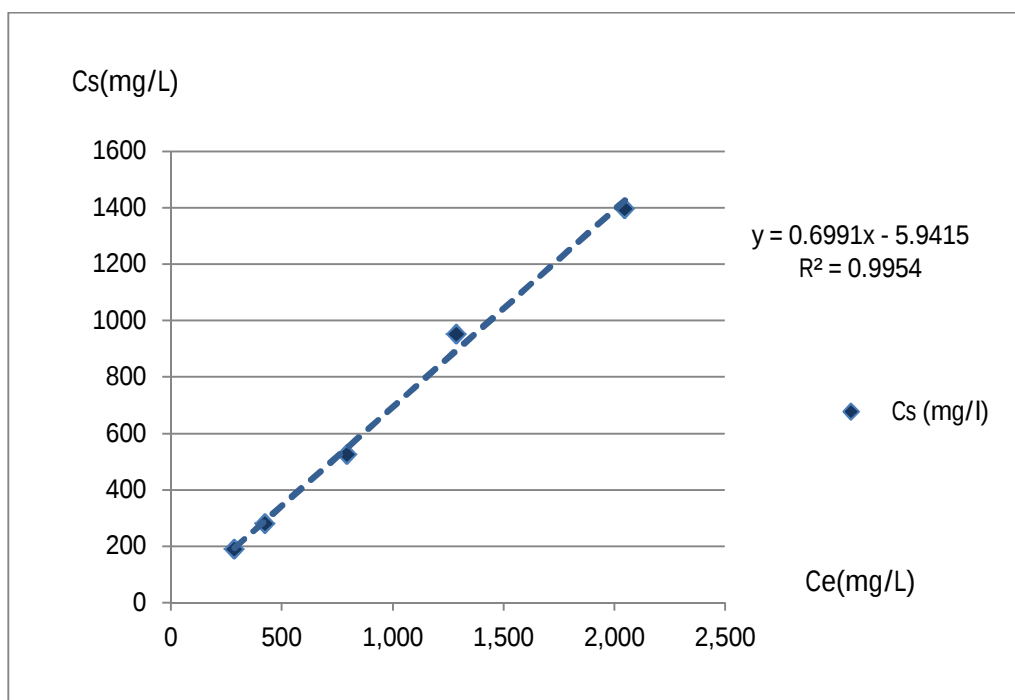


Figura 14. Isoterma lineal de diesel adsorbido en el suelo de estudio

La ecuación del modelo de Freudlich se muestra en la Ecuación 12:

$$Cs = K_d \cdot Ce^N \dots\dots\dots \text{Ec. 13}$$

Aplicando logaritmos para hacer lineal el modelo se la Ecuación 13:

$$\log C_s = \log K_d + N \log C_e \dots\dots Ec. 14$$

Los valores para el modelo de Freundlich se observan en la Tabla 21:

Tabla 21. Valores para graficar la isoterma de Freundlich

Ce (mg/L)	Cs (mg/l)	1/Cs	1/Ce
422.802	281.415	0.0035	0.0024
1288.268	953.069	0.0010	0.0008
2046.726	1398.141	0.0007	0.0005
792.336	527.542	0.0019	0.0013
285.829	190.841	0.0052	0.0035

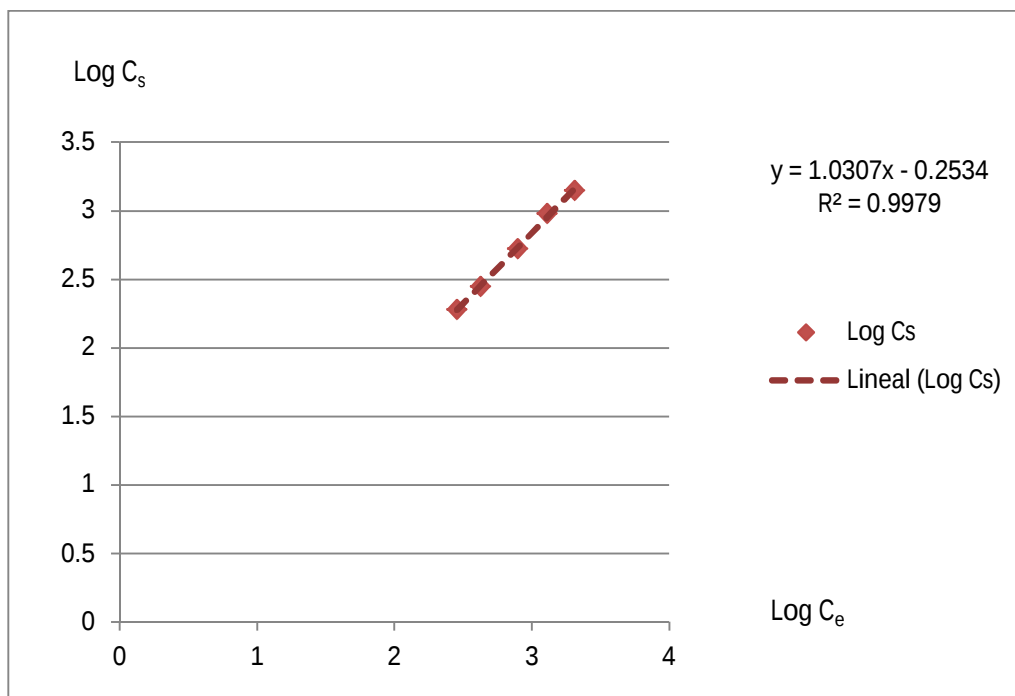


Figura 15. Isotherma de Freundlich de la adsorción de diesel en el suelo de estudio

Ecuación del modelo de Langmuir, Ecuación 14:

$$C_s = qm \frac{bC_e}{1+bC_e} \dots\dots\dots \text{Ec. 15}$$

Donde:

qm es la capacidad máxima de adsorción

La linealización de la ecuación general de la isoterma de Langmuir se observa en la Ecuación 15:

$$\frac{1}{C_s} = \frac{1}{qmb} \frac{1}{C_e} + \frac{1}{qm} \dots\dots\dots \text{Ec. 16}$$

Los valores para el modelo de Langmuir se observan en la Tabla 22

Tabla 22. Valores para graficar la isoterma de Langmuir

Ce (mg/L)	Cs (mg/l)	Log Ce	Log Cs
422.802	281.415	2.626	2.449
1288.268	953.069	3.110	2.979
2046.726	1398.141	3.311	3.146
792.3368	527.542	2.898	2.722
285.830	190.841	2.456	2.281

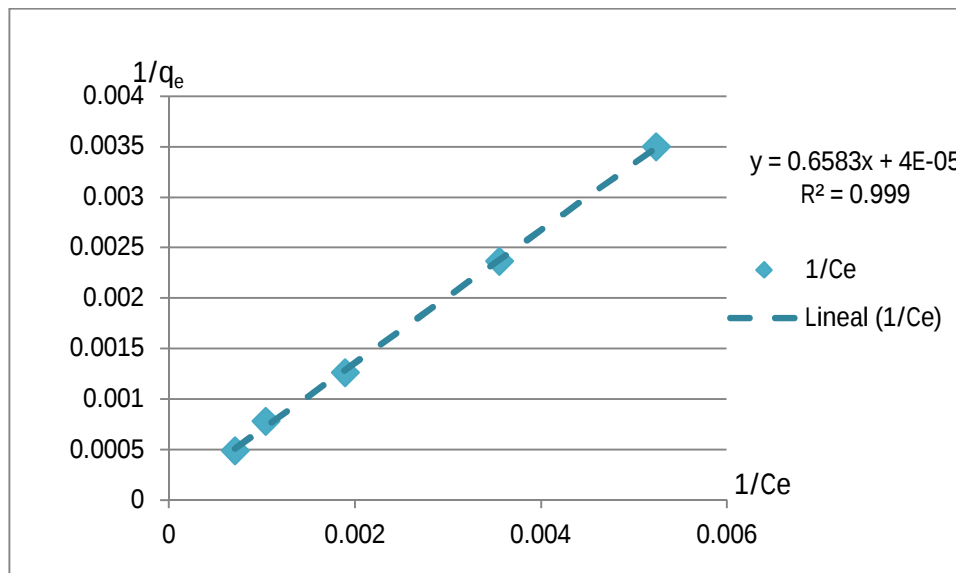


Figura 16. Isotherma de Langmuir de la adsorción de diesel en el suelo de estudio

Con el modelo de Langmuir se obtuvo un coeficiente de correlación lineal del 0.999, (Figura 16) siendo este modelo el que mejor se ajusta coincidiendo con lo reportado en la bibliografía (Cardona e Iturbe, 2003).

Sustituyendo el valor de b de la ecuación 11 por el valor de la ecuación de la recta correspondiente a b se puede obtener la q_m o capacidad máxima de adsorción como se muestra en la ecuación 16:

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m b} \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_m}$$

$$Y = mx + b \dots\dots\dots \text{Ec. 17}$$

Por lo tanto la capacidad máxima de adsorción se puede calcular de la siguiente manera:

$$b = \frac{1}{q_m} \rightarrow 4 \times 10^{-5} = \frac{1}{q_m} \rightarrow q_m = \frac{1}{4 \times 10^{-5}}$$

Por lo cual $q_m = 25000 \mu\text{g}$ de diesel /g de suelo

ó 25 mg de diesel/g de suelo

5.4 DETERMINACIÓN DE DOSIS DE LAVADO

Como ya se mencionó en la sección 4.1.5 se probaron tres diferentes dosis de los tensoactivos, con base en la concentración micelar crítica (CMC). La contaminación inicial del suelo fue de 48,947 mg/kg de diesel. Una vez aplicadas las diferentes soluciones de lavado se determinó que la solución de lavado del surfactante de origen químico Tween 80 que igualaba a su CMC fue la que más diesel removió logrando reducir a concentración de diesel a 17,147 mg/kg, una reducción del 64.97%, con un solo ciclo. Por otro lado el Biosurf M9b a la mitad de su CMC se logró reducir esta concentración hasta 17,807 (63.62% de remoción). Los resultados del diesel residual para cada uno de los tratamientos se muestran en la Figura 17 (ver valores en la tabla A1.2 del anexo I) y Figura 18 se observan los porcentajes de remoción logrado por las diferentes dosis probadas (ver valores en la gráfica A1.3 del anexo I).

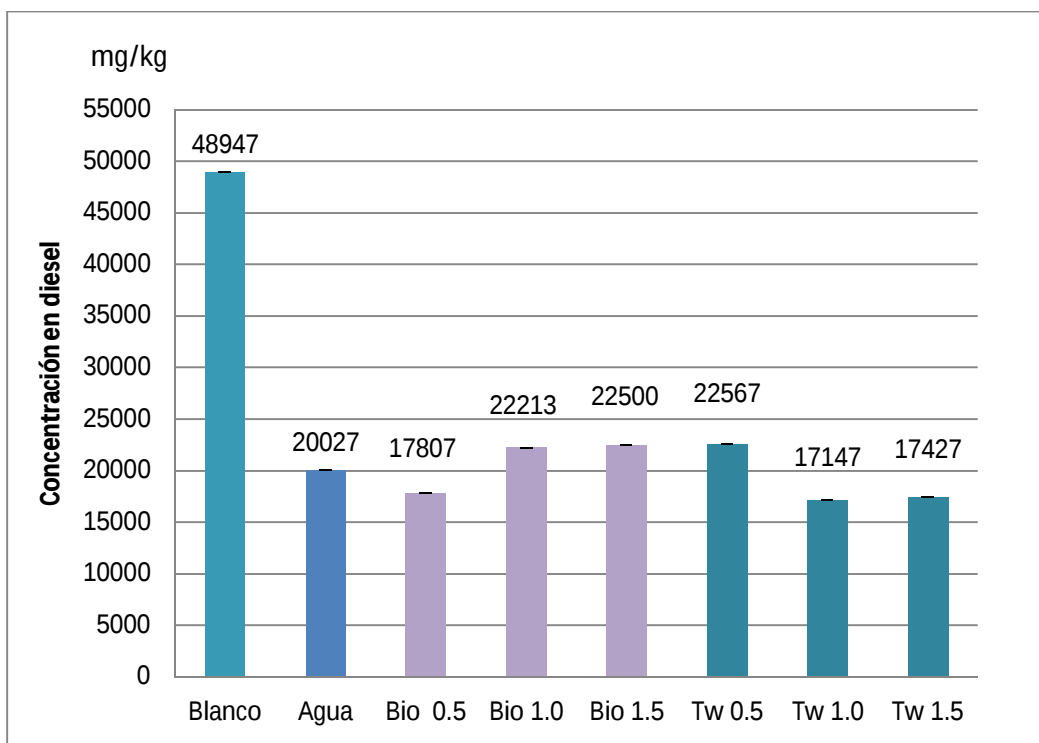


Figura 17. Concentraciones resultantes de diesel en la pruebas de lavado. Biosurf M9b (Bio) a 0.5, 1 y 1.5 de su CMC, Tween 80 (Tw) a 0.5, 1 y 1.5 de su CMC

En la Figura 18 se aprecia claramente que en lo que respecta al Biosurf M9b la solución que presentó la mejor remoción del diesel fue la de 0.5% de su concentración micelar crítica, por lo que fue ésta la que se eligió para aplicar al lavado de suelo en las columnas experimentales. Debido a que se trató de una dosis que está por debajo de la concentración micelar crítica el proceso de remoción que se presentó fue el conocido como movilización, en el cual se forman numerosos monómeros que incrementan el ángulo de contacto entre el suelo y el contaminante hidrofóbico lo que promovió la separación del contaminante de las partículas de suelo. (Kuyukina *et al.*, 2005). Con respecto al surfactante químico Tween 80 la mejor respuesta se obtuvo en la solución de lavado que iguala a la CMC removiendo el 64.9% del total del contaminante en un solo ciclo por lo que ésta fue la que se empleó para el tratamiento en las columnas experimentales.

