

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE INGENIERÍA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OPTIMIZACIÓN DE LA BIODEGRADACIÓN DE DIESEL INDUSTRIAL
EN UN SUELO CONTAMINADO MEDIANTE LA
METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA (AMBIENTAL) PRESENTA
HÉCTOR GUSTAVO ZEGARRA MARTÍNEZ



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.

AMDG

**A mis padres, hermanos y Machu,
por su apoyo, paciencia y cariño**

**"... su suelo empapado en grasa,
porque es el día de la venganza de Yavé,
el año de revancha para la causa de Sión.**

**Sus ríos se transformarán en petróleo
y su tierra en azufre; su país queda hecho un brasero..."**

Is 34: 7-9

AGRADECIMIENTOS

Dra. Susana Saval B.

Por su apoyo, amistad y fomentar mi crecimiento humano, académico y profesional

M. en I. Francis Soler Anguiano.

Por su tiempo dedicado a mi formación durante mis estudios de maestría y sus consejos

Dra. Georgina Fernández Villagómez.

Por su apoyo y comentarios en el desarrollo del presente trabajo

Dra. Rosario Iturbe Arguelles.

Por su valioso tiempo dedicado en la revisión del presente manuscrito y sus comentarios

M. A. I. Landy Irene Ramirez Burgos.

Por sus consejos y tiempo dispuesto en la elaboración de este trabajo

M. en I. Augusto Villareal Aranda.

Por fomentar el arte de los números

Dra. Rina Aguirre.

Por sus consejos, motivación y apoyo desinteresado en mi crecimiento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Por la beca otorgada que sustentó mis estudios de posgrado

A la familia Vargas Valadés y en especial a Rafael por su motivación

A mis compañeros del Instituto de Ingeniería, especialmente a Ady, Lucy, Norma y ЯСМИНКА

A Jordi, Alma, los comunitarios, 72 y DRAKOs por estar siempre ahí en su lugar

Al tío Cesar, la familia Martínez, los Gandolfo, los Origone, Wong y Siu

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
LISTA DE TABLAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
NOMENCLATURA.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	3
I MARCO TEÓRICO.....	4
A. El petróleo y sus derivados.....	4
B. Situación de los derrames de hidrocarburos.....	5
1. Principales fuentes de contaminación de suelos con hidrocarburos.....	5
2. Accidentes con hidrocarburos en México.....	10
3. Marco legal de la contaminación de suelos con hidrocarburos.....	10
4. Las auditorías ambientales.....	14
C. Impactos al ambiente por derrames de hidrocarburos.....	16
1. Efectos en plantas.....	16
2. Efectos en animales.....	18
3. Efectos en microorganismos.....	19
D. Biodegradación de hidrocarburos.....	19
1. Factores físicos y químicos que afectan la biodegradación de hidrocarburos.....	21
1.1. Tipo de suelo: textura, densidad aparente, densidad real y porosidad.....	21
1.2. Composición química de los hidrocarburos presentes.....	22
1.3. Estado físico de los hidrocarburos.....	23
1.4. Concentración del petróleo y sus derivados.....	25
1.5. Adsorción, desorción y biodisponibilidad.....	26
1.6. Temperatura.....	26
1.7. Oxígeno como aceptor de electrones.....	27
1.8. Nutrientes.....	29
1.9. Salinidad.....	29
1.10. Humedad.....	30
1.11. pH.....	30
2. Factores biológicos que afectan la biodegradación de hidrocarburos.....	31
2.1. Bacterias degradadoras y otros microorganismos.....	31
2.2. Adaptación.....	32
2.3. Inhibición de la biodegradación.....	32
E. Metodología de Superficie de Respuesta.....	33
1. Directrices para el diseño de experimentos.....	36
2. Diseños de experimentos para la MSR.....	37
II ANTECEDENTES.....	41
III. EXPERIMENTACIÓN.....	44
A. Muestreo y preparación del suelo contaminado y control.....	44
B. Análisis del suelo.....	46
C. Diseño estadístico.....	48
1. Etapa I.....	48
1.1. Experimento I.....	48
1.2. Experimento II.....	50

2.	Etapa II.....	50
2.1.	Experimento III.....	51
2.2.	Experimento IV.....	52
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
A.	Características físicas, químicas y microbiológicas del suelo.....	53
B.	Optimización de la degradación.....	57
1.	Selección de las variables para la MSR.....	57
2.	Porcentaje de Biodegradación: análisis de variancia y caracterización de superficies de respuesta.....	60
2.1.	Etapa I.....	60
2.1.1.	Experimento I.....	61
2.1.2.	Experimento II.....	61
2.1.2.1.	Efecto del diesel y sus interacciones.....	63
2.1.2.2.	Efecto del nitrógeno amoniacal y fosfatos.....	64
2.2.	Etapa II.....	66
2.2.1.	Experimento III.....	67
2.2.2.	Experimento IV.....	68
2.2.2.1.	Efecto del diesel y sus interacciones.....	69
2.2.2.2.	Efecto del nitrógeno amoniacal y sus interacciones.....	69
2.2.2.3.	Efecto de los fosfatos y sus interacciones.....	74
2.3.	Resumen de los efectos.....	75
3.	Continuidad de la Etapa I a la Etapa II.....	77
C.	Relación C:N:P.....	79
1.	Etapa I.....	79
2.	Etapa II.....	83
3.	Resumen de las limitaciones de la relación C:N:P.....	86
D.	Pruebas de respirometría.....	87
1.	Análisis de las pruebas de respirometría de la Etapa I.....	89
1.1.	Modelo de regresión.....	89
1.2.	Correlación de la producción de CO ₂ y consumo de O ₂ con la biodegradación.....	93
2.	Análisis de las pruebas de respirometría de la Etapa II.....	96
2.1.	Modelo de regresión.....	96
2.2.	Correlación de la producción de CO ₂ y consumo de O ₂ con la biodegradación.....	98
3.	Limitaciones de las pruebas respirométricas.....	101
E.	Balance de materia.....	104
1.	Modelo de Freijer.....	107
1.1	Modelo de Freijer: coeficiente de mineralización (a)	109
1.2	Modelo de Freijer: coeficiente de respiración (r)	110
2.	Modelo de McCarty.....	111
3.	Otros parámetros.....	114
3.1	Coeficiente de Respiración (CR)	114
3.2.	Producción de CO ₂ y consumo de O ₂ por consumo de hidrocarburo.....	118
F.	Consideraciones Finales.....	120
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	122
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	124
ANEXOS.....		140

RESUMEN

Los derrames de petróleo y sus derivados han impactado el ambiente causando la contaminación de grandes extensiones de suelo y el deterioro de los cuerpos de agua superficiales y subterráneos. Una alternativa de saneamiento con importante auge a nivel mundial, es la biorremediación, que se basa en la capacidad de los microorganismos para transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos que incluso pueden mineralizarse. La biodegradación depende de las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo y de las propiedades químicas del contaminante. Por lo que es conveniente conocer la factibilidad de aplicar la biorremediación para cada sitio específico.

En este trabajo se caracterizaron los principales parámetros físicos, químicos y microbiológicos tanto en el suelo contaminado, como en el suelo control. Posteriormente se realizaron estudios a nivel microcosmos donde se evaluó el efecto de la concentración de diesel (C), nitrógeno amoniacal (N) y fosfatos (P) - así como la relación C:N:P - durante la biodegradación de diesel en un suelo contaminado aprovechando la flora nativa. Como herramienta de optimización se empleó la metodología de superficie de respuesta que requirió el desarrollo de cuatro diseños experimentales secuenciales variando las concentraciones de los nutrientes esenciales por aportes de nitrógeno amoniacal y fosfatos y de diesel industrial a través de diluciones del suelo contaminado con suelo control.

Al primer diseño experimental ortogonal se le ajustó un modelo de primer orden observándose que las variables en el modelo no contribuían significativamente al ajuste y que la falta de ajuste era significativa, por lo que la función de regresión no fue lineal. Esto justificó el desarrollo de un modelo de segundo orden ampliando el diseño con puntos axiales o estrella. El coeficiente de determinación (R^2) para este modelo de segundo orden fue de 0.90. El análisis de variancia (ANOVA) reveló un ajuste adecuado y los efectos significativos de las variables, así como las interacciones diesel-nitrógeno amoniacal y diesel-fosfatos. Con base en el modelo se observó que la concentración inicial de diesel en el suelo debe ser menor de 38,000 mg/kg para aumentar el porcentaje de biodegradación.

En el tercer diseño experimental se movió el espacio experimental a concentraciones más altas de nitrógeno amoniacal y fosfatos y menores de diesel, pero fue inadecuado al ajuste de un modelo de primer orden, por lo que se desarrolló un cuarto diseño experimental central compuesto. El análisis de variancia para este último mostró una regresión significativa y un ajuste del modelo adecuado, aunque con un bajo coeficiente de determinación (0.75). Aunque no se alcanzó un óptimo se incrementó el porcentaje de biodegradación un 85% y se observó la tendencia de aumento de la biodegradación al disminuir la concentración del diesel. Finalmente se observó que las pruebas de respirometría no están directamente correlacionadas con el grado de biodegradación del diesel y que el empleo de una relación C:N:P para las distintas concentraciones iniciales de diesel en el suelo es muy limitante, por no representar los efectos de las concentraciones absolutas.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Emergencias ambientales asociadas con el manejo de hidrocarburos.....	11
Tabla 2. Composición de algunos derivados del petróleo.....	23
Tabla 3. Valores de la constante de la ley de Henry.....	25
Tabla 4. Condiciones de operación de acuerdo al aceptor de electrones y potencial REDOX.....	28
Tabla 5. Especificaciones de los diseños experimentales para tres factores.....	49
Tabla 6. Diseño para los experimentos I y II.....	51
Tabla 7. Diseño experimental III y IV.....	52
Tabla 8. Características físicas, químicas y microbiológicas del suelo empleado.....	54
Tabla 9. Nominación para suelos típicos.....	56
Tabla 10. Porcentajes de biodegradación observados para los experimentos I y II de acuerdo con el diseño experimental.....	60
Tabla 11. Análisis de variancia para el modelo de primer orden (Experimento I)	61
Tabla 12. Análisis de variancia para el modelo de segundo orden (Experimento II)	62
Tabla 13. Coeficientes para el modelo cuadrático ajustado en el Experimento II.....	62
Tabla 14. Porcentajes de biodegradación observados para los experimentos III y IV de acuerdo con el diseño experimental.....	66
Tabla 15. Análisis de variancia para el experimento III.....	67
Tabla 16. Análisis de variancia para el modelo de segundo orden (Experimento IV).....	68
Tabla 17. Coeficientes para el modelo cuadrático ajustado en el Experimento IV.....	68
Tabla 18. Estudios previos que determinaron una disminución de la actividad biodegradadora de hidrocarburos por la adición excesiva de nitrógeno.....	72
Tabla 19. Porcentajes de biodegradación reportados en la literatura.....	76
Tabla 20. Valores de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos empleados en la primera y segunda etapa.....	78
Tabla 21. Porcentaje de biodegradación para cada relación C:N:P de la Etapa I.....	79
Tabla 22. Relaciones C:N:P empleadas en distintos estudios de biodegradación de hidrocarburos en suelo.....	81
Tabla 23. Porcentaje de biodegradación para cada relación C:N:P de la Etapa II.....	83
Tabla 24. Respuestas y unidades empleadas en las pruebas respirométricas.....	88
Tabla 25. Variables seleccionadas para en análisis estadístico de las pruebas respirométricas	90
Tabla 26. Resultados de la respirometría de la Etapa I.....	90
Tabla 27. ANOVA para el modelo lineal del polinomio de primer orden.....	91