Cabe mencionar que debido a limitaciones técnicas el análisis de diesel en las pruebas de lavado se realizó de forma gravimétrica, por lo que estas remociones solo se refieren a la parte recalcitrante del diesel que es la fracción que persiste por más tiempo en el

ecosistema (Volke y Velasco, 2002). De estos resultados se concluyó que los porcentajes de remoción entre el Tween 80 y Biosurf M9b estadísticamente iguales ($p>0.05$).

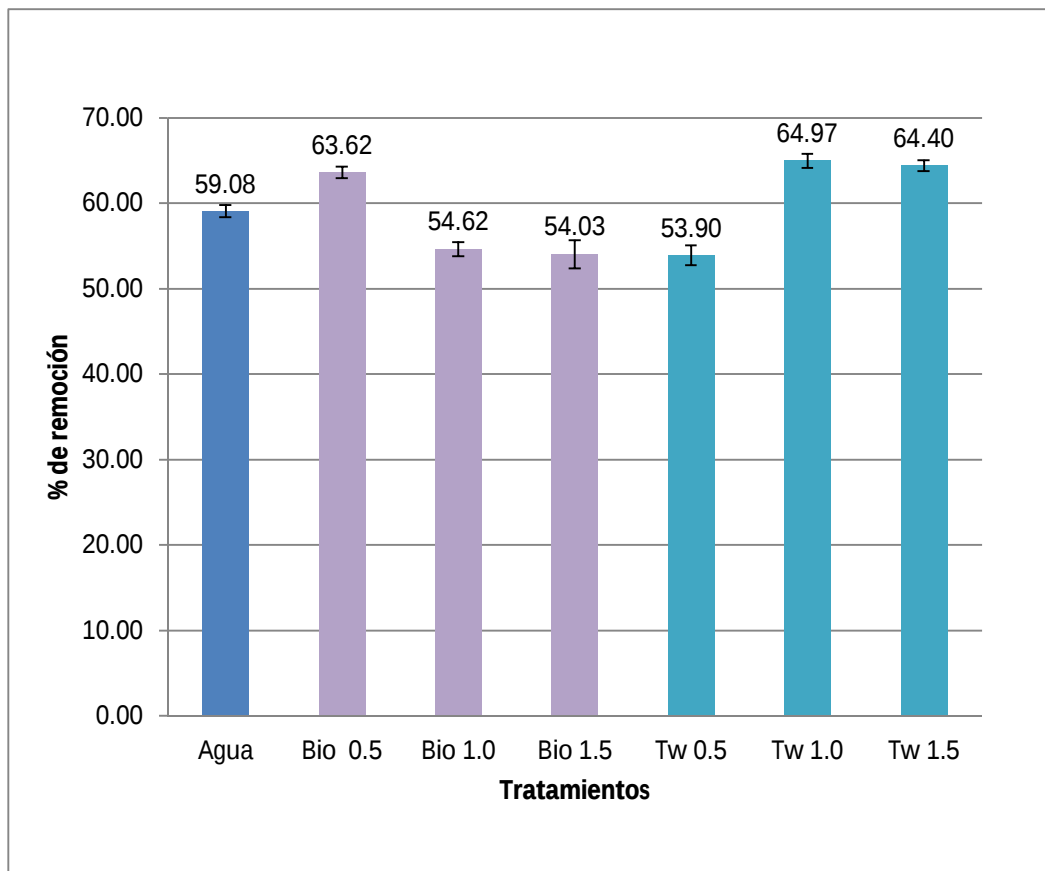


Figura 18. Porcentaje de remoción de las diferentes dosis empleadas

5.5 CONTAMINACIÓN ARTIFICIAL DEL SUELO DE ESTUDIO

Una vez conformado el suelo se procedió a obtener una muestra para determinar sus parámetros fisicoquímicos, el resto se llevó al 20% de su capacidad de campo y se procedió a contaminarlo por medio de atomizadores (Sección 4.1.4). Para determinar la concentración inicial de diesel en el suelo de estudio se hicieron muestras compuestas con las que se empacaron diferentes columnas (Tabla 23), la concentración final de diesel se realizó por cromatografía de gases (los parámetros para realizar la curva patrón se muestra en el anexo II).

Tabla 23. Concentraciones de diesel al inicio de los tratamientos

Denominación	Columnas empacadas con la muestra	Concentración de diesel (ppm)
Agua	1,2,3	85204.257
Biosurf	4, 9, 10, 13, 16, y 21	86609.779
Tw 80	6, 7, 12, 15, 19 y 20	87650.733
Control	5, 8, 11, 14, 17 y 18	85521.704

5.6 EMPACADO DE LAS COLUMNAS EXPERIMENTALES

El empacado de las columnas experimentales se realizó según lo descrito en el apartado 4.1.7 (Figura 19). Las especificaciones del empaque se pueden observar en la Tabla 24.



Figura 19. Columnas experimentales empacadas con el suelo contaminado con diesel

Tabla 24. Especificaciones resultantes del sistema de empaque de las columnas

Masa (kg)	Densidad aparente	Porosidad	Agua para saturación del sistema
2.5 kg	2.30 g/kg	15.12%	300 mL en el primer ciclo 200 mL en los ciclos consecutivos

5.7 FASE 2: LAVADO

5.7.1 Concentración de diesel después del lavado

Después de los 15 lavados fue posible evaluar que el tensoactivo Tween 80, en una dosis que iguala a su CMC (64 mg/L) fue el tratamiento que obtuvo la mayor remoción, eliminado el 5.33% del diesel contenido inicialmente utilizando solo 3 litros de solución de lavado y 15 litros de agua de enjuague (Figura 20, ver valores en la tabla A1.3 en el anexo I). El surfactante de *Pseudomonas koreensis* obtuvo un porcentaje de remoción de 4.06% con las mismas cantidades de agua y solución de lavado, solo que para ésta se utilizó 0.5% de la CMC (5 mg/L), estos tratamientos no presentaron diferencias significativas en el porcentaje de remoción ($p=0.14$).

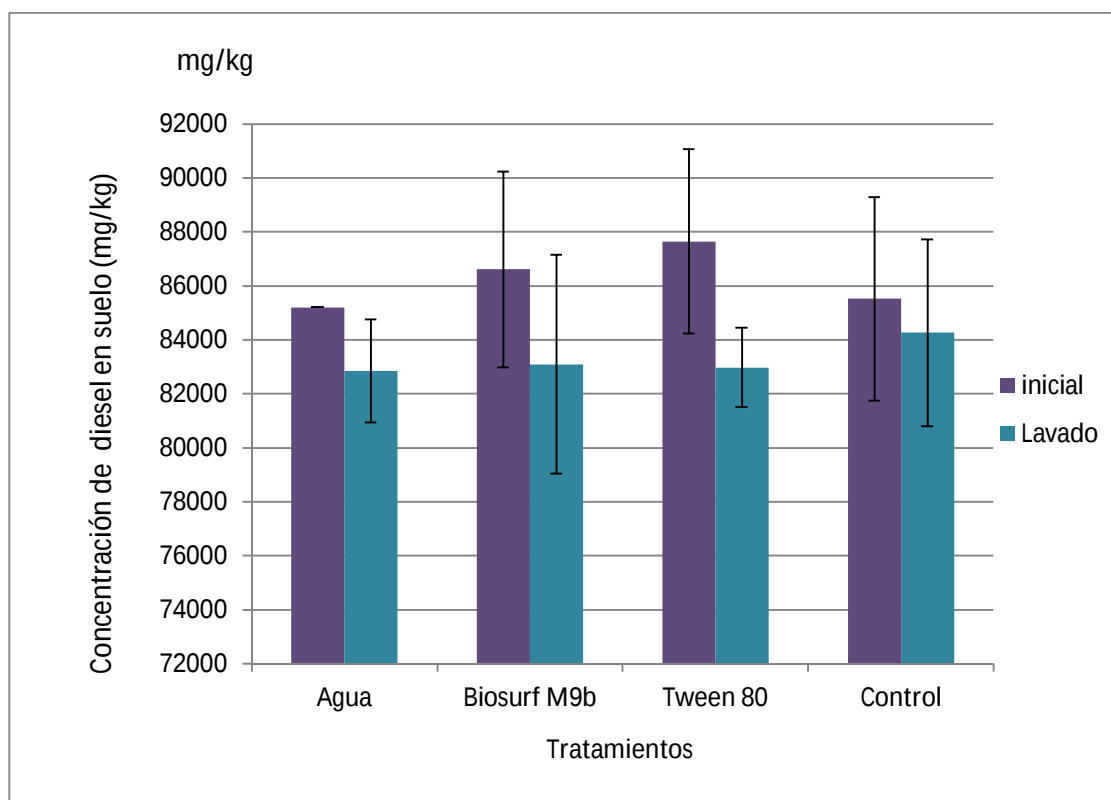


Figura 20. Concentraciones resultantes de la fase de lavado

En lo que respecta al agua solo tuvo una capacidad de remover el 2.77% del contaminante durante el mismo periodo y por volatilización solo se perdió el 1.59% aunque según la prueba estadística ANOVA los tratamientos no presentaron diferencias significativas

durante este periodo ($p=0.92$). En la Tabla 25 Diferencias estadísticas entre los tratamientos de la fase de lavado.

Tabla 25 Diferencias estadísticas entre los tratamientos de la fase de lavado

Fase	Muestra1	Muestra 2	Probabilidad	Diferencia
Lavado	Control	Agua	0.927	No
	Control	Biosurf	0.635	No
	Control	Tw 80	0.230	No
	Agua	Biosurf	0.930	No
	Agua	Tw 80	0.389	No
	Biosurf	Tw 80	0.146	No

Una vez obtenidos los resultados de remoción se procedió a calcular las cinéticas de cada tratamiento de lavado (Tabla 26, ver valores en tabla A.1.4 del Anexo I). Para ello se utilizó un modelo de primer orden, Ecuación 17, ya que se ha demostrado que éste es el que mejor se ajusta a este tipo de fenómenos (Khalladi, *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2005).

$$Y_f = Y_i e^{(kt)} \dots\dots\dots \text{Ec.18}$$

En donde:

Y_f = Concentración final

Y_i = Concentración inicial

e = Función exponencial

k = Constante de remoción

t = Tiempo

Tabla 26. Cinética de remoción de los diferentes tratamientos de lavado

Tratamiento	K (t)	R ² *
Agua	-0.0010	0.999
Biosurf	-0.0014	0.999
Tw 80	-0.0020	0.999

*ver gráfico y regresión lineal en el grafico A1.1 del anexo 1

Una vez calculadas la K podemos calcular, por medio de la Ecuación 18 el tiempo necesario para obtener el 50% de remoción (Tabla 27) para cada uno de los tratamientos por medio de la fórmula:

$$t = \frac{(\ln \frac{Y_i}{Y_f})}{k} \dots\dots\dots \text{Ec. 19}$$

Tabla 27. Estimación para la remoción del 50% de hidrocarburos fracción diesel

Tratamiento	Concentración inicial	Concentración final	Ciclos de lavado	Tiempo en días	Solución de lavado	Agua de enjuague (L)
Agua	85204.257	42602.129	345.43	690.86	69.09	345.43
Biosurf	86609.779	43304.890	233.72	467.44	46.74	233.72
Tw 80	87650.73	43825.366	176.93	353.85	35.39	176.93

De acuerdo a los datos obtenidos en las pruebas realizadas para determinar la dosis de los tensoactivos con el 1% CMC del Tw 80 fue posible remover 64.69 % de la fracción diesel y con el Biosurf M9b al 0.5% de su CMC se pudo remover el 63.63% de diesel mientras que con la técnica de lavado por inundación los porcentajes de remoción se reducen, esto se debe en gran medida a que en las técnicas de lavado con agitación promueve mejor el contacto de la solución de lavado con el contaminante. Leyva (2006), observó que el lavado por inundación presentó eficiencias muy bajas con respecto a las de un lavado mecánico.

Las pruebas de lavado por inundación el Tw 80 resultó ser el que más diesel removió seguido por el Biosurf M9b, aunque estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas por lo que ambos tratamientos resultan ser igualmente recomendables, pero la aplicación del Biosurf M9b nos confiere la ventaja de utilizar una menor cantidad de tensoactivo en las soluciones de lavado.

La forma de calcular la capacidad de remoción del tensoactivo se describe en la Ecuación 19:

$$\text{Capacidad de remoción} = \frac{\text{g de hidrocarburo removidos}}{\text{g de surfactante utilizado}} \dots\dots\dots \text{Ec. 20}$$

Calculando la capacidad de remoción de diesel por gramo de surfactante empleado (Torres *et al.*, 2005c), se determinó que el Biosurf resultó ser más eficiente que el Tween

80 ya que cada gramo de Biosurf M9b removió 210 g más de hidrocarburo que el Tween 80 (Tabla 28).