Tabla 28. ANOVA para el modelo que sólo considera al regresor del diesel	93
Tabla 29. Prueba de hipótesis para evaluar la significancia del coeficiente de correlación de la Etapa I.....	95
Tabla 30. Prueba de hipótesis para entre el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono.....	94
Tabla 31. Resultados de la respirometría de la Etapa II.....	96
Tabla 32. ANOVA para el modelo polinomio de primer orden.....	97
Tabla 33. Prueba de hipótesis para evaluar la significancia del coeficiente de correlación.....	99
Tabla 34. Prueba de hipótesis para el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono.....	101
Tabla 35. Reacciones, balances y parámetros de degradación calculados a partir de la literatura...	105
Tabla 36. Coeficientes de mineralización y respiración calculados para la Etapa I de acuerdo con Freijer (1996).....	108
Tabla 37. Coeficientes de mineralización y respiración calculados para la Etapa I de acuerdo con Freijer (1996).....	109
Tabla 38. Coeficiente de mineralización reportados.....	109
Tabla 39. Cálculo de requerimiento de oxígeno y nutrientes y producción de CO ₂ y biomasa para la Etapa I de acuerdo con el Modelo de McCarty.....	112
Tabla 40. Cálculo de requerimiento de oxígeno y nutrientes y producción de CO ₂ y biomasa para la Etapa II de acuerdo con el Modelo de McCarty.....	112
Tabla 41. Coeficientes de respiración (CR) para las etapas I y II.....	115
Tabla 42. Valores de coeficientes de respiración (CR) reportados para suelos contaminados con hidrocarburos.....	117
Tabla 43. Parámetros reportados o calculados de la bibliografía.....	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Extracto del primer reporte de degradación de hidrocarburos con microorganismos (Miyoshi, 1895).....	20
Figura 2. Distribución del volumen de poro para un suelo tipo migajón-arenoso a distintas densidades aparentes (Juma, 1998).....	22
Figura 3. Gráfica típica de superficie y contornos (Saval, 1992).....	35
Figura 4. Estudio geofísico del suelo empleado en el estudio.....	43
Figura 5. Puntos de muestreo del suelo contaminado y control.....	45
Figura 6. Comparación entre la biodegradación observada y la pronosticada por el modelo cuadrático obtenido en el Experimento II	63
Figura 7. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de diesel (x_1) y de nitrógeno amoniacal (x_2).....	65
Figura 8. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de diesel (x_1) y de fosfatos (x_3).	66
Figura 9. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de nitrógeno amoniacal (x_2) y de fosfatos (x_3).....	66
Figura 10. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de diesel (x_1) y nitrógeno amoniacal (x_2).....	70
Figura 11. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de diesel (x_1) y de fosfatos (x_3).....	70
Figura 12. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de nitrógeno amoniacal (x_2) y fosfatos (x_3).....	70
Figura 13. Comparación de las superficies de respuesta de la etapa I y II.....	77
Figura 14. Valores estimados para los puntos de la Tabla 20.....	78
Figura 15. Relaciones C:N:P ordenadas en forma ascendente para la Etapa I.....	80
Figura 16. Relaciones C:N:P ordenadas en forma ascendente para la Etapa II.....	84
Figura 17. Cinética típica de la producción de CO ₂ consumo de O ₂ Corrida 10, Etapa II.....	87
Figura 18. Tasa de producción de CO ₂ en función de la concentración inicial de diesel.....	100
Figura 19. Producción de CO ₂ en función de la disminución de la concentración de diesel.....	100
Figura 20. Porcentaje de biodegradación en función de la tasa de producción de CO ₂	101

NOMENCLATURA

ANOVA	Análisis de Variancia
C:N:P	Concentración relativa de carbono, nitrógeno y fósforo en partes de peso.
CR	Coefficiente de Respiración
DCC	Diseño Central Compuesto
MSR	Metodología de Superficie de Respuesta
R^2	Coefficiente de determinación
x_1	variable que designa a la concentración codificada de diesel
x_2	variable que designa a la concentración codificada de nitrógeno amoniacal
x_3	variable que designa a la concentración codificada de fosfatos

INTRODUCCIÓN

La obtención de bienes que satisfacen las necesidades de los individuos, la generación de empleos y de divisas de las sociedad post-industrializadas recaen principalmente en la industria y los servicios (OECD, 1998c). Éstas junto con otros sectores productivos requieren de fuentes de energía para el desarrollo de sus actividades, siendo la principal la proveniente de los combustibles fósiles (OECD, 1998a; 1998b). El petróleo y sus derivados - de acuerdo con las tendencias actuales de uso - son y serán al menos por 50 años la principal fuente de energía primaria en el mundo (World Bank, 1999).

La gran producción de crudo por parte de la paraestatal PEMEX ha ubicado a México como el sexto productor de crudo (IEA, 1999). La producción y manejo de 3'499,000 de barriles diarios de hidrocarburos líquidos producidos en 1998 y en especial – para este estudio – de 290,000 barriles diarios de diesel (PEMEX, 1999) y su distribución ha implicado un reto en la protección del ambiente.

Para todos los beneficios que el petróleo y sus derivados brinda a la sociedad moderna, existe un riesgo inherente en la extracción, almacenamiento temporal, transporte y uso. Las tomas clandestinas, derrames accidentales, así como fugas en ductos, tuberías y tanques de almacenamiento de petróleo y sus derivados han impactado el ambiente causando contaminación de grandes extensiones de suelo y el deterioro de los cuerpos de agua superficiales y subterráneos (Saval, 1995).

Dentro de las alternativas económicamente factibles propuestas para el saneamiento de sitios contaminados con hidrocarburos, la biorremediación ha destacado como una de las más atractivas para la limpieza de suelos y acuíferos (Loehr, 1992; Saval, 1998a; Miller, 1997). Esta técnica se basa en la capacidad de los microorganismos para transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos y deseablemente inócuos al ambiente, incluso algunos compuestos, como los hidrocarburos, pueden mineralizarse completamente.

La biodegradación de contaminantes orgánicos depende de las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo y de las propiedades químicas del contaminante. Con base en la información obtenida a través de la caracterización del sitio y el conocimiento de las condiciones óptimas de degradación se puede determinar la factibilidad de aplicar una técnica de biorremediación para cada sitio específico (Saval, 1995).

El diesel es un combustible destilado medio que contiene en su mayoría hidrocarburos semivolátiles, lo que permite su biodegradación. La factibilidad de biodegradarlo en suelo se puede evaluar a través de la modificación de las propiedades del suelo contaminado en estudios de biotratabilidad.

Si bien en la literatura existe información sobre las modificaciones de algunas condiciones para mejorar la biodegradación de hidrocarburos, no existen estudios que de manera sistemática consideren las posibles interacciones entre las condiciones que permitan alcanzar realmente un óptimo. Las referencias analizadas y citadas en el presente trabajo incluyen la modificación o presencia y ausencia de aportes de nutrientes, oxígeno, cambio del pH, de la humedad, temperatura – en especial para condiciones extremas - y concentración y tipo de contaminante. Algunas incluso emplean el término “óptimo” cuando en realidad no muestran evidencia contundente de que el valor que mejoró la biodegradación es realmente un óptimo.

Las pruebas de biotratabilidad y el desarrollo de las mejores condiciones para la biodegradación de hidrocarburos permiten obtener información para desarrollar una adecuada estrategia de remediación (Frankenberger, 1992).

OBJETIVOS

Objetivo general

Encontrar las condiciones de concentración de diesel y de las fuentes de nitrógeno amoniacal y fosfatos que optimicen la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado mediante experimentos a nivel de microcosmos empleando la Metodología de Superficie de Respuesta.

Objetivos particulares

1. Evaluar el porcentaje de biodegradación en suelos contaminados con diesel en función de las concentraciones de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos.
2. Evaluar el consumo de oxígeno molecular y la producción de bióxido de carbono como variables de respuesta alternativas en la cuantificación de la biodegradación de hidrocarburos.
3. Evaluar las relaciones C:N:P en la biodegradación de diesel en un suelo contaminado.

I. MARCO TEÓRICO

A. El petróleo y sus derivados

El petróleo tiene su origen en los depósitos de biomasa animal y vegetal. Estos compuestos fueron reducidos lentamente por tiempos geológicos – millones de años - bajo condiciones anaerobias hasta convertirse en hidrocarburos relativamente puros. Todos los depósitos contienen además de carbono e hidrógeno – componentes básicos de los hidrocarburos – al azufre, nitrógeno y cantidades traza de metales debido a que son parte de los organismos originales que lo formaron. Los residuos de los compuestos biológicos son empleados como marcadores para identificar un tipo de crudo en particular (Cole, 1994).

El proceso de reducción del petróleo requiere gran cantidad de energía que se obtiene de las altas temperaturas presentes a grandes profundidades en la tierra. Esta energía se almacena en las uniones carbono-hidrógeno acumulándose alrededor de 5,200 joules por kilogramo (Cole, 1994).

La transformación del crudo en sus derivados se realiza a través de los procesos de transformación de la industria de refinación obteniéndose más de 2,500 productos, incluyendo al gas licuado del petróleo, gasolinas, gasolvente, gasnafta, gasóleo, kerosina, diesel, combustóleo, aceites lubricantes y materias primas para la industria petroquímica. Entre los principales procesos se encuentra la destilación al vacío, craqueo catalítico y los procesos térmicos de craqueo (Quintanilla y Bauer, 1995).

El crudo contiene ácido sulfhídrico y sales con cloruros por lo que es necesario endulzarlo y desalarlo mediante la remoción del H_2S (amargo) y de las sales. Esto se realiza para controlar la calidad de los productos del petróleo y además en el caso de las sales - en especial la de los cloruros - para evitar la corrosión por incrustaciones en el equipo (Torres, 1997).

El crudo almacenado se lava con agua por el proceso de desalación obteniéndose el crudo en línea el cual se despunta con vapor de agua para la obtención del gas. En las torres de despunte se arrastra HCl controlado por amonio. El producto se endulza para disminuir el contenido de H_2S a fin de no tener que efectuar este proceso en una etapa posterior (Torres, 1997).

La siguiente etapa es la destilación fraccionada con la cual se obtienen productos primarios: residuo primario (536 °C), GOP (Gasóleo Pesado; 400 °C), GOL (Gasóleo Ligeró; 330 °C), kerosina (300 °C) , turbosina (270°C) y gasolina primaria. El residuo primario se somete a una destilación al vacío obteniéndose GOL, GOP, aceite cíclico ligero, aceite cíclico pesado y RAS (comúnmente conocido como chapopote) (Gary y Handwerk, 1980; Torres, 1997).

El diesel se compone aproximadamente de 90% de GOL y de GOP; la carga fresca (gasolina) se compone de 70% de GOL procedente de la destilación al vacío y 30% de GOP primario; y la carga combinada de 90% de carga fresca y 10% de aceites cíclicos ligeros. Esta última se puede introducir a las plantas catalíticas para obtener productos altos en octanos y bajo en oleofinas (Torres, 1997).

B. Situación de los derrames de hidrocarburos

1. Principales fuentes de contaminación de suelos con hidrocarburos.

En 1998 se registraron en el mundo 32 millones de galones (108 000 toneladas) de hidrocarburos que se derramaron sobre el suelo y el mar (International Oil Spill Statitistic, 1999). Este es un reflejo del problema que representa el manejo de los grandes volúmenes de hidrocarburos – 9 376 millones de toneladas en 1998 (IEA, 1999) - requeridos para satisfacer las necesidades de la sociedad moderna.

El petróleo y el gas natural son la principal fuente de energía primaria en el mundo aportando el 55.5% (IEA, 1999) y lo seguirá siendo por al menos 50 años (World Bank, 1999) o 100 años si se considera el desarrollo de técnicas y métodos cada vez más eficientes en la exploración y extracción, pese a las predicciones relativas al agotamiento del petróleo (MPI, 1999f).

En los últimos meses ha existido un incremento a la producción mundial como estrategia macroeconómica para el control de la actual gran volatilidad del precio del crudo debido a la posible escasez temporal y a decisiones políticas en algunos países (MPI, 2000).

Contrapuesto al escenario optimista, existe en el escenario actual de la industria petrolera, algunos factores que disminuirán la tendencia de consumo de los hidrocarburos. El factor ambiental también repercutirá grandemente en la disminución de la producción, enfocado éste entorno al cambio climático y calentamiento global. El Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático en su Anexo B determina los compromisos de 27 países de

reducción de emisiones (Protocolo de Kyoto, 1997). Se espera que la demanda de hidrocarburos por parte de los países miembros de la OCDE (productores del 29.6%) (IEA, 1999) – del cual México es miembro - crecerá de 43.2 millones de barriles diarios en 1997 a 52.5 millones de barriles diarios en el 2010, pero para cumplir con el Protocolo de Kyoto sería necesario reducir la demanda a 33.3 (MPI, 1999e), triplicándose su precio para inhibir el consumo en la siguiente década (MPI, 1999e). Sin embargo países como China, India y México aún no han suscrito el documento (MPI, 1999c).

Se espera que la demanda mundial del petróleo sobrepasará la producción en el año 2020. Se argumenta que aún quedan yacimientos por descubrir que implican más de un trillón de barriles y que gracias a las modernas tecnologías el 75% de estos podrán ser explotados. Ello significa un 50% más de lo que actualmente se extrae. Los escenarios pesimistas creen que el máximo punto de extracción de petróleo ocurrirá antes del año 2010. Una predicción más realista estima que el máximo sucederá en el año 2020 con una capacidad de producción de 90 millones de barriles al día. Sin embargo, en el año 2090 la producción cesará y en el 2100 se acabará el petróleo. Asimismo, se estima que en el futuro el petróleo será más valioso para la producción de farmacéuticos, medicinas, fertilizantes y plásticos. En la actualidad el 80% de la energía proviene del petróleo, gas y carbón (MPI, 1999a).

Los cambios estructurales en el panorama internacional del petróleo, las tres megafusiones: Exxon-Mobil, BP-AMOCO-ARCO y Shell con algún aliado desconocido, ubicará a las mayores inversiones en el Medio Oriente (MPI, 1999d).

Este escenario mundial muestra que todavía se manejarán grandes volúmenes de petróleo en el futuro cercano, al parecer con una tendencia de aumento de producción que irá disminuyendo en un par de décadas. Estos grandes volúmenes de petróleo y de sus derivados todavía representarán un reto en cuanto a manejo de impactos y riesgos ambientales se refiere, incluyendo la protección del suelo.

En México las actividades de exploración, explotación, refinación, transporte, almacenamiento, distribución y ventas de primera mano del petróleo, gas y sus productos refinados, así como la

elaboración, almacenamiento, transporte, distribución y ventas que sirvan como materia prima para las industrias básicas es exclusiva del organismo descentralizado Petróleos Mexicanos (PEMEX)¹.

PEMEX se ha consolidado como la empresa más grande de México y una de las diez más grandes del mundo, tanto en términos de activos como de ingresos y entre las cinco compañías petroleras más importantes del mundo con base en sus reservas y su capacidad de extracción y refinación (PEMEX, 1999). Su producción de crudo en 1999 fue de 1,095 miles de barriles al día, equivalente al 1.7% mundial (Secretaría de Energía, 2000) y de 279.8 miles de barriles al día de diesel (PEMEX, 2000).

El manejo de estos grandes volúmenes de hidrocarburos – junto con su importación – ha sido una pieza clave en el desarrollo de México. Contribuyendo con el 83.02 % de la energía suministrada (OCDE, 1999), brindando varios productos que sirven como materia prima a la industria y aportando el 30% de los ingresos de la federación (Secretaría de Energía, 1999).

Es debido al manejo de hidrocarburos del petróleo que muchas industrias tienen en la actualidad una responsabilidad muy grande con respecto a los impactos ambientales sobre el suelo. Las tomas clandestinas, derrames accidentales, así como fugas en ductos, tuberías y tanques de almacenamiento han impactado el ambiente causando la contaminación de grandes extensiones de suelo y el deterioro de los cuerpos de agua superficiales y subterráneos (Saval, 1997).

En 1995, PEMEX exploración y producción realizó dentro de sus actividades de protección al ambiente, la restauración de 239 hectáreas de suelos contaminados con hidrocarburos, saneamiento de 46 presas de desperdicios de perforación, la recuperación de 543 miles de barriles de aceites y corrección de 175 fugas. PEMEX Petroquímica evaluó – de conformidad con PROFEPA con base en los parámetros de USEPA – a los complejos de Cosoleacaque, la Cangrejera y Pajaritos. PEMEX Refinación atendió a 2 estaciones de bombeo (Linares y Montemorelos); y a 3 terminales de almacenamiento y distribución (Mérida, San Rafael, Arriaga, y Poza Rica) (PEMEX, 1996).

¹ Regulada por la Ley Reglamentaria del Artículo 27 Constitucional en el ramo petrolero, artículo 2 de la Ley Orgánica de Petróleos Mexicanos y Organismos Subsidiarios publicada el 16 de julio de 1992 en el Diario Oficial de la Federación (DOF, 1992). Con excepción de la distribución y transporte del gas en el cual se permitió la concurrencia extranjera como resultado del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (MPI, 1999b; DOF, 1999b).

En 1996, PEMEX Refinación realizó estudios de evaluación en las refinerías de Madero, Minatitlán, Salamanca y Tula. Además de haber realizado estudios de sondeo y rehabilitado del terreno de la Ex - Refinería de Azcapotzalco, en la terminal marítima de Pajaritos y en la terminal de almacenamiento y distribución de Mexicali. También reporta estudios en 28 instalaciones e inicio del saneamiento de 2 estaciones de bombeo (Linares y Montemorelos); en 6 terminales de almacenamiento y distribución (Mérida, San Rafael, Arriaga, Guadalajara, Poza Rica y Mexicali); y la terminal marítima Pajaritos (PEMEX, 1997).

Dentro del programa de austeridad presupuestaria en la administración pública federal para el ejercicio fiscal 1999 se estableció que las actividades de acciones emergentes se realizarían sólo en caso de existir un riesgo tal que las justifique (DOF, 1999a), por lo que las actividades de saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos por parte de PEMEX se redujeron a aquellas que conllevaban un riesgo. Con esto 487 instalaciones de PEMEX se incorporaron al Programa Nacional de Autorregulación y Auditorías Ambientales (Profepa, 1999b).

Por otro lado, la Comisión Federal de Electricidad (CFE), empresa encargada de la generación, transmisión, distribución y comercialización de energía eléctrica en México depende en alrededor de un 60% de las plantas termoeléctricas que consumen básicamente combustóleo (CFE, 1999; IEA, 1999; Secretaría de Energía, 1999), por lo que requiere también del manejo de grandes volúmenes de hidrocarburos.

La propuesta presidencial del cambio estructural de la industria eléctrica en México (Palacio Nacional, 1999) permitirá la apertura a la inversión privada y la desincorporación de empresas públicas. En especial, las termoeléctricas serán desincorporadas, por lo que la responsabilidad ambiental quedará a cargo de las nuevas empresas privadas.

Otro sector importante es el de Ferrocarriles Nacionales de México (FNM) establecido desde 1937². Sus actividades involucran el almacenamiento y carga de diesel necesaria para la maquinaria de los trenes que emplean motor a diesel. Esta empresa está actualmente desincorporando sus activos³, en

² Acuerdo Presidencial de 23 de junio de 1937 (D.O., 1937) que expropia, por causa de utilidad pública, los bienes pertenecientes a la empresa Ferrocarriles Nacionales de México, S.A.

³ Decreto de 6 de noviembre de 1986 (D.O., 1986) por la que la Secretaría de comunicaciones y Transportes procederá a la negociación con las empresas que se mencionan, para la terminación anticipada de las concesiones que para explotar el transporte público ferroviario, sus servicios auxiliares y conexos disfrutaban dichas empresas. FNM a través de su unidad de

lo que se incluye la licitación de los talleres, los lugares de almacenamiento y zonas de vías de carga de diesel. Las nuevas empresas que operan y que operarán estas zonas tendrán a su cuidado la toma de medidas necesarias de prevención de la contaminación y de saneamiento en su caso, por lo que FNM está realizando actividades de limpieza del suelo y subsuelo, deslindándose de futuras responsabilidades de contaminación.

Desde 1993 FNM creó el Comité de Protección Ambiental para iniciar un plan maestro que contempló la realización de auditorías ambientales en las 56 instalaciones de FNM. A partir del programa de caracterización y análisis de áreas contaminadas se observó un 90% de contaminación por hidrocarburos de diesel y aceites en su mayoría. Esto determinó un programa de rehabilitación de 1995 al 2001 con un presupuesto estimado de 40 millones de dólares (Madrigal, 1998). Se siguen realizando actividades de remediación y prospección en algunos talleres de FNM, debido a la desincorporación casi total de FNM.

Son muchas las actividades industriales que emplean hidrocarburos, en México, se tienen registradas 51 actividades industriales⁴ que emplean al diesel en alguna etapa de su proceso, pero es de suponerse que existen más industrias que a una menor escala lo requieren, como es el caso de las plantas generadoras de energía empleadas en las distintas fábricas y centros de servicios (como hospitales, institutos de investigación y centros de cómputo de varias áreas de servicio) que requieren energía alterna – combustión interna con diesel industrial - debido a que no pueden detener sus operaciones por causa de una falla en el suministro.

Aunado a las actividades actuales se debe considerar que la utilización de hidrocarburos a nivel industrial data desde finales de siglo pasado – anterior a PEMEX – y que el empleo del diesel por los trenes con motor diesel y de combustóleo en las termoeléctricas ha tenido un progresivo incremento durante el desarrollo del presente siglo (Secretaría de Energía, 1999).

desincorporación de activos, en cumplimiento con las disposiciones que establece la ley general de bienes nacionales está convocando a varias licitaciones públicas para la venta de la industria ferroviaria nacional.