Tabla 28. Capacidad de remoción de los tensoactivos

Tensoactivo	CMC (mg/L)	Dosis (mg/L)	Hidrocarburo removido (ppm)	Sol de lavado utilizada	Cantidad de surfactante empleado (mg)	Capacidad de remoción (g de hidrocarburo/gr de surfactante)
Biosurf M9b	10	5	3518.341	3L	15	234.56
Tween 80	64	64	4674.672	3 L	192	24.35

5.8 FASE 3: BIODEGRADACIÓN

5.8.1 Cultivo de las bacterias degradadoras de hidrocarburos

La curva de crecimiento del consorcio de bacterias degradadoras de hidrocarburos o carburastas (Figura 21) muestra que el crecimiento de estos microorganismos fue muy lento. Su fase exponencial comienza a las 10 horas y dura hasta 40 horas. Existen reportes de cultivos cuya fase exponencial dura de 6 días hasta 9 días (Acuña *et al.*, 2010) y esto depende en gran medida de la composición del hidrocarburo utilizado como fuente de carbono (Narváez *et al.*, 2008).

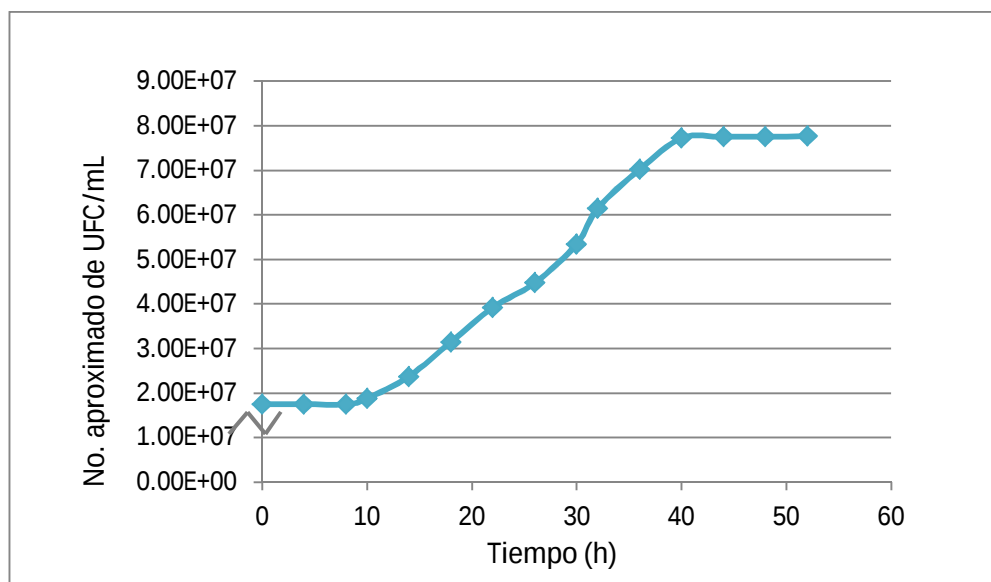


Figura 21. Curva de crecimiento del consorcio de bacterias degradadoras de diesel

5.8.2 Determinación de nutrientes posterior a la fase de lavado.

Una vez realizado el lavado se determinó nuevamente el porcentaje de carbono, el de nitrógeno y el del fósforo para poder igualar la relación 100:10:1, ya que resulta de suma importancia mantener dicha relación de nutrientes porque ello favorece la degradación de los contaminantes (Roldan, 2006). Los resultados se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Determinación de nutrientes para la fase de bioaumentación

	Materia orgánica (%)	Nitrógeno total (mg/kg)	Fósforo disponible (mg/kg)	Fertilizante adicionado (mg/kg)
Suelo sin contaminar	7.47	118	334	-----
Suelo + diesel	22.54	271	420	165
Suelo + diesel lavado con biosurf M9b	13.11	167	539	100
Suelo + diesel lavado con Tween 80	16.13	229	538	140
Suelo + diesel lavado con Agua	16.13	188	537	140

En la Tabla 29 se puede observar que el contenido de materia orgánica al adicionar el diesel; esto se debe a que este es un compuesto orgánico formado por grandes cadenas de carbono orgánico oxidable. En lo que respecta al nitrógeno y al fósforo también se observa que existe un incremento después de cada tratamiento que posiblemente se deba a una contribución del propio surfactante. López en el 2004 mostró cómo diferentes surfactantes incrementaron dichos nutrientes después de un proceso de lavado; el nitrógeno incrementó en un 14.6% y el fósforo aumentó 5 veces más cuando el suelo fue lavado con 210 L de solución con Tw 80 al 0.5 %.

5.8.3 Inoculación de las columnas experimentales

De acuerdo con la curva de crecimiento se observó que la fase exponencial de los cultivos de las bacterias degradadoras de diesel duró 40 h (Figura 22), pero se decidió utilizar cultivos de 32 h con la finalidad de asegurar que los microorganismos aún se encontraban en dicha fase, ya que en procesos de bioaumentación se recomienda inocular los microorganismos en la fase exponencial debido a que presentan su actividad metabólica máxima (Granados *et al.*, 2003).

Una vez que se tuvieron todos los cultivos se procedió a homogenizar el inóculo y a cada columna se le adicionaron 150 mL de medio. Dicho cultivo contenía 7.28×10^7 UFC/ml y como cada columna tenía 2.5 kg de suelo quedaron aproximadamente 4.37×10^6 UFC por gramo de suelo, el cálculo se realizó por lo establecido en la Ecuación 20:

$$\text{UFC/g de suelo} = \frac{(\text{mL medio inoculado}) \times (\text{UFC por mL})}{\text{g de suelo en la columna}} \dots\dots\dots \text{Ec. 21}$$



Figura 22. Cultivo de bacterias hidrocarbonoclastas

5.8.4 Monitoreo del proceso de biorremediación

Cuentas en placa

Se inocularon 4.37×10^6 UFC por gramo de suelo. La cuenta inicial se realizó para todos los tratamientos a las 48 horas posteriores a la inoculación (Figura 23. Cuenta en placa de microorganismos hidrocarbonoclastas). La diferencia entre las columnas inoculadas y sin inocular fue de un orden de magnitud; las columnas inoculadas presentaron una cuenta de 10^7 y el de las no inoculadas se encontraban en el orden de 10^6 , los

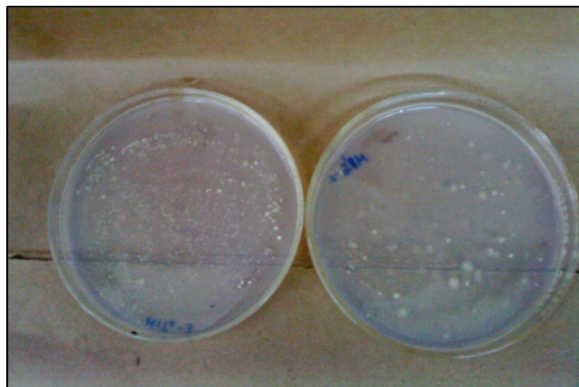


Figura 23. Cuenta en placa de microorganismos hidrocarbonoclastas

valores se muestran en la Tabla 30. De acuerdo a los resultados obtenidos el suelo inoculado se encontraba de 3 a 4 órdenes de magnitud mayor a la cuenta mínima recomendada por Fahnestock *et al.*, (1998) de 1×10^3 para la biorremediación. Cabe mencionar que aunque el suelo de las columnas se empezó a estimular desde el primer día de la inoculación ya habían transcurrido 15 días desde la conclusión de los lavados por lo que hubo tiempo de que las comunidades microbianas empezaran a desarrollarse y es posible que por esto la cuenta bacteriana haya sido parecida a la de las columnas que fueron inoculadas.

Tabla 30. Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo

Fase	Bisurf SIN*	Biosurf IN*	Tw80 SIN*	Tw80 IN*	Control SIN*	Control IN*
Inicial	2.83E+06	3.10E+07	1.37E+06	6.28E+06	3.99E+06	3.25E+07
Intermedia	6.08E+07	1.77E+08	9.33E+07	9.70E+07	5.25E+07	1.55E+08
Final	2.73E+08	1.04E+09	3.55E+08	1.54E+09	3.85E+08	7.88E+08

*Promedio de tres muestras con una varianza menor a 10%

En la Figura 24, se puede observar que la cuenta se incrementó escasamente en los primeros 15 días en todos los tratamientos (ver valores en la Tabla A1.5 del anexo 1), esto posiblemente debido a que pasaron por un periodo de adaptación.

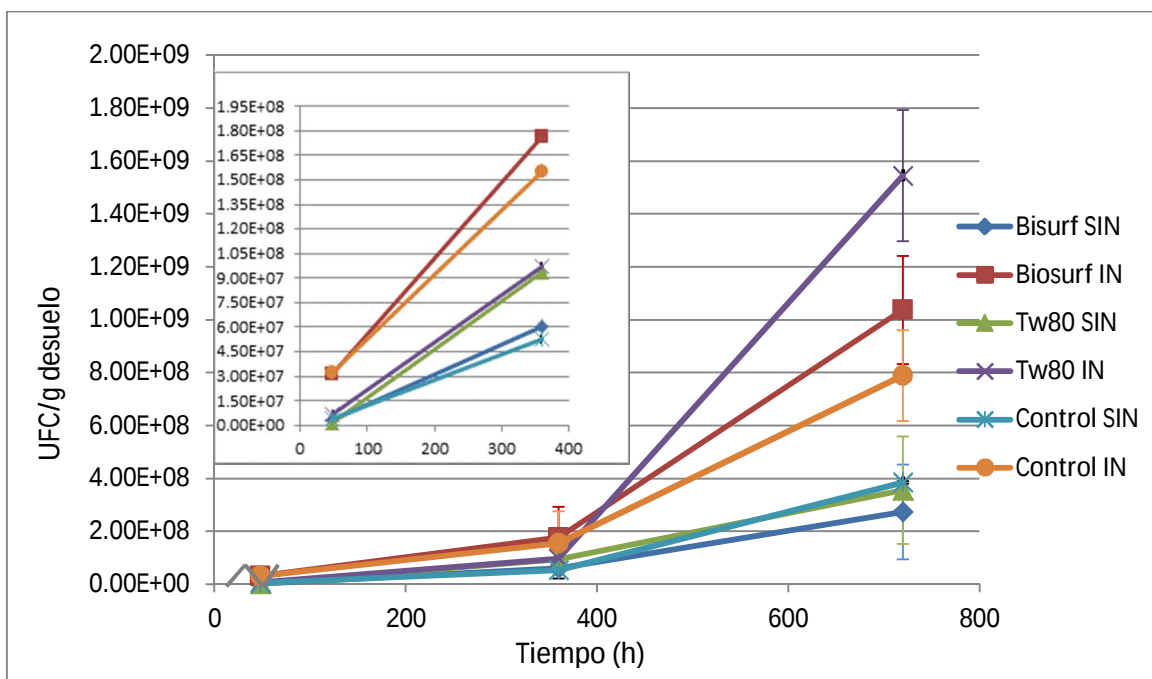


Figura 24. Cuenta en placa de UFC en los procesos de biodegradación

A partir del día 15 al día 30 se observa que el crecimiento fue más acelerado en los reactores que estaban inoculados, lo que nos sugiere que los organismos provenientes de los cultivos tienen un metabolismo mejor adaptado para la degradación del diesel y por ello se reproducen más rápidamente.

Entre los tratamientos de Biosurf M9b inoculado y sin inocular no existieron diferencias significativas, lo mismo para el Tween 80 inoculado y sin inocular, pero para el caso del control sí existió diferencia significativa entre ambos tratamientos, control inoculado y sin inocular, y con el resto de los tratamientos. En los tratamientos de Tween 80 y Biosurf M9b inoculados y sin inocular no existió diferencia significativa, lo cual indica que de alguna manera el residuo del surfactante que queda en el suelo está ayudando a que la población bacteriana aumente más rápido. Riojas *et al.* (2010) menciona que la presencia de algunos surfactantes y/o biosurfactantes aumentan la biodisponibilidad de los hidrocarburos lo que resulta benéfico en procesos de biorremediación y la posible inhibición y/o toxicidad como los factores adversos a considerar.

5.8.5 Respirometría

La medición de la producción de CO₂ se encuentra fuertemente ligada a la actividad metabólica de los microorganismos (Acuña *et al.*, 2006). En la Figura 25 se muestra la producción de CO₂ durante el periodo de biorremediación (ver valores en la Tabla A1.6 del anexo 1A).

Como se observa en la Figura 25 del primer al segundo muestreo las bacterias que mostraron una mejor actividad fueron las inoculadas en el suelo lavado con Biosurf M9b pero al final del tratamiento las que tuvieron el metabolismo más activo fueron las que están en el suelo lavado con Tw 80, lo que coincide con un mayor número de UFC. Wild A. (1992) menciona que desde 1934 Fecher encontró una estrecha correspondencia entre el número de bacterias determinado por la técnica de placas y la emisión de CO₂, Fecher concluyó que la actividad del conjunto de la población aumentaba y disminuía al mismo tiempo que el número de bacterias determinadas por cuenta en placa.

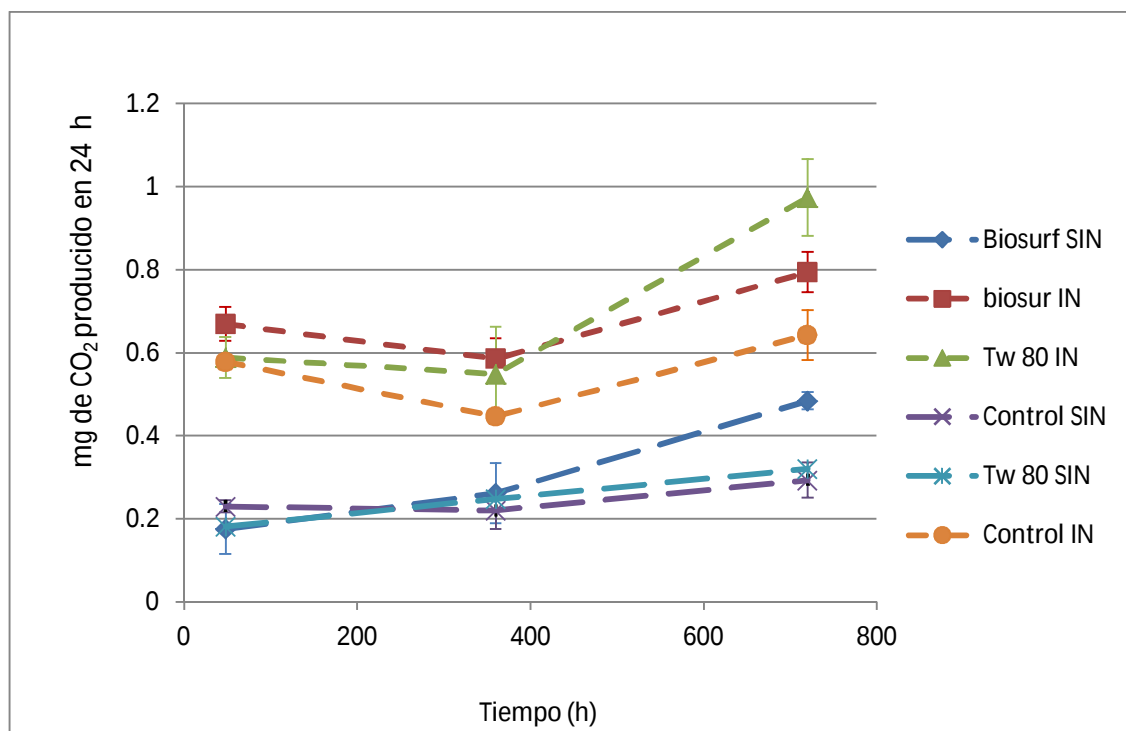


Figura 25. Producción de CO₂ por el metabolismo bacteriano.

En la Figura 24, se observa que la población aumento lentamente (ver valores en la tabla A1.6 del anexo I) aunque en la Figura 25 se ve que existió una disminución en la actividad metabólica de los microorganismos para todos los tratamientos, aunque cabe mencionar que si bien esta técnica está relacionada con el número de unidades formadoras de colonias no se puede determinar el número exacto de microorganismos en el suelo y que la actividad metabólica puede variar o disminuir por diversos factores como la humedad, la temperatura o la asimilación de la fuente de carbono sin variar el número de células vivas (Wild, 1992).

5.8.6 Remoción de hidrocarburos en la fase de biorremediación

Después de transcurridos los 30 días del proceso de biorremediación se procedió a determinar la concentración del hidrocarburo en el suelo. Las diferencias entre la concentración de diesel inicial y final se pueden observar en la Figura 26, En la Tabla 31 se observa que el tratamiento que presentó una mayor remoción de diesel fue el de Tween 80 inoculado (Tw 80 IN) con un porcentaje de 3.85, y el que menor remoción presentó fue control inoculado (1.42%), aunque de acuerdo al análisis estadístico estas diferencias fueron no significativas (ver Tabla 32).

Tabla 31. Porcentajes de remoción de la fase de biodegradación

Tratamiento	Porcentaje de remoción (%)
Biosurf SIN	3.26
Biosurf IN	3.36
Tw 80 SIN	3.04
Tw 80 IN	3.85
Control SIN	0.85
Control IN	1.42

Los tratamientos que no fueron inoculados sí se presentaron diferencias contra los que fueron inoculados, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Tabla 32).

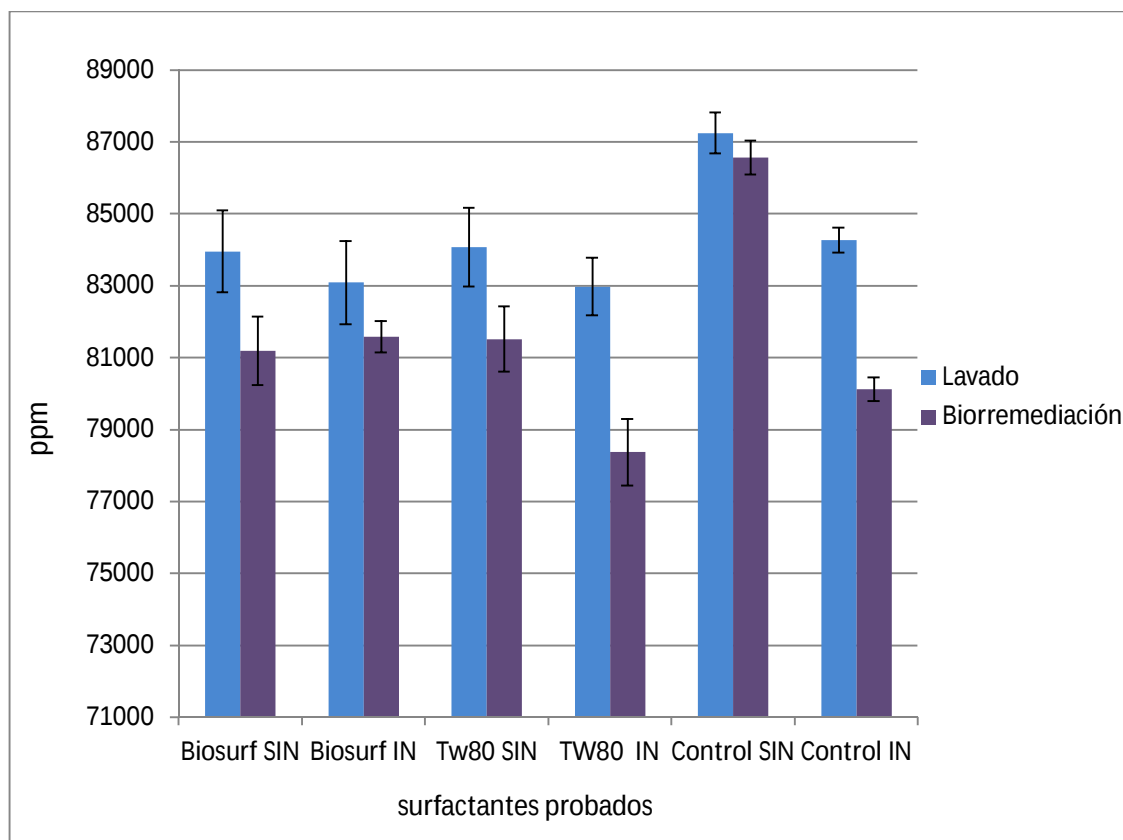


Figura 26. Diesel resultante de los tratamientos de biorremediación

El único tratamiento que presentó diferencias significativas en la remoción con el resto de los tratamientos, fue el control sin inocular (ver Tabla 32) y esto posiblemente se debió a que las condiciones fueron más adversas, ya que la concentración del contaminante era mayor que en los reactores de los tratamientos de suelo lavado con Tw 80 y con Biosurf M9b. Se ha reportado que a concentraciones mayores de 60,000 mg/kg el hidrocarburo resulta toxico para los microorganismos (Velasco y Volke, 2007), lo que se reflejó en un metabolismo menor al de las bacterias que se inocularon, ya que al encontrarse en la fase exponencial de crecimiento su metabolismo se encontraba mejor estimulado en el momento de ser inoculadas.

Tabla 32 Diferencias estadísticas entre los tratamientos de la fase biorremediación

Fase	Muestra1	Muestra 2	Probabilidad	Diferencia
Biorremediación	Control IN	Control SIN	.001	Si
	Control IN	Biosurf IN	.0006	Si
	Control IN	Biosurf SIN	.012	Si
	Control IN	Tw 80 IN	.0006	Si
	Control IN	Tw 80 SIN	.0315	Si
	Control SIN	Tw 80 SIN	.273	No
	Control SIN	Biosurf IN	.143	No
	Control SIN	Biosurf SIN	.423	No
	Control SIN	Tw 80 IN	.101	No
	Biosurf IN	Biosuf SIN	.884	No
	Biosurf IN	Tw 80 IN	.727	No
	Biosurf IN	Tw 80 SIN	.670	No
	Biosuf SIN	Tw 80 IN	.980	No
	Biosurf SIN	Tw 80 SIN	.722	No
	Tw 80 IN	Tw 80 SIN	.569	No

5.9 IDENTIFICACIÓN DE EFECTOS TÓXICOS EN PLANTAS

Para evaluar los índices de germinación se requirió del mismo suelo artificial conformado sin contaminar el cual sirvió como control positivo para elaborar del índice de germinación (Sección 4.4), y con éste estimar el índice de inhibición en el crecimiento de la raíz en los demás tratamientos.

En la Figura 27 se puede apreciar que las muestras iniciales (suelo contaminado sin tratar) presentaron un índice de germinación de 97.8% menor al del control positivo (Ctrl+), una vez concluida la fase de lavado se presentó un aumento en el índice de germinación, esto debido probablemente a que la concentración de diesel se redujo por los procesos de atenuación natural ya que hasta este momento no se le había aplicado ningún tratamiento. En los tratamientos finales del control, sin inocular (SIN) e inoculado (IN) el índice de germinación aumentó ya que con la bioestimulación la disminución en la concentración del hidrocarburo fue mayor.

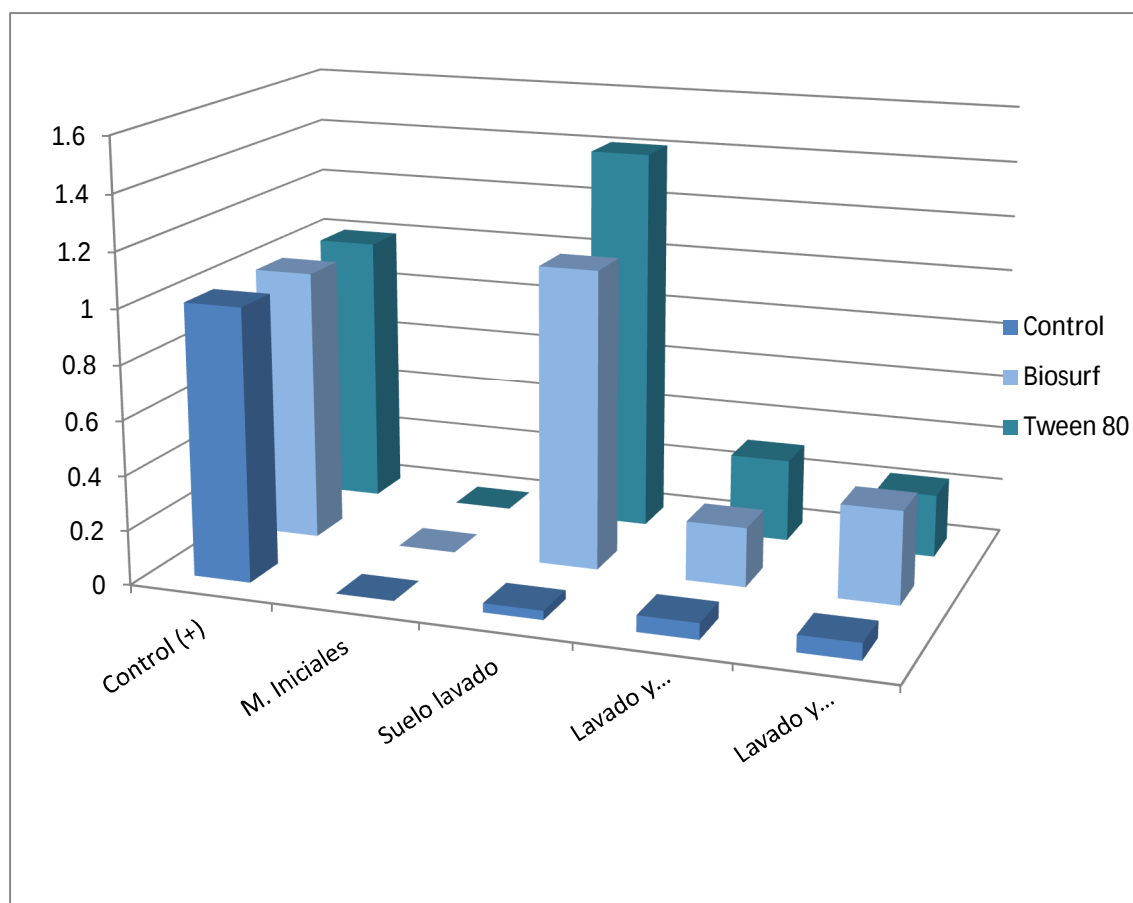


Figura 27. Índices de germinación por tratamiento

Al concluir los tratamientos de lavado con Tween 80 y con Biosurf M9b, la germinación observada fue mayor que en el control positivo, esto debido probablemente a que los surfactantes al mismo tiempo de reducir la concentración de contaminante incrementa la cantidad de nutrientes como el fósforo (Tabla 29) que se relaciona fuertemente con los procesos de floración y formación de raíces (Noel, 2002).

En la Tabla 33 se muestran los índices de inhibición de la elongación de la raíz (IER), como puede observarse para los tratamientos de suelo lavado con Tw 80 y Biosurf se obtuvieron valores negativos, lo cual indica que no se presentó inhibición en el desarrollo de la raíz, al contrario se presentó un aumento respecto al control, sugiriendo que el uso de dichos tensoactivos en las dosis empleadas no incrementa la toxicidad del suelo presentada por la contaminación inicial, sino que al contrario permite que más semillas germinen presentando un mejor desarrollo en su radícula (Figura 28).