⁴ La identificación de las ramas - ya sea por consumo tanto como materia prima como combustible o por producción del compuesto - se basó en información de la Asociación Nacional de la Industria Química, A.C. (ANIQ, 1996), el Instituto Nacional de Ecología (Sistema Nacional de Información de Fuentes Fijas), la Secretaría de Salud y el Canadian Centre for Occupational Health and Safety (CHEMMINFO y Chemical Evaluation Search and Retrieval System).

2. Accidentes con hidrocarburos en México

Las nuevas tendencias tecnológicas requeridas para satisfacer las necesidades de las sociedades actuales demandan una elevada producción, almacenamiento, transporte y utilización de productos químicos, por lo que existe el riesgo potencial de que ocurran accidentes en alguna de estas etapas.

Durante el periodo junio de 1990 a diciembre de 1995 en México se registraron 36 accidentes en los que el diesel estuvo presente y 110 para el periodo de 1993 a 1996. Se han detectado al menos por su relevancia 51 actividades distintas que emplean diesel industrial en volúmenes importantes⁴.

Las principales emergencias ambientales asociadas con el manejo de hidrocarburos y los daños ocasionados en la República Mexicana se muestran en la Tabla 1.

3. Marco legal de la contaminación de suelos con hidrocarburos

De acuerdo con las últimas reformas de 1999⁵ a la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos con el fin de elevar a grado constitucional el derecho a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado se modificó el artículo 25. Este artículo incluye el papel dirigente que el Estado debe jugar sobre el desarrollo nacional teniendo cuidado con los recursos naturales y el ambiente al impulsar el desarrollo de las empresas para obtención de beneficios:

Art 25.

“Corresponde al Estado la rectoría del desarrollo nacional para garantizar que éste sea integral, que fortalezca la Soberanía de la Nación y su régimen democrático y que [...] permita el pleno ejercicio de la libertad y la dignidad de los individuos, grupos y clases sociales [...] Bajo criterios de equidad social y productividad se apoyará e impulsará a las empresas [...] en beneficio general, de los recursos productivos, cuidando su conservación y el medio ambiente.”

Del mismo modo, el artículo 27 reconoce al suelo como propiedad de la nación por lo que tiene ésta el derecho de imponer las medidas necesarias para cuidar y conservar el suelo además de preservar y restaurar el equilibrio ecológico:

⁵ La última reforma aplicada el 26/02/1999 en el primer periodo Ordinario de sesiones del año II de la LVII Legislatura de la Cámara de Diputados aprobó las reformas al artículo 25, las cuales todavía no han sido aprobadas por las legislaturas estatales.

Tabla 1. Emergencias ambientales asociadas con el manejo de hidrocarburos

Fecha del evento	Nombre del evento	Ubicación	Sustancia Involucrada	Causas	Daños
01/06/79 a 09/03/80	Ixtoc I	Sonda de campeche	Petróleo crudo	Incendio ocasionado por la salida de petróleo y gas a presión	Impacto ecológico ocasionado por la liberación de 140 MG de petróleo de los cuales se estima quedaron a la deriva 1,023
19/09/84	San Juan Ixhuatepec	San Juan Ixhuatepec, Méx.	Gas LP	Explosión de gas LP	650 defunciones; 2,500 lesionados y cuantiosos daños materiales
23/10/86	Abkatun	Bahía de Campeche, Ciudad del Carmen	Crudo	Pozo de producción Abkatun 91	10.4 MG derramados
22/04/92	Guadalajara	Guadalajara, Jal.	Gasolina	Presencia de gasolina en la red de alcantarillado	1,900 defunciones; 1,470 lesionados y cuantiosos daños materiales
16/02/95	Plátano y cacao	Ranchería de plátano y cacao, Tab.	Gas amargo y gasolina	Explosión ocasionada por fallas aparentes en la soldadura de la tubería	7 defunciones; 16 lesionados y 125 evacuados
26/07/96	Cactus	Reforma, Chis.	Etano plus licuado	Fuga de hidrocarburos líquidos durante trabajos de mantenimiento ocasionando explosión e incendio	6 defunciones, 9 lesionados y cuantiosos daños materiales
07/03/96	Termoeléctrica Adolfo López Mateos	Bahía de Campeche, Tuxpan, Ver.	Crudo	Fuga de un buque petrolero desconocido	10.6 MG derramados
11/11/96	San Juan Ixhuatepec	San Juan Ixhuatepec, Mex.	Gasolina	Derrame e incendio de gasolina en tanques de almacenamiento	4 defunciones y 15 lesionados

MG = Millones de Galones.

Fuente: PROFEPA (1999c) y The International Owners Pollution Federation Limited (1999).

Art 27.

“La propiedad de las tierras y aguas comprendidas dentro del territorio nacional corresponden originalmente a la Nación, la cual ha tenido el derecho de transmitir el dominio de ellas a los particulares, constituyendo la propiedad privada [...] La Nación tendrá en todo tiempo el derecho de imponer a la propiedad privada las modalidades que dicte el interés público, así como el de regular, en beneficio social, el aprovechamiento de los elementos naturales [...] con el objeto de hacer una distribución equitativa de la riqueza pública [y] cuidar de su conservación [...] En consecuencia se dictarán las medidas necesarias para [...] preservar y restaurar el equilibrio ecológico [...] y para evitar la destrucción de los elementos naturales y los daños que la propiedad pueda sufrir en perjuicio de la sociedad”

Debido a estas disposiciones constitucionales surge en 1988 (DOF, 1988) la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA) y sus reformas en 1996 (DOF, 1996) las cuales incluyen la definición legal de responsabilidad ambiental. Dicha Ley considera en varios artículos la protección al suelo como recurso natural en el ordenamiento ecológico y uso del suelo; en las facultades federales, estatales y municipales de protección del suelo; en las emisiones límites al suelo como instrumentación ecológica; en las áreas naturales protegidas; en los inventarios de emisiones al suelo; en la prevención y control de la contaminación del agua y del agua del subsuelo, entre otras.

En la LGEEPA se considera directamente la contaminación del suelo en Capítulo IV de *Prevención y Control de la Contaminación del Suelo* del Título IV de *Protección al Ambiente*. Este Capítulo estipula en el artículo 134 al establecer los criterios a seguir que:

“II. Corresponde al estado y la sociedad prevenir la contaminación del suelo”

“V. En los suelos contaminados por la presencia de materiales o residuos peligrosos, deberán llevarse a cabo las acciones necesarias para recuperar o restablecer sus condiciones, de tal manera que puedan ser utilizados en cualquier tipo de actividad prevista por el programa de desarrollo urbano o de ordenamiento ecológico que resulte aplicable”

Con esto se determina la corresponsabilidad de toda la sociedad de prevenir la contaminación del suelo y la obligación de limpieza de aquellos afectados los suelos por el derrame de sustancias

peligrosas. Los demás artículos del Capítulo IV relacionan a los residuos sólidos como la principal fuente de contaminación de los suelos por lo que les da prioridad y no profundiza en otras fuentes importantes de contaminación como el derrame de hidrocarburos en suelos.

Otro capítulo que involucra la limpieza del suelo es el de Materiales y Residuos Peligrosos el cual estipula en su artículo 152 bis que:

“Cuando la generación, manejo o disposición final de materiales o residuos peligrosos, produzca contaminación del suelo, los responsables de dichas operaciones deberán llevar a cabo las acciones necesarias para recuperar y restablecer las condiciones del mismo, con el propósito de que éste pueda ser destinado a alguna de las actividades previstas en el programa de desarrollo urbano o de ordenamiento ecológico que resulte aplicable, para el predio o zona respectiva.”

La LGEEPA también determina como medida de seguridad la clausura temporal, total o parcial de la industria, el aseguramiento precautorio del material peligroso y el tratamiento de los materiales que pongan en riesgo a la salud pública y el equilibrio ecológico. Sobre las sanciones administrativas no existen especificaciones para cada caso, pero se determina que serán sancionadas administrativamente a las violaciones a los preceptos de la LGEEPA, sus reglamentos y las disposiciones que de ella emanen con multas; clausura temporal o definitiva, total o parcial; arresto administrativo; decomisos; y la suspensión o revocación de las concesiones, licencias, permisos o autorizaciones correspondientes.

Por otro lado el Código Penal en sus artículos 414 al 423 en su Título XXV Capítulo I determina las sanciones relacionadas con el medio ambiente. Estas determinan la imposición de distintas sanciones dependiendo de la gravedad del caso o el riesgo a la salud pública o a los recursos naturales, el dolo y la cercanía a centro de población en caso de actividades altamente riesgosas. De estos artículos el 414, 415 y 416 se relacionan con la contaminación de suelos con hidrocarburos por el daño a la salud pública debido a la presencia de compuestos tóxicos y carcinógenos en el petróleo y sus derivados; y a la descarga, depósito e infiltración de líquidos químicos en los suelos.

Otra ley relacionada con la protección del subsuelo es la Ley de Aguas Nacionales que establece la protección, mejoramiento y conservación de los acuíferos. Pero no es precisa en cuanto a problemas de contaminación por derrames.

Debido a la falta de reglamentos y normas precisas en la problemática de los derrames de hidrocarburos en suelos se había empleado el criterio de residuo peligroso para los suelos contaminados con materiales que por su calidad se consideraban residuos. Es decir que la calidad del material en el derrame no permitía emplearlo nuevamente en el proceso que lo generó. Esto había conllevado al abuso del empleo de los criterios CRETIB.

La Profepa promovió la creación del "Grupo de Trabajo sobre Restauración de Sitios Contaminados con Materiales y Residuos Peligrosos", el cual propuso los "criterios interinos" de restauración de suelos contaminados (Cancino *et. al.*, 1998) como una respuesta a la falta de una normatividad que establezca los niveles de limpieza y los métodos de análisis adecuados, para evitar el empleo de normatividades extranjeras sin criterios fundamentados para elegir entre un amplio intervalo de concentraciones permisibles reportadas y el uso inadecuado de límites establecidos mediante evaluaciones de riesgo sin procedimientos uniformes.

Estos criterios fijaron la concentración del contaminante de acuerdo al uso de suelo como (1) agrícola, forestal y recreativo de conservación; (2) residencial y comercial; e (3) Industrial. Para el caso del diesel se fijó la concentración de hidrocarburos totales del petróleo en 1,000 mg/kg para los primeros dos tipos de suelo y de 2,000 mg/kg para el suelo industrial. De la misma forma se fijaron las concentraciones de cinco compuestos cancerígenos que puede contener el diesel (Saval, 1998b).

4. Las auditorías ambientales

Otras herramientas de gestión ambiental que se emplean frecuentemente son las auditorías ambientales y los sistemas de autorregulación ambiental. Durante la Cumbre Mundial de Río en 1992, el Consejo Empresarial para el Desarrollo Sostenible (BCSD) enfatizó que "el comercio y la industria necesitaban herramientas para ayudar a medir el desempeño ambiental y desarrollar técnicas de gestión ambiental". En respuesta a tales necesidades, la Organización Internacional de Normalización, ISO, fue especialmente requerida en el campo ambiental. Impulsada en parte por los requerimientos de "etiquetado ambiental" (ECO-labelling) de Europa oriental y las auditorías ambientales en Estados Unidos (Nuñez y Caparó, 1998).