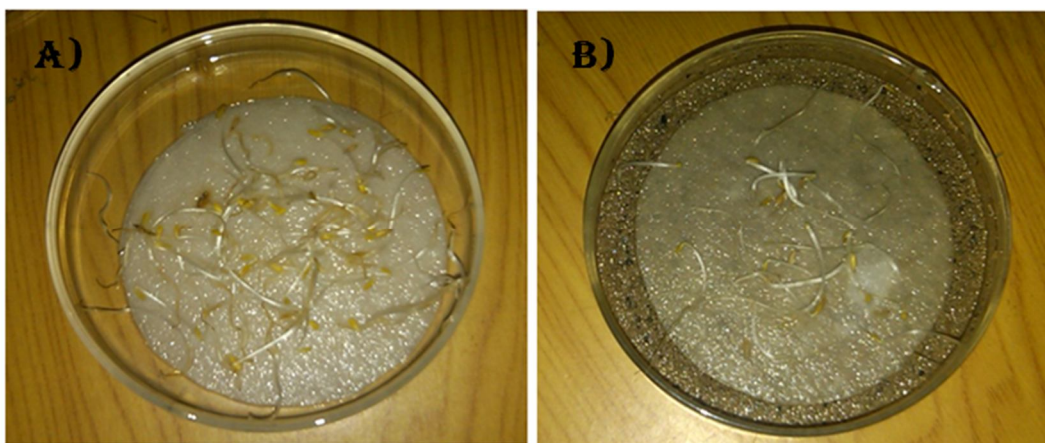


Figura 28. A) Plántulas provenientes del suelo lavado con surfactantes. B) Plántula proveniente del suelo control

Por otro lado no existieron diferencias significativas entre el suelo control (que no recibió tratamiento) y el suelo lavado con agua (Tabla 34) pero la diferencia si fue significativa respecto al suelo lavado con Biosurf M9b y Tween 80 y entre sí; siendo el suelo lavado con Tween 80 el que presentó la mejor germinación con respecto a todos los tratamientos.

En lo que respecta a los índice de germinación para el suelo tratado por biodegradación se aprecia que dicho índice aumento respeto a las muestras iniciales fue menor en comparación con el del suelo proveniente del lavado con los tensoactivos. Es decir, que el desarrollo de las raíces de las plántulas de lechuga disminuyeron debido posiblemente a que el fósforo ya no se encontró disponible ya que los microorganismos lo asimilaron para sus funciones metabólicas, Blasco en 1970 menciona que el desarrollo de los

microorganismos que puede influir desfavorablemente en las cantidades de fósforo asimilables de los suelos. Sin embargo es importante mencionar que una vez aplicados los tratamientos se logró disminuir la toxicidad en comparación con las muestras al inicio de los lavados.

Tabla 33. Índice de inhibición en la elongación de la raíz (IER)

Fase experimental	Tratamientos	% IER	± Desv. Est.
Control (+)	Ctrl (+)	0	0.103
Inicial	Ctrl Ini	0	0.000
Posterior al lavado	Ctrl Int	96.68	0.006
	Agua	97.6	0.007
	SLTw	-41.2*	0.430
	SLBio	-9.7*	0.623
Posterior a la biorremediación	Ctrl IN	94.04	0.017
	Ctrl SIN	93.86	0.017
	SLTw IN	69.6	0.042
	SLTw SIN	76.88	0.042
	SLBio IN	78.26	0.062
	SLBio SI	65.86	0.183

*Los valores negativos se deben a que el desarrollo de la raíz fue mayor que el control positivo. SL = Suelo lavado.

En la Tabla 34, se muestra si hubo o no diferencias significativas en el índice de elongación de la raíz (IER) entre los tratamientos.

Tabla 34. Diferencias estadísticas entre los tratamientos de toxicidad

Fase	Muestra 1	Muestra 2	Probabilidad	Diferencia
Lavado	Control	Agua	0.08780	No
	Control	Biosurf	0.00188	Si
	Control	Tw 80	0.00001	Si
	Agua	Biosurf	0.02361	Si
	Agua	Tw 80	0.00100	Si
	Biosurf	Tw 80	0.33202	No

Continuación de la Tabla 34. Diferencias estadísticas entre los tratamientos de toxicidad

Fase	Muestra1	Muestra 2	Probabilidad	Diferencia
Biorremediación	Control IN	Control SIN	0.91334	No
	Control IN	Biosurf IN	0.01425	Si
	Control IN	Biosurf SIN	0.05738	No
	Control IN	Tw 80 IN	0.00308	Si
	Control IN	Tw 80 SIN	0.00080	Si
	Control SIN	Tw 80 SIN	0.00072	No
	Control SIN	Biosurf IN	0.01394	Si
	Control SIN	Biosurf SIN	0.05804	No
	Control SIN	Tw 80 IN	0.00280	Si
	Biosurf IN	Biosurf SIN	0.33003	No
	Biosurf IN	Tw 80 IN	0.76662	No
	Biosurf IN	Tw 80 SIN	0.11629	No
	Biosurf SIN	Tw 80 IN	0.36772	No
	Biosurf SIN	Tw 80 SIN	0.74852	No
	Tw 80 IN	Tw 80 SIN	0.09882	No

Los tratamientos que presentaron diferencias significativas fueron los controles inoculados y sin inocular con el resto de los tratamientos, aunque ellos fueron estadísticamente iguales. Los que también resultaron iguales son los tratamientos de Biosurf M9b y los de Tween 80 inoculados y sin inocular lo que indicó que ambos tratamientos reducen la toxicidad del suelo de igual forma con respecto al suelo inicial.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6. CONCLUSIONES

En las pruebas preliminares de Lavado se observó que el surfactante de origen químico conocido como Tween 80 al igualar su concentración micelar crítica CMC, removió la mayor cantidad de diesel (64.97%), pero no fue estadísticamente diferente de la remoción que presentó el Biosurf M9b a 0.5 de su CMC que fue del 63.62%.

La dosis que más hidrocarburo removió en el caso del Biosurf M9b fue en la que solo se empleó la mitad de su concentración micelar crítica (CMC) lo que indica que la remoción de hidrocarburos se llevó a cabo por el proceso de movilización. Por otra parte, en el caso del Tween 80, la concentración óptima se presentó cuando la solución de lavado se igualó a la CMC por lo que el fenómeno de eliminación del diesel se dio por el proceso de micelación.

El lavado de suelo en las columnas experimentales presentó el mismo comportamiento que en las pruebas preliminares, en donde el Tween 80 fue el que removió la mayor cantidad, 23.88% más que el Biosurf M9b pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

El Biosurf M9b fue el más efectivo al evaluar la capacidad de remoción de diesel, extrayendo 210 g más de diesel por gramo de suelo, en comparación con el Tween 80. Sin embargo, con las cinéticas de remoción se observó que es posible remover más diesel en un periodo de tiempo menor utilizando el Tween 80.

Después del lavado de suelo, tanto con Biosurf M9b como con Tween 80, se logró un mejor desarrollo de los microorganismos y mayor actividad metabólica, que fue aún mejor que los suelos estimulados.

Los ensayos de fitotoxicidad demostraron que la aplicación de los tratamientos disminuyó la toxicidad inicial del suelo. En las pruebas realizadas con el suelo proveniente de la fase de lavado se observó que los índices de germinación aumentaron respecto al control positivo y que el desarrollo de la raíz fue mucho mejor.

En los ensayos de toxicidad realizados posterior a la fase de biodegradación se observó una disminución en los porcentajes de germinación con respecto a los ensayos de la fase de lavado, lo que señala que los residuos de los surfactantes benefician el desarrollo de la raíz.

6.1 RECOMENDACIONES

Debido a que las remociones en el lavado de suelo por inundación fueron bajas se sugiere realizar pruebas de lavado mecánico.

Aunque los índices de germinación y el desarrollo de la raíz en los suelos donde se aplicaron los tensoactivos fueron mayores a los del suelo control, es conveniente estudiar con mayor detalle si no afectan el desarrollo de las plantas.

Es conveniente realizar pruebas con diferentes concentraciones de diesel en el suelo para observar si existen diferencias en los porcentajes de remoción.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña A., Pucci G., Morales J. M. y Pucci O. 2010. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. Revista de la sociedad Venezolana de Microbiología 30, 29-36.
2. ATSDS. 2010. Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Consultado el 25 de Noviembre de 2010 en http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts71.html
3. Anderson, T., Guthrie E. and Walton B., 1993. Bioremediation in the rhizosphere. Environmental Science & Technology 27, 2630-2636.
4. Araujo I., Gómez A., Barrera M., Angulo N., Herrera L. 2008. Surfactantes biológicos en la biorremediación de aguas contaminadas con crudo liviano. Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América. 33 (4), 245-250.
5. Atlas, R. M. 1997. Handbook of Microbiological Media. CRC. Press, Inc. USA. 2051pp.
6. Badillo J.E. y Rodríguez R. A. 1963. Fundamentos de mecánica de suelos. Tomo I. primera ed. Rabasa S. A. México D.F. 437pp.
7. Báez D. C., Bulus R. D., Pica G. Y. 2004. Métodos estadísticos para el análisis de resultados de toxicidad. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Instituto mexicano de tecnología del agua. Gabriela castillo. Capítulo 5, 270pp.
8. Bai G., Brusseau M. L. y Miller R. M. 1997. Biosurfactant-enhanced removal of residual hydrocarbon from soil. Journal of Contaminant Hydrology 25; 157–170.
9. Berna JL, Cassant G, Hager C-D, Rehman N, López I, Schowanekd, Steber J, Taeger K, Wind T (2007) Anaerobic biodegradation of surfactants. Tenside Surfactants Detergents 44, 312–347
10. Blasco L. M. 1970. Microbiología de suelos. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Centro de enseñanza e investigación. Turrialba Costa Rica. 229pp.
11. Bordas F., Lafrance P y Villemur R. 2005. Conditions for effective removal of pyrene from an artificially contaminated soil using *Pseudomonas aeruginosa* 57SJ rhamnolipids. Environmental Pollution. 138, 69–7
12. Cardona G. S. A. 2004. Tratamiento de hidrocarburos con un sistema de barrera reactiva permeable. Tesis para la obtención de grado de Maestría. Posgrado de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
13. Castillo E. J. A. 2008. Efecto de la relación suelo-solución surfactante en el lavado de suelos contaminados por hidrocarburos en un tanque agitado. Tesis para obtención del grado de ingeniero químico. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

14. Climent, M., 2007. Estudios del mezclado en el proceso de lavado de suelos contaminados con hidrocarburos, Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
15. Corona R. L. 2004. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis para obtención de maestría. Posgrado de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
16. Deshpande S. Shiau B. J., Wade D., Sabatini D. A., Harwel J. H. 1999. Surfactant Selection for enhancing ex-situ soil washing. *Water Research* 33 (2), 351-360.
17. Doroteo R. E. 2010. Diseño y operación de un hidrociclón para mejorar la técnica de lavado de suelos. Tesis para la obtención de maestría. Posgrado de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
18. EPA. 2010. Superfund Remedy Report. Thirteenth ed. Office of soil waste and emergency response. National Service Center for Environmental Publications Cincinnati OH. 320pp.
19. Fahnestock F.M. Wickramanayake G.B. Kratzke R. J. Major W. R. 1998. Biopile desing operation and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils. Battelle Press. USA 163pp.
20. Fattah Q. and Wort D. 1970. Metabolic responses of bush bean plants to naphthenate. *Canadian Journal of Botany* 48 (5), 859-860.
21. Frank N., Lissner A., Winkelmann M., Hu"ttl R., Mertens F.O., Kaschabek S.R., Schlo"mann M. 2010. Degradation of selected biosurfactants by bacterial cultures monitored by calorimetric methods. *Biodegradation* 21, 179–191
22. Franzetti A., Di Gennaro P. Bevilacqua A., Papacchini M., Bestetti G. 2006. Environmental features of two commercial surfactants widely used in soil remediation. *Chemosphere* 62, 1474-1480.
23. FRTR. 1999. Soil flushing. Federal Remediation Technologies Roundtable. USEPA. Consultado el 20 de Diciembre de 2010. Disponible en: http://www.frtr.gov/matrix2/section4/4_8.html.
24. García C., Gil F., Hernández T. y Trasar C. 2003. Técnicas de análisis de parámetro bioquímicos en suelo: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Mundi prensa. Pág. 371pp.
25. García N. G. 1996. Evaluación de parámetros de adsorción de compuestos orgánicos halogenados (TCE y PCE) en diferentes tipos de suelos. Tesis para la obtención del grado de maestría. Posgrado de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
26. Georgiou G., Lyn S. y Sharma M. 1992. Surface-active compounds from microorganism. *Biotechnology* 10, 60–65.

27. Granados P. R. Villaverde P. M. C. 2003. Microbiología, Volumen 1. Ed. Paraninfo. Capítulo 3, 380 pp.
28. Head H. K. 2006. Manual of Soil Laboratory Testing. Capítulo 6: Compactation tests. John Wiley & Sons Inc. 480pp.
29. Herman D.C., Zhang Y. y Miller R M. 1997. Rhamnolipid (Biosurfactant) Effects on Cell Aggregation and Biodegradation of Residual Hexadecane under Saturated Flow Conditions. Applied and Environmental Microbiology. September, 3622–3627.
30. Hernández, R. E. H. 2010 fito-remediación asistida por BPCV de un suelo contaminado por diesel y su toxicidad pos-tratamiento. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
31. INE. 2007. Tecnologías de remediación utilizadas en México. Consultado en noviembre de 2010 en: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/372/tecnomexico.html>
32. Iturbe A. R. 1999. Técnicas de Rehabilitación de Suelos y Acuíferos. Cuaderno técnico Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México. No. 11. México D.F.
33. Iturbe A. R. y Silva M. A. E. 1992. “Agua subterránea y contaminantes”. Series del Instituto de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México. No.539, 12-19
34. Iturbe R., Flores, C. y Chavez, C. 2004. Remediation of Contaminated soil using soil washing and biopile methodologies at a field level, Soils and sediments, México. Journal of Soils and Sediments 4, 115-122
35. Jiménez C. B. E. 2001. La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. Limusa. México. 926 pp.
36. Jit k C. 2000. Biosurfactants and their roles in bioremediation. Environmental Biotechnology. Essay (MC4203).
37. Johnston, C. D., Fisher, S., y Rayner, J. L. 2002. Removal of petroleum hydrocarbons from the vadose zone during multi-phase extraction at a contaminated industrial site. IAHS-AISH publication 0144-7815.
38. Jurado A. E., Bravo R. V., Núñez O. J., Bailón M. R., Gálvaez B. A., Altmajer V. D. 2009. Desing of experiments to evaluate the detergency of surfactans on fatty soils in a continuos-flow device. Journal of Surfactants and Detergents 12 (3), 191-199.
39. Khan F., Husain T., Hejazi R. 2004; “An overview and analysis of site remediation technologies. Memorial University of Newfoundland; Journal of Environmental Management; Canada 71, 95–122.
40. Kosaricn. 2001. Biosurfactants for Soil Bioremediation, Food Technology and Biotechnology. 39 (4), 295–304.

41. Kuyukinaa M. S., Ivshinaa I. B., Makarovb S. O., Litvinenkob L. V., Cunninghamc C. J. y Philpd J.C. 2005. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. *Environmental International* 31, 155-161.
42. Lai C., Huang Y., Wei H., Chang J. (2009). Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.01.017.
43. Lee D. H., Cody R. D., Kim D. J. y Choi S. 2002. Effect of soil texture on surfactant-based hydrophobic organic remediation of contaminated soil. *Environment International* 27, 681–688.
44. Leyva C. D. 2006. Comparación de técnicas de saneamiento en un suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo de Tabasco. Tesis para la obtención del grado de Maestría Posgrado de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
45. Lima T. M., Procópio L. C., Brandão F. D., Carvalho A. M., Tótola M. R. y Borges A. C. 2010. Biodegradability of bacterial surfactants. *Biodegradation* DOI 10.1007/s10532-010-9431-3.
46. López J. 2004. Cambios fisicoquímicos y biológicos en un suelo contaminado con hidrocarburos y saneado con la técnica de lavado de suelos. Tesis para la obtención del grado de Maestría. Posgrado de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
47. Martienssen M. y Schirmer M. 2007. Use of surfactants to improve the biological degradation of petroleum hydrocarbons in afield site study. *Environmental Technology* 28, 573-582.
48. Mata-Sandoval J. C. Karns J. y Torrents A. 2000. The influence of surfactans and biosurfactans on the bioability of hydrophobic organic pollutants in subsurface environments. *Revista Internacional de Contaminación. Ambiental* 16 (004), 193-203.
49. Millner G., James R. and Nye A., 1992. Human health-based soil cleanup guidelines for diesel fuel no. 2. *Soil Contamination* 1, 103-157
50. Mota R. M. Efecto del diesel sobre la germinación y crecimiento de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) y de rabanito (*Raphanus sativus*) utilizando suelos de usos industrial y agrícola. Tesis para la obtención del grado de bióloga. Facultad de ciencias Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
51. Murligan C. 2005. Enviromental applications for biosurfactants. *Enviromental Pollution* 133, 183-198.
52. Myers D. 2005. *Surfactant science and technology*. John Wiley and Sons. ISBN 0471680249, 9780471680246. 20-21

53. Narváez F. S. Gómez M.L. y Martínez M. M. 2008. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. Boletín de investigaciones marinas y costeras, 37 (1), 63-77
54. Norma Oficial Mexicana; NOM-021-SEMARNAT-2000; Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación; 31 de Diciembre de 2002. México D.F.
55. Norma Oficial Mexicana; NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. Diario Oficial de la federación, 12 de Diciembre de 1995. México D.F.
56. Norma Oficial Mexicana; NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Diario Oficial de la Federación, 18 de Agosto de 2003. México. D.F.
57. Norma Oficial Mexicana; NOM-138-SEMARNAT/SS-2003; "Límites Máximos Permisibles de Hidrocarburos en Suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación". Diario Oficial México, 29 de Marzo del 2005. México D.F.
58. Norma técnica mexicana NMX-AA-145-SCFI-2008 Suelos-hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama-método de prueba. Diario Oficial de la Federación, 26 de Marzo de 2009. México D.F.
59. Orantes G. J. 2002. Aplicación de surfactantes en suelos contaminados con hidrocarburos Tesis para la obtención del grado de maestría. Posgrado de Ingeniería Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
60. Ortiz B.I., García S.J., Dorado V. M. y Villar F.S. 2007. 6º Informe de vigilancia tecnológica: Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Universidad de Alcalá del Círculo de Innovación en tecnologías Medioambientales y Energía (CITME). Alcalá España.
61. Paria S. 2008. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. Advances in Colloid and Interface Science 138 (1), 24–58
62. Petróleos Mexicanos. 2006. consultado el 26 de julio de 2010; www.pemex.com
63. Ramírez Gama *et al.*, 2008. Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de microbiología experimental. 5ª edición. Facultad de Química UNAM. México D.F. 278pp.
64. Ramos O. R., Sepúlveda M. R., Villalobos M. F. 2003. El agua en el medio ambiente: muestreo y análisis. UABC 1ª edición. 210pp.
65. Roldán M. G. A. 2006. Remoción de hidrocarburos en un sistema de biopilas con adición de texturizantes. Tesis para la obtención del grado de maestría. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. México D.F.

66. Ruiz Silva Irma. 2002. Estimulación de cultivos microbianos degradadores de hidrocarburos. Tesis para obtención del grado de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México. MéxicoD.F.
67. Samadi N., Abadian N., abbas A., Fazeli M. R., Tahzibi A., Jamalifar H. 2007. Biosurfactans Production by the Strain Isolated from Contaminated Soil. Journal of Biological Sciences 7(7), 166-1269
68. Saval Bohórquez S. 1995. "Remediación y restauración" en PEMEX Ambiente y Energía. Los retos del futuro, México, Universidad Nacional Autónoma de México y Petróleos Mexicanos, 209-223
69. Saval S. y Lesser J. M. 2000. Experiencia de caracterización y remediación de un suelo arcilloso contaminado con hidrocarburo. Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales; AIDIS Ciencia y conciencia compromiso nacional con el medio ambiente: memorias técnicas FEMISCA, 1-7.
70. SEMARNAP. 1996. Los Suelos de Tabasco Restauración, Conservación y Uso. Gobierno Constitucional del Estado de Tabasco
71. SEMARNAT. 2008. Proyecto de Programa Nacional de Remediación de Sitios Contaminados. Dirección general de gestión integral de materiales y actividades riesgosas y GTZ. México D.F. Esta publicación está disponible a través de la página de Internet de SEMARNAT y de la GTZ en: <http://www.semarnat.gob.mx>
72. Shin K., Kima K. y Ahn Y. 2006. Use of biosurfactant to remediate phenanthrene-contaminated soil by the combined solubilization-biodegradation process. Journal of Hazardous Materials B137, 1831-1837
73. Singh R.P., Gupta N., Singh A., Suman R. y Annie K. 2002. Toxicity of ionic and non ionic surfactants to six microbes found in Agra India. Environmental Contamination and Toxicologic. 89; 265-270
74. Slager J. L. y Fernández A. 2004. Cuaderno FIRP 301-pp Modulo de enseñanza en fenómenos interfaciales (Surfactantes). Capítulo I Generalidades. Facultad de Ingeniería e Ingeniería Química Universidad de los Andes. 3-7
75. Soberón G. 2009. Biosurfactantes 1, en línea. Fecha de consulta junio de 2009. Disponible en: personal.us.es/evpolo/pdf/trab/pinedorevilla_trigochoorda.pdf
76. Son A. J., Shin, K. H., Lee, J. U., and Kim, K. W. 2003. Chemical and ecotoxicity assessment of PAH contaminated soils remediated by enhanced soil flushing. Environmental Engineering Science 20 (3), 197-206
77. Stevenson F., 1966. Lipids in soils. Chemistry and Materials. Journal of the American Oil Chemists Society. 43(4), 203-210

78. Stone Jr. W. 1991. Assessing Health Risks Associated with Diesel Contaminated Soils and Groundwater. In Hydrocarbons Contaminated Soils. Calabrese y Kostecki. Lewis Publishers. 319pp.
79. Torres L. G., Lemus X, Urquiza G. Verdejo A. y Iturbe R. 2005. Surfactan Enhanced Washing of Drilling Fluids, a promising remediation technique. Tenside Surfactants Detergents, 42 (6), 347-355
80. Toribio J.J. 2011. Caracterización de biosurfactantes aisladas de Cuatro Ciénegas Coahuila, México. Tesis de doctorado. Instituto de investigaciones biomédicas, Universidad Autónoma de México. México D.F.
81. Torres L., Zavala P., Beltrán M., Vaca M. e Iturbe R. 2007. Combination of natural gums and synthetic surfactants for washing of a soil highly contaminated with crude. American Association of Petroleum Geologists (AAPG) 14 (1), 49-58.
82. Torres L.; Orantes J.; e Iturbe R. 2003(a). Biodegradation of two nonionic surfactants employed for oil-contaminated-soils in situ flushing. Tenside Surfactant Detergents 43(5), 251-255
83. Torres L.; Orantes J.; e Iturbe R. 2003(b).Critical micellar concentrations for three surfactants and their diesel-removal efficiencies in petroleum-contaminated soils: Environmental Geosciences 10(1), 28-36
84. Urum K. y Pekdemir T. 2004. Evaluation of biosurfactans for crude oil contaminated soil washing. Chemosphere 57, 1139-1150
85. USEPA. 1996. Seed germination/root elongation toxicity test. Ecological Effect Test Guidelines, OPPTS 850.400. USEPA/712/C/96/154.
86. USEPA. 2002. Guía para el ciudadano sobre el lavado de suelo. Serie de guías para el ciudadano. United States Environmental Protection Agency.
87. Valderrama B. y Téllez-Sosa J.; 2000; "Microbiología del petróleo y sus derivados"; Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional Autónoma de México; México, AP 510-3 .Pp. 1-30.
88. Villalobos M. Ávila-Forcada A.P. Gutiérrez-Ruiz M.E. 2008. An improved gravimetric method of determine total petroleum hydrocarbons in contaminated soils. Water Air Soil Pollution 194: 152-161
89. Volke y Velasco. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología. México D.F. 64 pp.
90. Whang L., Liu P., Ma C. y Cheng S. 2008. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. Journal of Hazardous Materials 151, 155–163
91. Wild Alan. 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. MP. 2ª edición. 680pp.

92. Wilson D.J. y Dekker C. A. 1994. Hazardous waste site. Soil Remediation. Theory and application of innovative technologies. New York. 738 pp.
93. Yañez R. J. N. 2002. Nutrición y regulación del crecimiento en hortalizas y frutales. Tecnología, comercio y servicios agrícolas mundiales. Saltillo Coahuila. Consultado el 29 de mayo de 2010 en: <http://www.uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort02/Ponencia03.pdf>
94. Zavala S. 2011. Optimización del medio de cultivo y escalamiento de la producción de un biosurfactante de un aislado ambiental de *Pseudomonas sp.* obtenido de Cuatro Ciénegas Coahuila. Tesis en realización para obtener el grado de doctor en ciencias biomédicas.
95. Zhao B., Zhu L., Gao Y. 2005. A novel solubilization of phenanthrene using Winsor 1 microemulsion-based sodium castor oil sulfate. Journal of Hazardous Materials B (119), 205–211.