En 1991, la ISO estableció un Grupo de Asesoría Estratégica sobre temas ambientales (SAGE), ésta creó el Comité Técnico 207 sobre Gestión Ambiental de la ISO y desarrollo 9 Normas Internacionales

(ISO), 3 Borradores de Normas Internacionales (DIS), 3 Borradores del Comité (CD), 1 Borrador de Trabajo (WD) y una Nueva Propuesta (NP) en las siguientes áreas (International Institute for Sustainable Development, 1996):

- Sistemas de gestión ambiental: Herramienta que a través de un método sistemático permite administrar los aspectos ambientales de una organización. Esta incluyen la "Verificación y Acciones Correctivas" como el monitoreo, cuantificación y registro de la contaminación del suelo.
- Auditoría ambiental e investigaciones ambientales
- Etiquetado ambiental
- Evaluación del desempeño ambiental
- Evaluación del ciclo de vida

Los estándares ISO1400 son instrumentos voluntarios que involucra tanto a la organización que la adopta como al ciclo de vida del o los productos. Estos aplican directamente en la industria del petróleo y otras industrias que manejen hidrocarburos que son potenciales de contaminación del suelo por derrames (Laurence, 1995).

En México las últimas modificaciones a la LGEEPA en los artículos 38, 38 bis, bis 1 y bis 2 introducen la figura de la Autorregulación y Auditorías Ambientales. Estos sistemas son de carácter voluntario y sus especificaciones deben encontrarse por arriba de las normadas. Unas de las ventajas de aplicarlos son la confidencial de la información generada - con excepción de terceros afectados - , el prestigio generado a través de la identificación de la "industria limpia" y la capacidad de desarrollar programas de acción. Además es una fuente potencial para realizar sistemas de ahorro de materias primas y energía (Bracamontes, 1995; Profepa, 1999a). Estos sistemas incluyen las medidas de restauración ambiental las cuales a su vez incluyen al saneamiento de sitios contaminados con hidrocarburos. En México se ha establecido el etiquetado "Auditoría Ambiental - Industria Limpia" por parte de la SEMARNAP. Es importante que en cada país se adecuen sus propios lineamientos debido a que los reglamentos entre países no comulgan en su totalidad (p. ej. En México no existe la "exclusión petrolera" establecida en Estados Unidos para "sustancias peligrosas" de la Sección 101(4) del CERCLA; "contaminante" en The Clean Water Act y exclusión de ciertos residuos en la industria petrolera por parte del RCRA).

C. Impactos al ambiente por derrames de hidrocarburos

La contaminación de ecosistemas terrestres no sólo afecta a la microbiota del suelo, sino a las macrocomunidades residentes. Los efectos adversos son más visibles en la flora que en la comunidad animal, por lo que existen más reportes en la literatura de efectos negativos en la flora que en la fauna (Bossert y Bartha, 1984).

1. Efectos en plantas

El modo en que el petróleo y sus derivados actúan sobre las plantas es complejo e involucra tanto el contacto tóxico como el deterioro indirecto por la interacción de los hidrocarburos con los componentes microbianos del suelo (Frankenberger, 1992). Los hidrocarburos con menor punto de ebullición presentan un alto grado de toxicidad por contacto con las porciones tiernas de la raíz y con los retoños de las plantas, pero tienen poco efecto en las partes verdes de los árboles y matorrales. La fracción volátil puede tener un alto poder de penetración produciendo efectos narcóticos (Frankenberger, 1992). La toxicidad al contacto ocurre en un inicio por el efecto disolvente de los hidrocarburos de bajo punto de ebullición sobre las membranas lipídicas de las células. Se reporta que el grado de toxicidad para las plantas en orden decreciente es: monoaromáticos; oleofinas y naftalenos; y parafinas. Dentro de cada clase, la toxicidad está directamente correlacionada con el aumento de la polaridad e inversamente correlacionada con la disminución del peso molecular. En suelos húmedos con adecuada capacidad de drenado, los hidrocarburos de bajo punto de ebullición son removidos fácilmente por efecto de la evaporación y lixiviación por lo que su duración es corta. Los efectos directos de los hidrocarburos incluyen el efecto de los ácidos nafténicos sobre el crecimiento (Bossert y Bartha, 1984).

Los efectos indirectos incluyen daños a la raíz de las plantas debido a la disminución del oxígeno en el suelo por los microorganismos degradadores de hidrocarburos, la reducción de espacios porosos ocupados comúnmente por agua y aire y la reducción de la actividad fotosintética por el contacto de los hidrocarburos con la superficie de hojas activas (Mendelsohn *et. al.*, 1990). Tales condiciones anaeróbicas pueden provocar la producción de compuestos fitotóxicos, como el H₂S. Los microorganismos degradadores compiten con las plantas por los nutrientes minerales. Los hidrocarburos también afectan la estructura física del suelo, disminuyendo su capacidad de almacenamiento de humedad y aire (Bossert y Bartha, 1984) y aumento de la capacidad de retención del agua (Odu, 1972).

En áreas inundadas por hidrocarburos, la vegetación herbácea muere inmediatamente. En cambio los efectos en los árboles y matorrales se manifiesta hasta varios meses después del derrame, especialmente en suelos de climas fríos presentando largos periodos de tiempo - en orden de años - para su restablecimiento. Para derrames donde las concentraciones son menores de 10,000 a 50,000 mg/kg, no se han observado efectos negativos e incluso a muy bajas concentraciones se ha reportado efectos benéficos debido a que los hidrocarburos actúan como hormonas de crecimiento y por el aumento en el contenido de humus y de la capacidad de retención de agua del suelo (Bossert y Bartha, 1984). Otros efectos benéficos debido a su descomposición incluyen el incremento de la estructura física (granulación), agregando estabilidad, capacidad de retención del agua y diversidad microbiana. También se ha observado que aumenta la tasa de fijación de nitrógeno por la presencia de bajas concentraciones de hidrocarburo (Frankenberger, 1992).

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

Durante el proceso de biodegradación de los hidrocarburos posiblemente se generen y acumulen momentáneamente compuestos intermediarios que sean más tóxicos para las plantas que los hidrocarburos mismos. Entre estos se citan a los ácidos grasos y materiales terpenoides (Bossert y Bartha, 1984).

En general, el efecto de los hidrocarburos sobre las plantas dependerá - además de la concentración y tipo de contaminante - de la diversidad de plantas presentes en el sitio, así como del clima y del tipo de suelo. Una mayor diversidad de plantas beneficiará al proceso de recuperación vegetal debido a su mayor potencial, las plantas con un sistema más profundo de raíces tendrá menos contacto que una planta con raíces tendidas en la superficie (Odu, 1972). Por otro lado, los climas más templados tienen una mayor ventaja de recuperación vegetal que los climas árticos y subárticos y los suelos más ricos en nutrientes y humus tendrán una mayor facilidad de recuperación (Bossert y Bartha, 1984).

2. Efectos en animales

Aunque los efectos en los animales no están tan documentados como en las plantas, se predicen varias alteraciones con base en las propiedades del petróleo y las características de los animales, especialmente de los invertebrados del suelo. Es posible que el estoma de los microantrópodos sea obstruido debido a la presencia de los hidrocarburos más pesados e interfiera en su respiración como lo sugiere el empleo de hidrocarburos para el control de las larvas acuáticas de los mosquitos. Otro efecto es la disminución del oxígeno en los espacios vacíos del suelo debido a su empleo en la actividad degradadora (Bossert y Bartha, 1984).

Los nemátodos en suelos pueden disminuir su población por arriba del 90% como consecuencia de los derrames de hidrocarburos (Raymond *et. al.*, 1976a).

Existen modelos – especialmente aplicados en ambientes marinos – que determinan a través de la LC_{50} (concentración letal para el 50 % de la población expuesta durante 96 h) la mortandad en animales. Esta mortandad está en función de la concentración de los hidrocarburos en la pluma contaminante, de la temperatura y el tiempo de exposición y afecta a una cadena alimenticia. Se estima existen otros efectos crónicos y daños a los animales (como al sistema reproductor) que pueden ocurrir, pero que se ignoran por su difícil cálculo. En sistemas costeros, la tasa de mortandad de aves expuestas se ha estimado en un 58% pero su incertidumbre es muy alta debido a que no se recuperan todas las aves muertas. En cambio los mamíferos como las focas y cetáceos muy ocasionalmente muestran bajas (French y French III, 1989; Reed y French, 1989).

En un estudio comparativo en sedimentos, Blackman. *et. al.* (1988) reportaron que distintas fuentes de hidrocarburos producen diferentes efectos sobre la biota. El diesel en este estudio provocó una mayor abundancia de gusanos tubulares (como *Polydora sp.*, *Pygospio sp* y *Malacoceros sp.*) y de algas, pero evaluado en su totalidad (24 especies integrantes de la fauna) redujo el número de especies animales (46%) , individuos (46 %) y diversidad comparado con el control.

3. Efecto en los microorganismos

Varios productos de la oxidación de los hidrocarburos aromáticos han demostrado ser más tóxicos que los hidrocarburos originales. Los hidrocarburos del petróleo pueden afectar poblaciones de algas

y protozoarios. Se han reportado disminución de las poblaciones de algas verdes y protozoarios ameboides y disminución de la actividad de fijación del nitrógeno o de la fotosíntesis en las algas.

La toxicidad de los hidrocarburos en suelo puede determinarse en términos de EC_{50} utilizando el analizador de toxicidad Microtox®. Este sistema emplea un bioensayo en el que las bacterias bioluminiscientes producen luz como resultado de cadenas de complejas reacciones bioquímicas productoras de energía. La inhibición en cualquier de las múltiples enzimas involucradas en el proceso provoca cambios en la tasa de emisión de luz. Este sistema considera efectos fisiológicos de un contaminante y no sólo la mortalidad, pero aplica solamente a la fracción soluble en agua del extracto de suelo (Frankenberger, 1992; Roger *et. al.*, 1993).

Otro sistema emplea a la deshidrogenasa del suelo para monitorear la actividad biológica del suelo por influencia del petróleo y sus derivados. La actividad de la dehidrogenasa en el suelo contaminado depende de la cantidad y tipo de petróleo o sus derivados adicionados (Frankenberger, 1992).

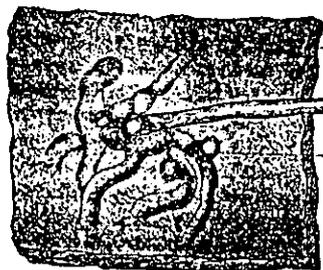
La adición de bajas concentraciones de hidrocarburos ha demostrado tener un efecto benéfico en la actividad microbiana en el suelo (p. ej. Odu, 1972 reporta una concentración de 0.5%), pero tóxico a concentraciones más elevadas. La microflora autóctona se adapta a la presencia de hidrocarburos después de pasar por un periodo de tiempo en el que usualmente se presenta una disminución en el conteo en placa de los microorganismos y de la actividad del suelo medida como producción de CO_2 (Odu, 1972).

D. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo

La microbiología de la degradación de hidrocarburos del petróleo se inició en 1895 cuando Miyoshi publicó el primer trabajo de degradación de hidrocarburos por hongos (ver figura 1), pero fue hasta 1913 que se aislaron bacterias del suelo capaces de degradar hidrocarburos. En su inicio – los años treinta - se emplearon los conocimientos de la microbiología del petróleo como una herramienta en la prospección petrolera y la protección de los ductos, tanques y equipo de perforación de la "corrosión" ocasionado por la actividad bacteriana. En estos tiempos los esfuerzos se enfocaron a "matar" o inhibir a los microorganismos de las reservas petroleras, tanques de almacenamiento de productos del petróleo, lodos de perforación, refrigerantes emulsionados de petróleo y de las aguas empleadas en la segunda recuperación de productos (Davis, 1967).

En 1946, Claude E. ZoBell revisó la acción de los microorganismos sobre los hidrocarburos. Él reconoció que muchos microorganismos tienen la capacidad de utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía y que están ampliamente distribuidos en la naturaleza (Atlas, 1981). Por su parte, Iz'yuva Gigiena Saint (1952 y 1958) observó la estimulación de la biodegradación por adición de fuentes de nitrógeno y fósforo como nutrientes indispensables, esto en función de la temperatura y la aireación (Atlas y Bartha, 1972). A partir de los años sesenta se intensificaron los estudios con miras a la producción de biomasa como proteína celular (Einsele, 1985). Durante los años sesenta y comienzo de los setenta se publicaron algunos trabajos importantes por tratar las consecuencias químicas, físicas y microbiológicas de las propiedades del suelo (Ellis y Adams, 1961); efecto de los hidrocarburos del petróleo en suelos y cultivos (Schwendinger, 1968); y evaluar efectos del petróleo en el suelo, plantas y cultivos y establecer el problema de desbalance de la relación C/N (Odu, 1972). Pero fue hasta 1979 en que Dibble y Bartha publicaron el primer tratado de la degradación de hidrocarburos en suelos - como aplicación de lodos - por medio de la modificación de las condiciones ambientales para alcanzar mayores tasas de degradación. De acuerdo con la mayoría de las revisiones publicadas, éste fue el primer trabajo que enfocó la biodegradación de hidrocarburos a la solución a los problemas ambientales.

E. Mit Paraffin imprägnirte Cellulosehaut. — Sowohl eine 0,05 mm, als auch eine 0,1 mm dicke Haut wurde



von *Botrytis cinerea* durchbohrt; die dünnere nach 1 1/2 Tagen, die dickere nach einigen Tagen. Fig. 2 giebt ein Bild von einer solchen Durchbohrung.

Vielleicht spielt hier die fettspaltende Eigenschaft der Pilze¹⁾ eine Rolle mit. Jedenfalls aber haben die Hyphen von *Botrytis* die Fähigkeit, in Paraffin sich etwas einzuarbeiten. Denn ein solches Eindringen fand sich auch dann, als ich eine dünne Paraffinschicht zwischen Gelatine gebracht und in die obere Gelatineschicht Sporen ausgesät hatte.

Fig. 2. Durchbohrung der Hyphen von *Botrytis cinerea* durch eine mit Paraffin imprägnirte Cellulosehaut. Gesehen 36 Stunden nach Aussaat der Sporen. a Haut; b durchgehende Hyphe; c Haftorgan. Die Durchbohrungsstelle ist hier deutlich sichtbar. Die Figur stellt die Unterseite dar; alle markirten Hyphentheile liegen jenseits der Haut. Vergr. 305.

Figura 1. Extracto del primer reporte de degradación de hidrocarburos con microorganismos (Miyoshi, 1895).

La biodegradación de hidrocarburos por las poblaciones microbianas nativas representan uno de los principales mecanismos por el cual el petróleo ha sido eliminado del ambiente. Es debido a esto que

se han realizado varias revisiones y estudios sobre este tema de interés (Leahy y Colwell, 1990). Los principales factores identificados para el suelo - agrupados como físicos y químicos; y biológicos - se describen a continuación.

1. Factores físicos y químicos que afectan la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo

1.1. Tipo de suelo: textura, densidad aparente, densidad real y porosidad

La mayoría de suelos sin alteración muestran propiedades heterogéneas y anisótropas, es decir que tanto su composición como sus propiedades - en magnitud y dirección - varían de un punto a otro. El proceso típico de formación de los suelos permite la creación de capas o estratos por lo que su variabilidad tiende a ser más alta con respecto a la profundidad que en desplazamiento horizontal.

El desarrollo de determinada técnica de remediación y su realización *in-situ* o fuera del sitio dependerá en gran parte de las propiedades del suelo y de las características de la contaminación. Existen variables como el pH, contenido de humedad y nutrientes cuya modificación no presenta generalmente un costo elevado comparado con su efecto benéfico a la técnica de remediación. Sin embargo, existen propiedades que no son factibles de ajustar como la distribución del tamaño de partícula y su homogeneidad, la densidad, la permeabilidad y el contenido de materia orgánica.

Suelos con permeabilidades mayores a 10^{-4} cm/s y con una moderada homogeneidad son buenos candidatos para la remediación *in-situ*. En cambio, suelos con permeabilidad muy baja y/o con grandes variaciones pueden limitar el movimiento de fluidos necesarios para los tratamientos *in-situ*, como la extracción con vapor o la inyección de nutrientes en la biorremediación *in-situ* (Rogers *et. al.*, 1993; USEPA, 1997).

Un suelo ideal para la biorremediación debe tener textura tipo arenosa con alta porosidad para que permita la difusión de oxígeno. Esta alta porosidad permitirá una adecuada aireación para la oxidación de hidrocarburos, pero debe tener suficiente limo y arcilla en la matriz del suelo para que se garantice una adecuada humedad con una apropiada capacidad de retención del agua (Frankenberger, 1992).

La textura, densidad aparente y la porosidad afectarán a la biota del suelo ya que estas propiedades determinan los espacios vacíos disponibles y el tamaño de los poros para el desarrollo de los organismos del suelo. Si un suelo aumenta su porción de arcillas tendrá una mayor porosidad, pero de menor tamaño de poro y una densidad aparente más baja debido al arreglo del tamaño de partículas cada vez más pequeñas. Como ejemplo se muestra la distribución de volúmenes para un suelo tipo migajón-arenoso a distintas densidades aparentes.

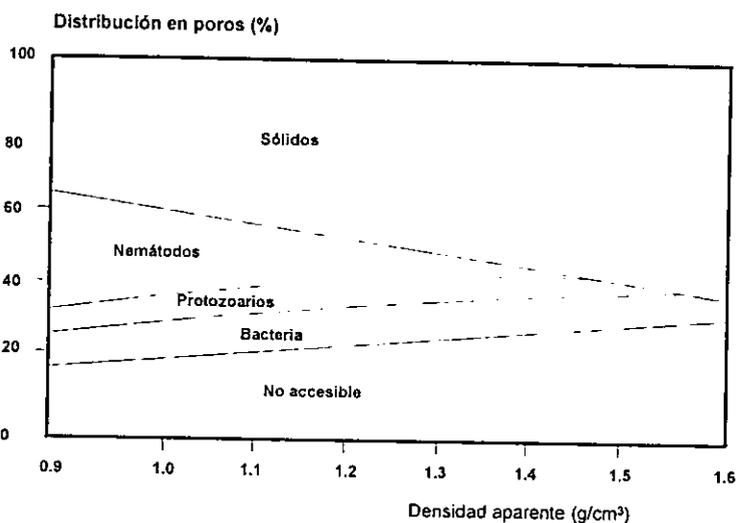


Figura 2. Distribución del volumen de poro para un suelo tipo migajón-arenoso a distintas densidades aparentes (suponiendo diámetros de $30\mu\text{m}$ >protozoario> $5\mu\text{m}$ >bacterias> $0.2\mu\text{m}$ >no accesible) (Juma, 1998)⁶.

1.2. Composición química de los hidrocarburos presentes

La tasa de degradación varía de acuerdo con la composición de los hidrocarburos presentes. Los hidrocarburos del petróleo pueden dividirse en cuatro clases: saturados; aromáticos; asfaltenos (fenoles, ácido grasos, cetonas, ésteres y porfirinas); y resinas (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos y amidas) (Jobson *et. al.*, 1974; Leahy y Colwell, 1990).

⁶ Original de Van der Linden, A. M. A., Jeurissen, L. J. J., Van Veen, J. A. y Schippers, B. 1989. Turnover of the soil microbial biomass as influenced by soil compaction. en Hensen, J. A. y Hendriksen, K. (eds.), Nitrogen in organic Wastes Applied to Sils. Academic Press, London pp. 25-36.

Aunque la tasa de degradación depende de las condiciones de experimentación, se acepta que el orden de decrecimiento de la susceptibilidad a la biodegradación ocurre de compuestos de menor a mayor peso molecular; de alcanos lineales a aromáticos; y de alcanos lineales a ramificados, estos últimos – denominados isoprenoides - son reconocidos por su baja degradación por lo que se utilizan como compuestos de referencia (p. ej. fitano, pristano y hopano). Los asfaltenos y resinas han presentado por lo general muy baja susceptibilidad a la actividad de degradación. La heterogeneidad entre la composición del petróleo y sus derivados dependiendo de su procedencia y el tiempo de extracción (Leahy y Colwell, 1990).

Aunque los datos de composición varían grandemente según la procedencia y la fecha de extracción, se muestran – sólo con el fin de ejemplificar - los porcentajes de la composición observados en algunos derivados del petróleo.

Tabla 2. Composición de algunos derivados del petróleo

Producto	Composición %			
	Saturados	Aromáticos	Polar	No. Carbonos
Turbosina	83.0	15.7	1.3	C ₉ – C ₁₇
Lubricante	62.5	32.9	1.9	C ₉ – C ₂₂
Diesel	53.7	45.0	1.3	C ₉ – C ₂₃
Buncker C	52.6	35.0	12.4	No Reportado

Fuente: Song *et. al.*, 1990

1.3. Estado físico de los hidrocarburos

El tipo de combustible y las propiedades físicas y químicas del suelo influyen en la migración de los hidrocarburos y en el estado físico en que se encuentren. Los tipos de hidrocarburos presentes definirán su grado de hidrofobicidad reflejado en el coeficiente octano/agua, mientras el tipo de suelo determinará el contenido de materia orgánica y con ello su afinidad por los hidrocarburos. Aquellos más volátiles en especial con número de carbonos menor a cinco estarán preferentemente en fase gaseosa bajo condiciones normales, los compuestos de mayor número de carbonos se repartirán en el agua subterránea, en los espacios vacíos ocupados por aire y en el suelo dependiendo de su solubilidad, adsorción y de la constante de la ley de Henry.

Los hidrocarburos se caracterizan por su baja solubilidad en agua disminuyendo al aumentar su peso molecular. Los valores reportados no siempre coinciden debido a que no se mantienen constantes todas las variables que afectan la solubilidad. La composición, temperatura, salinidad y la relación de volúmenes agua/hidrocarburos son los principales factores que afectan la variación, aunque también afecta – disminuyendo la concentración en agua - la evaporación, fotólisis, disolución y biodegradación en el desarrollo de las pruebas de solubilidad (Shou *et. al.*, 1990).