ANEXOS

ANEXO I VALORES DE TABLAS

Tabla A1. 1 Valores del grafico de la prueba de granulometría

MALLA		M1	
		M-INTEGRAL	
Malla U.S.	Abertura (mm)	% No pasa Relativo	% Pasa Absoluto
n° 8	4.76		99.987
n° 10	2		99.967
n° 20	0.84		97.462
n° 40	0.42		11.032
n° 60	0.25		4.214
n° 140	0.149		0.715
n° 200	0.074		0.146911519

Tabla A1. 2 Concentraciones resultantes de las pruebas ara determinar la dosis de lavado

Tratamiento	Concentración Inicial	Concentración Diesel	Porcentaje de remoción	Desv. Est.
Blanco	48946.67	48946.67	---	0.135
Agua	48946.67	20026.67	59.08	0.690
Bio 0.5	48946.67	17806.67	63.62	0.699
Bio 1.0	48946.67	22213.33	54.62	0.828
Bio 1.5	48946.67	22500.00	54.03	1.636
Tw 0.5	48946.67	22566.67	53.90	1.179
Tw 1.0	48946.67	17146.67	64.97	0.829
Tw 1.5	48946.67	17426.67	64.40	0.640

Tabla A1. 3 Concentraciones resultantes de la fase de lavado

Tratamientos	Inicial	Lavado	Des. vest. inicial	Des. vest. final
Agua	85204.2571	82843.9645	0.00040414	1907.44954
Biosurf M9b	86609.7791	83091.4386	3631.28133	4057.71211
Tween 80	87650.733	82976.0605	3422.30695	1476.71315
Control	85521.7036	84266.892	3771.35798	3462.1945

Tabla A1. 4 Valores esperados y calculados de las cinéticas de remoción

		Inicial	Intermedio	K1t	Esperados	Observados
Agua		85204.2571	82085.8531	0.00124286	82085.8531	82085.8531
		85204.2578	81432.1226	0.00150939	81432.1226	81432.1226
		85204.2571	85013.9177	-7.4547E-5	85013.9177	85013.9177
Biosurfactante	Sin B	88664.7389	85068.6338	0.00138013	85068.6338	85068.6338
	Sin B	88505.901	85311.7688	0.00122523	85311.7688	85311.7688
	Sin B	81843.3357	81489.9584	0.00014424	81489.9584	81489.9584
	Con B	88919.532	88850.2787	-2.5971E-5	88850.2787	88850.2787
	Con B	81366.1815	77719.2287	0.00152857	77719.2287	77719.2287
	Con B	90358.9858	80108.7631	0.00401351	80108.7631	80108.7631
Tween 80	Sin B	88873.3632	83249.1786	0.00217914	83249.1786	83249.1786
	Sin B	86282.1432	85311.7688	0.00037701	85311.7688	85311.7688
	Sin B	90358.9858	83661.6868	0.00256698	83661.6868	83661.6868
	con B	88664.7389	82605.7807	0.00235942	82605.7807	82605.7807
	Con B	81366.1815	81018.647	0.00014268	81018.647	81018.647
	Con B	90358.9858	82009.3012	0.00323193	82009.3012	82009.3012
Control	Sin B	88664.7389	86842.4848	0.00069221	86842.4848	86842.4848
	Sin B	88881.058	87650.2787	0.00046481	87650.2787	87650.2787
	Sin B	ND	ND	ND	ND	ND
	Con B	82697.6816	81537.0712	0.00047113	81537.0712	81537.0712
	Con B	81843.3357	81037.7332	0.00032973	81037.7332	81037.7332
	Con B	ND	ND	ND	ND	ND

Grafico A1.1 Regresión lineal de la cinética de degradación para la fase de lavado

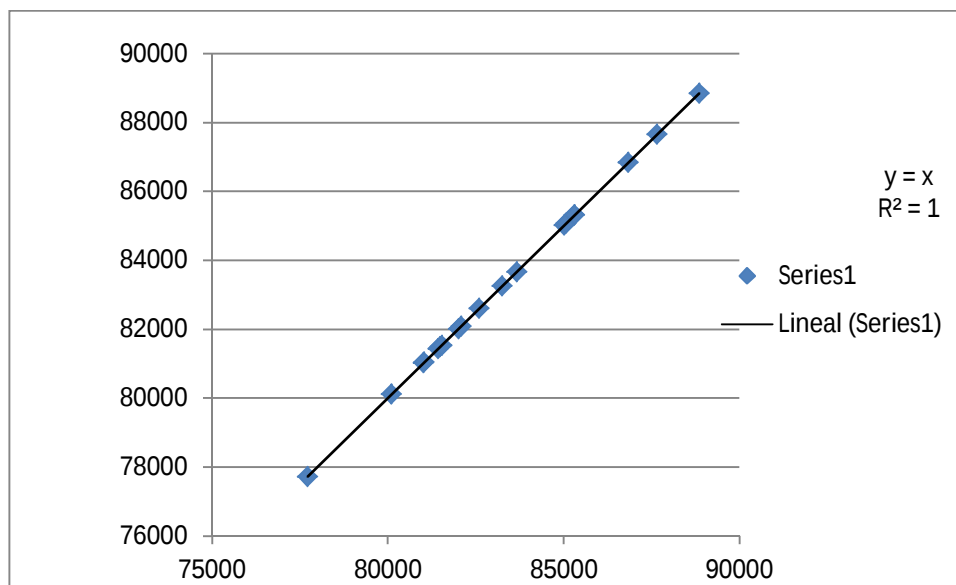


Tabla A1.5 Valores de las UFC en el proceso de biorremediación

Horas	Bisurf SIN	Biosurf IN	Tw80 SIN	Tw80 IN	Control SIN	Control IN
0	ND	4.37E+06	ND	4.37E+06	ND	4.37E+06
48	2.83E+06	3.10E+07	1.37E+06	6.28E+06	3.99E+06	3.25E+07
360	6.08E+07	1.77E+08	9.33E+07	9.70E+07	5.25E+07	1.55E+08
720	2.73E+08	1.04E+09	3.55E+08	1.54E+09	3.85E+08	7.88E+08

Tabla A1.6 Valores

horas	Biosurf SIN	biosur IN	Tw 80 IN	Tw 80 SIN	Control SIN	Control IN
48	0.17557793	0.66922717	0.58830053	0.18251362	0.23019652	0.57827938
360	0.26173616	0.58582259	0.54907212	0.24783485	0.21971209	0.4463417
720	0.48459091	0.79382827	0.97416974	0.32066621	0.29353026	0.64315124

ANEXO II CROMATOGRAMAS Y CURVA DE CALIBRACIÓN PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE DIESEL

Para efectuar la determinación se realizó una curva de calibración con el diesel empleado para contaminar nuestro suelo artificial (Figura A1) para lo cual se utilizaron 5 concentraciones Ver figuras del al 1A a la 5A.

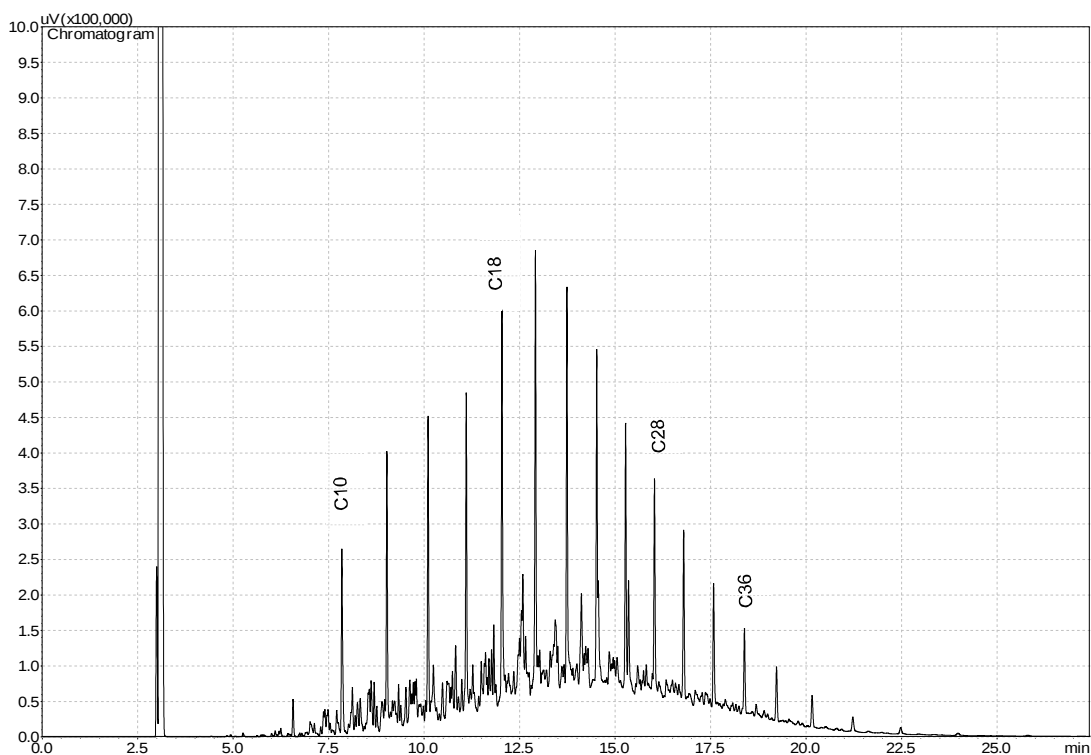


Figura A1. Disolución de diesel diclorometano a 80,000 ppm.

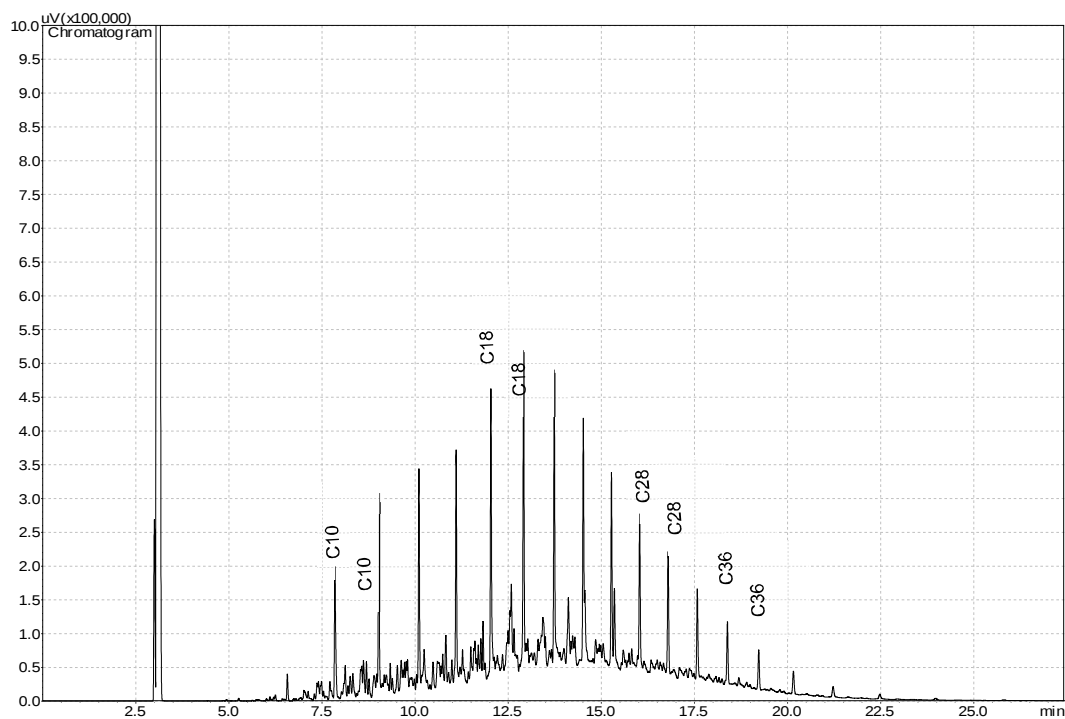


Figura A2. Disolución de diesel diclorometano a 60,000 ppm.

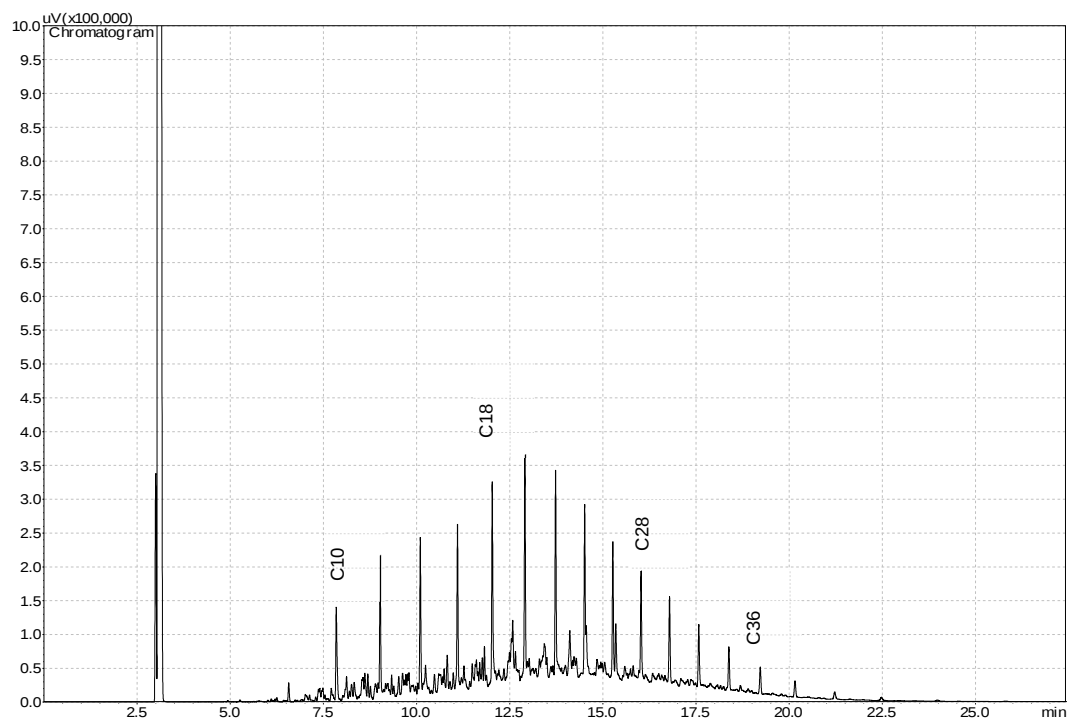


Figura A3. Disolución de diesel diclorometano a 40,000 ppm.