La falta de reproducibilidad durante la cuantificación de hidrocarburos se le atribuye al método analítico empleado y al sistema de extracción de los hidrocarburos en la matriz del suelo. Los métodos analíticos pueden ser por gravimetría, espectrometría en infrarrojo, fluorescencia ultravioleta, cromatografía líquida, cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. Mientras que los sistemas de extracción comúnmente son purga y trampa, extracción en líquido y acarreo. El problema radica en que no existe un método que sea igualmente eficiente para todos los hidrocarburos, sean compuestos volátiles, semivolátiles y no volátiles (Shou *et. al.*, 1990).

Uno de los estudios más completos (Shou *et. al.*, 1990) muestra la gran influencia de la relación de los volúmenes agua/hidrocarburo, por ejemplo cambiar la razón de volúmenes de 5 a 10,000 produce una concentración en agua de 40 a 2 en el crudo, de 240 a 30 en gasolina, de 1 a 0.5 en Bunker residual y para diesel de 24 a 3 mg/l. Aunque el diesel se reporta bajo condiciones normales y relación volumétrica de 1:20 a menos de 10 mg/l (Murray *et. al.*, 1984).

La presencia de hidrocarburos más solubles permitirá exponer a los microorganismos a concentraciones más altas, pudiendo alcanzar efectos inhibitorios debido a su toxicidad (Frankenberger, 1992).

La constante de la Ley de Henry es una característica de cada compuesto, ésta toma en cuenta el peso molecular, la solubilidad y la presión de vapor e indica el grado de volatilidad de un compuesto en una solución. Cuando un hidrocarburo tiene alta solubilidad en el agua con relación a su presión de vapor, el compuesto se disolverá, pero cuando la presión de vapor es relativamente alta con respecto a su solubilidad en agua, la constante de la ley de Henry también será alta y el hidrocarburo se evaporará (ATSDR, 1992).

Tabla 3. Valores de la constante de la ley de Henry

Volatilidad	atm-m ³ /mol
No volátil	< 3 x 10 ⁻⁷
Baja volatilidad	3 x 10 ⁻⁷ a 1 x 10 ⁻⁵
Volatilidad moderada	1 x 10 ⁻⁵ a 1x10 ⁻³
Alta volatilidad	> 1x10 ⁻³

Fuente: ATSDR, 1992.

Una característica típica de migración de los hidrocarburos es – inicialmente – el movimiento vertical de los hidrocarburos en el suelo, hasta que alcanza el nivel del agua subterránea, después es una dispersión horizontal. La infiltración hacia el subsuelo reduce la evaporación de los hidrocarburos volátiles, los cuales pueden ser tóxicos para los microorganismos. Las partículas del suelo pueden reducir por absorción la toxicidad efectiva de los compuestos del petróleo, pero la absorción y adsorción por las sustancias húmicas probablemente contribuyan a la formación de residuos persistentes (Bossert y Bartha, 1984).

1.4. Concentración del petróleo y sus derivados

La degradación de los hidrocarburos en suelos se realiza a través de su dilución en agua para su asimilación, por lo que su concentración en agua será un factor importante en la magnitud del efecto para cada hidrocarburo. Los hidrocarburos más ligeros presentan una mayor solubilidad reportándose cinéticas tipo Michaelis-Menten. En cambio los hidrocarburos de mayor peso molecular presentan como una limitante la disolución en agua para su posterior degradación, por lo que generalmente no se adecuan a las cinéticas típicas de reacción (Leahy y Colwell, 1990).

La exposición de los microorganismos del suelo a altas concentraciones de hidrocarburos causan la inhibición de la biodegradación por un desbalance de los nutrientes y oxígeno disponible en relación a la fuente de carbono, produciéndose condiciones limitantes; por el impedimento estérico a que se someten los nutrientes que requieren estar en solución o en forma de gas accesible a los microorganismos; y por el efecto tóxico al exponerse a los microorganismos a concentraciones por arriba de su capacidad de degradación (Leahy y Colwell, 1990).

Es debido a esto que se ha desarrollado el concepto de concentración máxima o umbral, el cual varía de acuerdo con la capacidad degradadora que cada tipo de suelo (p. ej. Dibble y Bartha, 1979

reportaron un umbral de 100,000 mg/kg para crudo). Las concentraciones que disminuyen la actividad, los umbrales de inhibición con respecto al control y sus explicaciones se amplían en el apartado IV de Resultados y Discusión.

1.5. Adsorción, desorción y biodisponibilidad

La biodisponibilidad de los hidrocarburos para los microorganismos dependerá del tipo de hidrocarburo y de las propiedades del suelo como la adsorción en la superficie de las partículas del suelo, disolución en los constituyentes naturales del suelo (p. ej. ácidos húmicos) e interacción con la superficie mineral, entre otros.

Algunas soluciones a este problema ha llevado al empleo de compuestos que ayuden a los hidrocarburos para que pasen de estar adsorbidos a solubilizados, estos incluyen surfactantes (aniónicos, iónicos y no-iónicos), biosurfactantes, cosolventes y sales inorgánicas (pirofosfatos) (Müller-Markgraf, 1995). El empleo de estas sustancias se ha cuestionado por incrementar su concentración a niveles tóxicos; por deteriorar el control de la migración de los contaminantes de un sitio específico a contaminar un mayor volumen; por disolver un contaminante, lixiviarlo y favorecer su migración para contaminar agua subterránea limpia; por modificar las propiedades del suelo, con lo cual se puede complicar su remediación y restauración; por brindar una fuente alterna de carbono que produzca una presión de selección distinta a la deseada para la degradación de hidrocarburos disminuyendo la actividad degradadora; y por introducir una sustancia al suelo que puede considerarse un "contaminante" más.

1.6. Temperatura

La temperatura influye en la biodegradación de los hidrocarburos por su efecto en la actividad degradadora, composición de la comunidad microbiana y efectos en la naturaleza física y composición química del petróleo y sus derivados (Atlas, 1981).

A bajas temperaturas la viscosidad de los hidrocarburos aumenta, la volatilización de los alcanos de cadena corta se reduce y aumenta su solubilidad en agua afectando su biodegradación. Las tasa de degradación generalmente aumentan con incrementos en la temperatura. Esto es posible debido al aumento en las tasas de la actividad enzimática o del factor Q_{10} . De este último – factor que representa la tasa de aumento de utilización de sustrato por un aumento en 10°C - se han reportado valores de 1.7 y 2.3 para suelo (Bossert y Bartha, 1984). La región para mayor degradación de

hidrocarburos se reporta entre 18 a 30 °C ó de 24 a 30°C (Bossert y Bartha, 1984; Frankenberger, 1992). Arriba de 40 °C se ha reportado un aumento de la toxicidad a la membrana, pero se han logrado aislar microorganismos degradadores entre -1 y 70 °C (Frankenberger, 1992).

En zonas polares típicamente se han reportado condiciones limitantes por la baja temperatura. En el mundo existen condiciones ambientales extremas como en los valles secos llegando a alcanzar -40°C y en desiertos calientes de arena hasta 65°C (Bossert y Bartha, 1984). Los cambios climáticos y de estaciones seleccionan de manera natural a las poblaciones de los microorganismos degradadores de hidrocarburos los cuales se adaptan a las temperaturas ambientales (Leahy y Colwell, 1990).

Los estudios a nivel laboratorio sobre el efecto de la temperatura requieren ser validados en campo debido a la gran diferencia del efecto causado por las fluctuaciones de temperatura durante las 24 horas del día comparada con una ponderada empleada en el proceso de incubación controlada (Dibble y Bartha, 1979). Estos cambios de temperatura dependerán de la humedad del suelo, debido al alto poder calorífico del agua, los suelos más húmedos son menos sensibles a los cambios diurnos que los secos. Otros factores que afectan la temperatura del suelo incluyen su superficie expuesta, su color, inclinación del suelo e inclinación de la sombra (Sims *et. al.*, 1990).

1.7. Oxígeno y otros aceptores de electrones

En la zona vadosa o no saturada con agua, la respiración microbiana, la de las raíces de las plantas y la respiración de otros organismos consume el oxígeno de la atmósfera del suelo y lo enriquece con bióxido de carbono. Aunque estos gases se difunden e intercambian con los de la atmósfera del aire, la concentración en la atmósfera del suelo siempre es menor. El contenido de arcillas y la presencia de materia orgánica afecta a la concentración de oxígeno en el suelo. La primera por retener humedad que evita la difusión de oxígeno y la segunda por incrementar la actividad microbiana que consume el oxígeno (Sims, *et. al.*, 1990).

La pérdida del oxígeno como aceptor de electrones induce a cambios en la actividad y composición de la población microbiana. Algunos microorganismos facultativos pueden cambiar al aceptor de electrones que esté disponible en el medio, mientras que los otros microorganismos sin capacidad de hacerlo serán desplazados (Sims, *et. al.*, 1990).

Se han reportado estudios de degradación en condiciones aerobias, anaerobias y anóxicas. En el primer caso se ha demostrado una mayor actividad degradadora y mayor eficiencia en un menor tiempo (Frankenberger, 1992). Por esto tradicionalmente se ha preferido operar en condiciones aeróbicas, pero en aquellos casos en los que no se justifique la introducción de oxígeno molecular – por problemas técnicos y/o financieros – se ha suministrado con éxito otras fuentes alternas de aceptores de electrones. Estas fuentes son entidades inorgánicas como SO_4^{2-} , NO_2^- y NO_3^- que operan principalmente bajo condiciones anóxicas. También se ha observado degradación anaeróbica con la producción de bióxido de carbono y metano bajo condiciones metanógenas (Leahy y Colwell, 1990; Frankenberger, 1992) e incluso se ha reportado degradación a -220 mV de potencial REDOX (Bossert y Bartha, 1984).

Algunos valores de potencial de óxido-reducción se presentan en la Tabla 4 para algunos aceptores de electrones dentro de las condiciones aeróbica, anóxica y anaeróbica reportadas en la literatura. Estas condiciones están acompañadas por los productos metabólicos observados para cada condición. Estos productos sirven para determinar el proceso que impera en todo el sistema del suelo degradador.

Tabla 4. Condiciones de operación de acuerdo al aceptor de electrones y potencial REDOX

Condición	Principal aceptor de electrones	Aire/ O_2	Productos	Potencial REDOX (mV)
Aerobia	Oxígeno molecular	>10% (v/v) de aire en poros	CO_2 y H_2O	+810
Anóxica	NO_3^- , Desnitrificación Reducción de NO_3^- y Mn^{4+} Reducción de Fe^{3+} SO_4^{2-} , Sulfatorreducción		H_2S y N_2	+750 +300 a +100 +100 a -100 -220 -240
Anaerobia	CO_2 , metanogénesis	< 1% (v/v) de O_2	CH_4	Menor a -240

Fuente: Gordon, *et. al.*, 1980; Rogers, *et. al.*, 1993; Sims, *et. al.*, 1990.

Por otro lado estudios a nivel laboratorio empleando varias concentraciones de oxígeno no han demostrado toxicidad (Zhou y Crawford, 1995). Probablemente esto se deba a que la tasa específica de consumo por los microorganismos degradadores de los hidrocarburos es mucho mayor que el coeficiente de transferencia líquido-gas del oxígeno, por lo que se mitiga su efecto tóxico (Müller-Markgraf, 1995).

1.8. Nutrientes

La introducción de hidrocarburos en el suelo genera un desbalance en los nutrientes inorgánicos produciéndose – generalmente – altas relaciones carbono/nitrógeno y carbono/fósforo las cuales son negativas para el crecimiento microbiano.