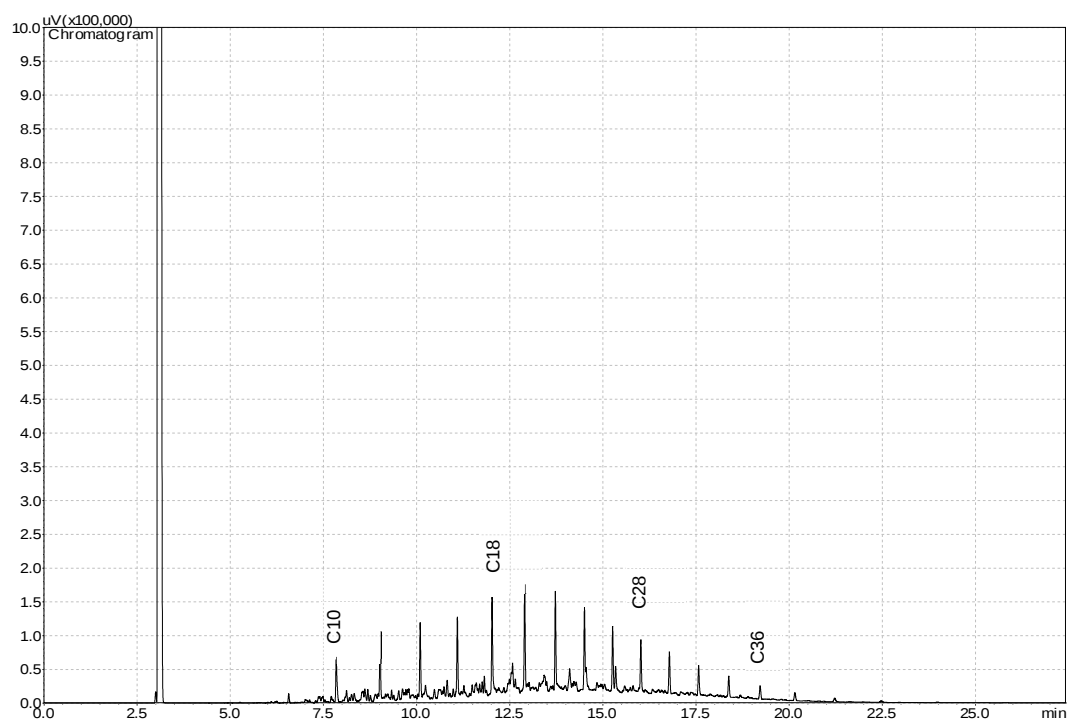


Figura A4. Disolución de diesel diclorometano a 20,000 ppm.

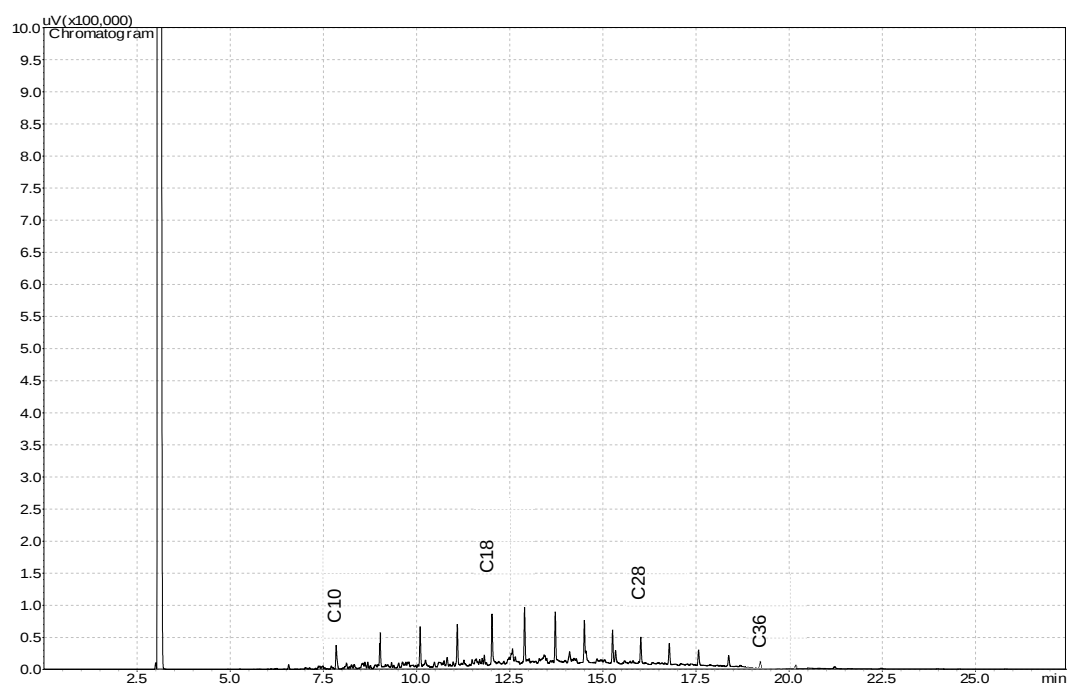


Figura A5. Disolución de diesel diclorometano a 10

Las una vez obtenidas todas las áreas de la diferentes concentraciones (Tabla A1) se procedió a elaborar al regresión lineal para validar nuestra curva de calibración Figura A6.

Tabla A1. Áreas de la curva de calibración

Conc. de la disolución	Área	No. de figura
80000	10434635.7	A1
60000	8908912.9	A2
40000	5534189.3	A3
20000	2710511.2	A4
10000	1507334.55	A5

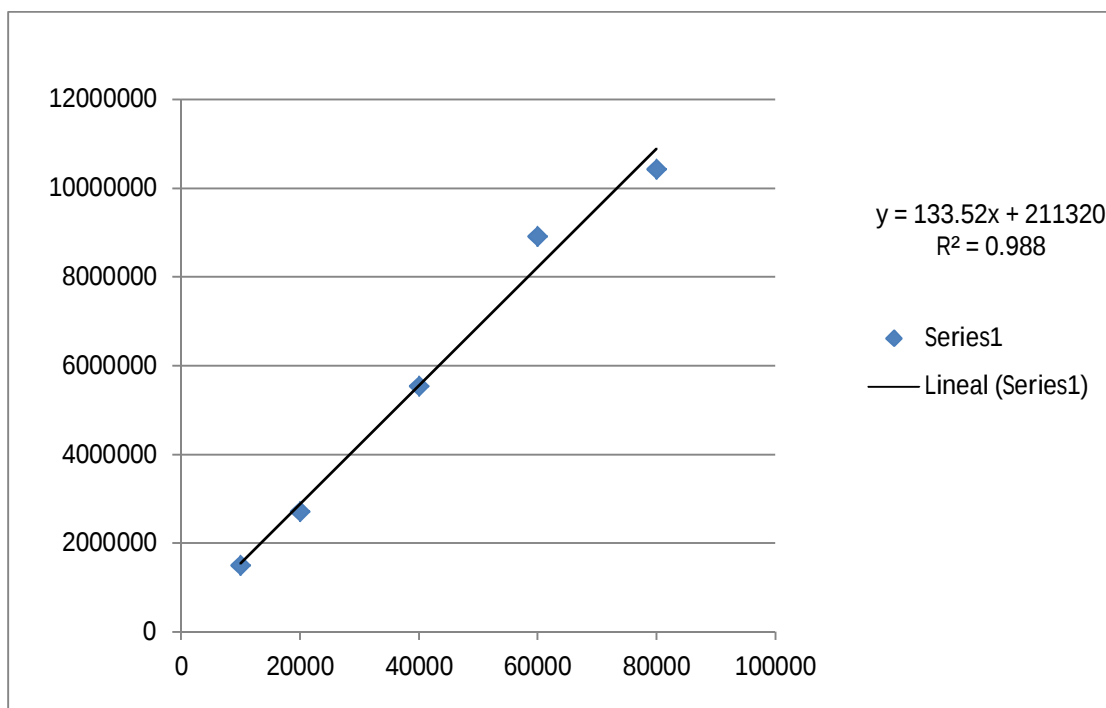


Figura A6. Curva de calibración para determinar la concentración del diesel empleado.

Cromatograma de las muestras iniciales

En los cromatogramas de las muestras iniciales se observa que el diesel empieza aparecer en el minuto 10 y no en el min 77 como el de diesel estándar (Figura A7).

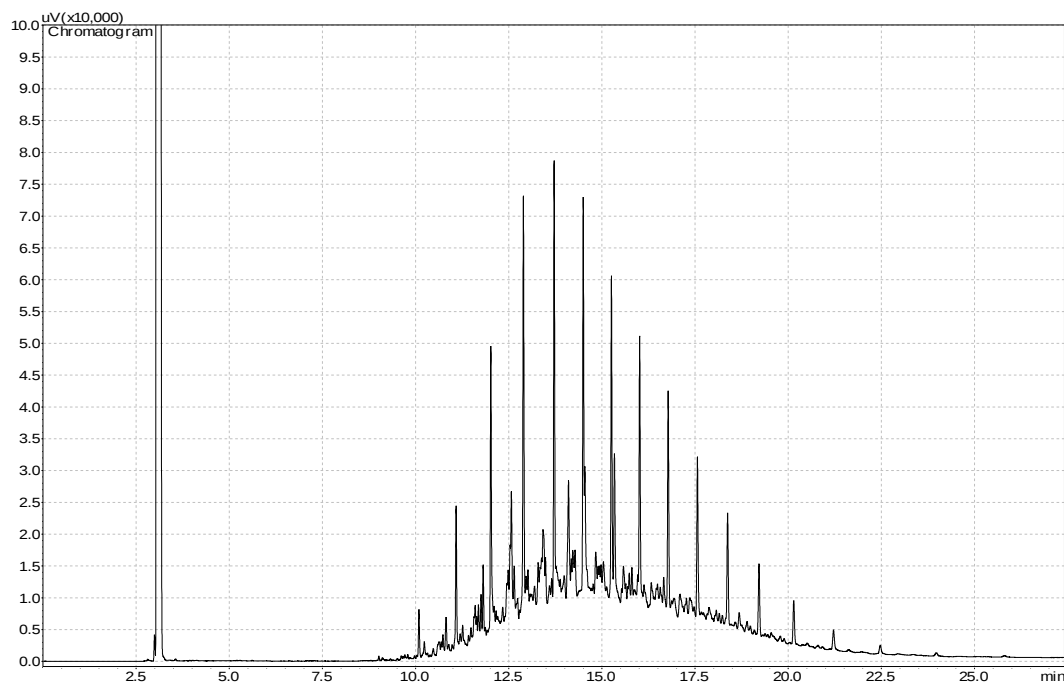


Figura A7. Cromatograma de una de las muestras iniciales.

ANEXO III MATERIALES UTILIZADOS PARA LA CONFORMACIÓN Y ENRIQUECIMIENTO DEL SUELO

CAOLÍN		
Material residual blanco, producto de la alteración hidrotermal y/o meteórica de rocas ricas en aluminio y de carácter ácido (pobre o libres de compuestos ferromagnéticos). Está constituido por silicatos de aluminio hidratados más o menos puros, cristalinos o amorfos tales como la caolinita, halloysita, alofanita y otros.		
Propiedades químicas		
Formula química	Al ₂ Si ₂ O ₅ (OH) ₄	
Clase	Silicato	Subclase: filosilicato
Grupo	Caolinita-serpentina	
solubilidad	Solo en H ₂ SO ₄ concentrado y caliente	
Propiedades físicas		
Color	Incolora o blanca	
Brillo	Nacarado Mate	
Textura	Presenta un aspecto terroso, tacto árido y casi siempre susceptible de plasticidad cuando se le añade agua	
Dureza	2.0-2.5 rara vez con dureza 1.0	
Densidad	2.40-2.68 (pura 2.61)	

FELDESPATO	
Propiedades químicas	
Formula química	KAlSi ₃ O ₈
Clase	Silicato de aluminio y Sodio Potásico, Calcio
Grupo	Silicatos
Componentes	SiO ₂ menor al 10%
pH	2.76-8.7
Propiedades físicas	
Color	Blanco grisáceo
Peso molecular	524.00
Textura	Presenta un aspecto terroso, tacto árido y casi siempre susceptible de plasticidad cuando se le añade agua
Dureza	2.0-2.5 rara vez con dureza 1.0
Densidad relativa	2.55-2.76 (pura 2.61)

MATERIA ORGÁNICA		
Determinación	Resultados	Unidades
Peso del bulto	30.00	kg
P ₂ O ₃	85.00	%
Fósforo	22.44	kg
Nitrógeno Total	39.00	mg.kg ⁻¹
Ác. Húmicos	10.70	%
Humus	60.00	%
K ₂ O	29.00	mg.kg ⁻¹
Azufre	18.40	mg.kg ⁻¹
Magnesio	13.60	mg.kg ⁻¹
Calcio	74.00	mg.kg ⁻¹

BASF Química Colombiana S.A.

Hoja de Seguridad NITROFOSKA AZUL 12-12-17-2

Hoja de Seguridad MSDS: XD-72

Fecha de Revisión: 10/14/03

Producto: **NITROFOSKA AZUL 12-12-17-2**

BASF Química Colombiana S.A.

Calle 99 A #51-32 Bogotá

Teléfonos de emergencia
Bogotá (1) 632 2260
Medellín (4) 370 2020
CISPROQUIM (01) 8000 91 6012
ATMI (1) 6433 927
(01) 800 09 16818

1. Identificación del producto químico y la compañía

NITROFOSKA AZUL 12-12-17-2

Empresa

BASF Química Colombiana S.A.

Calle 99 A N° 51 – 32

Tel. (1) 632 22 60

Fax.(1) 271 5399

Bogotá, Colombia

2. Composición, información sobre los componentes

Nombre Comercial: Nitrofoska Azul 12-12-17-2

Componentes: Nitrógeno total (N) 12.0%

Nitrógeno amónico (N) 6.5%

Nitrógeno nítrico (N) 5.5%

Fósforo asimilable (P₂O₅) 12.0%

Potasio soluble (K₂O) 17.0%

Magnesio (MgO) 2.0%

Azufre (S) 6.0%

Calcio (CaO) 5.0%

Boro (B) 0.02%

Zinc (Zn) 0.01%

Número UN: N.A

Uso: Fertilizante.

Componentes

Nitrato de amoníaco >10=<70% p/p

#CAS

6484-52-2

3. Identificación de peligros

Irritante. Riesgo de lesiones pulmonares por inhalación