El nitrógeno amoniacal es una pieza clave para la síntesis de aminoácidos, proteínas, purinas, ácidos nucleicos, aminoazúcares y vitaminas, así también el fósforo se requiere para la producción de ATP, ácidos nucleicos, fosfolípidos y ácido teicóico (en algunas bacterias gram +).

Por lo anterior la adición de sales de amonio y de fósforo aceleran la tasa de biodegradación, aunque en varios estudios no se han observado efectos o los efectos han sido a largo plazo e incluso negativos. Estos resultados contradictorios posiblemente se deban a la variabilidad y compleja composición de los suelos y a otros factores como reservas de nitrógeno que no fueron considerados (Bossert y Bartha, 1984; Leahy y Colwell, 1990). Este punto se discute con mayor profundidad y ejemplifica con valores en el apartado IV Resultados y Discusión.

La adición de micronutrientes en estudios de biodegradación en suelos no han reflejado efectos claros atribuibles a un determinado micronutriente ya que por lo general éstos se encuentran presentes en el suelo (Dibble y Bartha, 1976; Dibble y Bartha, 1979; Bossert y Bartha, 1984).

1.9. Salinidad

Aunque esta variable cobra mayor importancia en aguas salinas, es importante tomarla en cuenta en suelos que presentan evidencia de salinidad. Se ha reportado que un aumento en la salinidad de 3.3 a 28.4% disminuye la tasa de degradación de hidrocarburos (Leahy y Colwell, 1990), se recomienda mantener la concentración de sales solubles menor a 4 dS/m (Frankenberger, 1992).

1.10. Humedad

El agua sirve como medio de transporte a través del cual los nutrientes y los compuestos orgánicos se difunden hasta llegar a las células microbianas y los residuos metabólicos son eliminados. El agua en el suelo además de afectar la aireación influye en la cantidad y naturaleza de los materiales solubles, la presión osmótica y el pH (Sims, *et. al*, 1990).

La actividad o potencial del agua puede abarcar en suelos valores entre 0.0 y 0.99 (Bossert y Bartha, 1984). Ésta puede limitar el crecimiento y metabolismo microbiano disminuyendo con ello la actividad degradadora.

Una manera común de expresar la cantidad de agua en el suelo es a través del porcentaje de la humedad con respecto a la Capacidad de Retención del Agua (CRA) (Frankenberger, 1992). A porcentajes cercanos o mayores al 100 % de la CRA (saturados o sobresaturados) se limita la transferencia de gases a la matriz del suelo para la degradación aeróbica de los hidrocarburos debido a que los espacios vacíos del suelo se encuentran totalmente ocupados por agua (Frankenberger, 1992). Mientras que valores cercanos o menores al 10% las fuerzas osmóticas y matriciales del suelo reducen la biodisponibilidad de agua para los microorganismos a tal grado que la actividad metabólica se vuelve marginal (Bossert y Bartha, 1984). Una región considerada como óptima es del 50 al 70% de la CRA, pero dependerá de las características del sitio (Sims *et. al.*, 1990; Frankenberger, 1992; Loehr, 1992).

1.12. pH

Los distintos tipos de suelos pueden presentar una gran variedad de valores de pH reportándose valores extremos desde 2.5 en minas hasta 11.0 en desiertos alcalinos (Bossert y Bartha, 1984). El crecimiento bacteriano se favorece a pH neutros y ligeramente alcalinos (6.5 a 7.5) y el de hongos a pH más ácido entre 3 y 5 (Pelczar *et. al.*, 1982). En general se ha observado que valores de pH ligeramente arriba de 7 hasta 8 mejora la actividad degradadora de hidrocarburos por bacterias en suelo (Dibble y Bartha, 1979; Rogers, *et. al.*, 1993; Kästner *et. al.*, 1998). Estudios experimentales han observado inhibición de la biodegradación a valores de pH arriba de 9.5 (Leahy y Colwell, 1990; Frankenberger, 1992).

El pH también tiene efecto en la disponibilidad de nutrientes y de contaminantes y puede variar por la presencia de hidrocarburos y de sales. La solubilidad del fósforo se maximiza a pH de 6.5,

mientras que el plomo se encuentra menos soluble a pH de 7 a 8 (Sims *et. al.*, 1990; Frankenbeger, 1992). En general para minimizar el transporte de metales se recomienda un pH mayor a 6 (Sims *et. al.*, 1990). La introducción de hidrocarburos en el suelo ha provocado una disminución drástica del pH del suelo hasta de 3 unidades (Bossert y Bartha, 1984), mientras que la adición de las sales de amonio, nitritos y nitratos pueden acidificar el suelo y las sales de fosfatos pueden actuar como un sistema amortiguador para el pH dependiendo de la relación de concentraciones de sus sales conjugadas (Gary, 1993).

2. Factores biológicos que afectan la biodegradación de hidrocarburos

2.1. Bacterias degradadoras y otros microorganismos

Para la biodegradación del petróleo o sus derivados son necesarias las poblaciones mixtas que aseguren una actividad enzimática capaz de biodegradar todos los hidrocarburos presentes, en vez de un único organismo con una región limitada de sustratos (Leahy y Colwell, 1990; Bouchez, *et. al.* 1995).

Los reportes del porcentaje de las bacterias y hongos presentes en suelos varían grandemente de un 0.13 a un 50 % para bacterias y de un 6 a un 82 % para hongos con respecto a la comunidad heterótrofa total del suelo. Esta dependerá de las condiciones del sitio (Leahy y Colwell, 1990) y de las condiciones de cultivo que se utilicen para la cuantificación. La cantidad "típica" de microorganismos en suelo presenta una cuenta total de 10^7 a 10^9 UFC por gramo de suelo; cuenta de degradadoras potenciales de 10^5 a 10^6 para suelos no contaminados; y cuenta de degradadoras de 10^6 a 10^8 para suelos contaminados (Bossert y Bartha, 1984).

Recopilaciones citadas por (Leahy y Colwell, 1990) muestran 25 géneros diferentes de bacterias degradadoras de hidrocarburos y 31 de hongos. Entre los principales se citan: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Anthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* y *Pseudomonas* para bacterias y *Aurogebasidium*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces* para hongos. En el único estudio comparativo citado en dicha recopilación se observó que las bacterias participaron en un 82% en la degradación de n-hexadecano y los hongos con un 13%, esta relación depende del manejo de las condiciones microambientales. Por otro lado, también se citan algunos estudios que observaron degradación por parte de algas y protozoarios (Leahy y Colwell, 1990).

2.2. Adaptación

El proceso de adaptación determinará la rapidez de degradación de los hidrocarburos introducidos en suelos. Los tres mecanismos propuestos para la adaptación son:

- i) Inducción o represión de enzimas específicas.
- ii) Cambios genéticos que resultan en nuevas capacidades metabólicas
- iii) Enriquecimiento selectivo de los organismos capaces de transformar el o los compuestos de interés.

De estos tres mecanismos, el tercero ha sido el más documentado en la literatura debido a las limitaciones impuestas por los métodos disponibles. El aumento en el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos y su fracción con respecto a la comunidad heterótrofa ha sido indicativo de la adaptación de la microflora nativa a los hidrocarburos. Incluso se ha reportado la aclimatación cruzada por hidrocarburos poliaromáticos de estructura semejantes debido a la existencia de rutas de degradación comunes para varios hidrocarburos y a la amplia selección de poblaciones microbianas (Leahy y Colwell, 1990).

La amplificación de los genes que están involucrados en el metabolismo de contaminantes químicos – enriquecimiento selectivo y mutación y transferencia de genes - es el primer mecanismo genético para la adaptación de la comunidad microbiana. El monitoreo de estos procesos con respecto a la adaptación a los hidrocarburos ha sido posible por el desarrollo de pruebas de ADN para genes que codifican rutas catabólicas específicas. Esto ha permitido la detección directa de genes catabólicos involucrados en la síntesis de enzimas de las vías metabólicas de hidrocarburos conocidos, por ejemplo, tolueno (*xylE*), naftaleno (*ndoB*) y dodecano (*alkB*) (Leahy y Colwell, 1990; Saval, 1998c y Milcic-Terzic, J et. al., 2000).

2.3 Inhibición de la biodegradación

Aunque los productos finales de la mineralización de hidrocarburos son CO₂, H₂O y biomasa celular, la biodegradación de hidrocarburos de alto peso molecular puede producir intermediarios que pueden acumularse a niveles inhibitorios para la actividad microbiana. La degradación de compuestos aromáticos puede producir intermediarios de ácidos benzóico y fenólico. Se ha reportado la acumulación de derivados salicílicos que han limitado la degradación de naftalenos; de ácido láurico que limita la degradación de n-hexadecano; de n-alcanos de cadena larga en la degradación de crudo; y de alcoholes en la degradación de alcanos (Frankenbeger, 1992).

También se ha reportado efectos adversos en la degradación por la presencia de Pb, Zn, Cr, Ni, y Cd a 400 mg/kg en suelos. Dependiendo de la procedencia de las gasolinas y diesel se ha encontrado – en especial en gasolinas antiguas que empleaban como aditivo al tetraetilo de plomo – concentraciones relativamente altas de Pb entre 75 y 7,500 mg/kg. Mientras que en aceites de motor se ha encontrado concentraciones de 13,000 mg/kg de Pb; 2,500 de Zn; 50 de Cu; 20 de Cr, 5 de Ni, y 0.1 de Cd (Frankenberger, 1992).

La presencia de altas concentraciones de plomo en el suelo causa cambios en la comunidad microbiana (p. ej. evidentes reducciones poblacionales a 5 000 mg/kg). Los suelos generalmente contienen entre 15 y 100 mg/kg de plomo en forma natural. El ajuste del pH entre 7 y 8 para favorecer la biodegradación bacteriana, también disminuye su solubilidad. En general el aumento en el pH y del contenido de humus disminuye la biodisponibilidad del plomo. Además que este puede inmovilizarse y estar asociado principalmente con las membranas celulares pero no con la fracción citoplasmática. La biodisponibilidad de Cd es comúnmente - a las mismas concentraciones - mayor a la del Pb. Sin embargo, se ha observado inhibición de la biodegradación de diesel a concentraciones bajas de 10, 100 y 1,000 mg/kg de Pb y a 1,000 mg/kg de Cd (Frankenberger, 1992).

D. Metodología de Superficie de Respuesta (MSR)

Box y Wilson desarrollaron y describieron por primera vez la MSR en 1951 con la publicación de un artículo en el cual intentaban encontrar el menor número posible de observaciones para alcanzar un óptimo (Box y Wilson, 1951). Las contribuciones de Box y sus asociados en la década siguiente permitieron el desarrollo de las ideas fundamentales de la MSR. Anterior a este desarrollo - lo que ahora se denomina la "era pre-Boxiana" - sólo existían modelos simples y diseños factoriales complejos desarrollados por Yates, los cuales fueron posteriormente empleados en la MSR (Mead y Peak, 1975).

En su primera década la MSR fue una herramienta empleada en la industria química (Box, 1954; Read, 1954), agricultura e ingeniería industrial - con mayores reportes en la primera (Hill y Hunter, 1966). Desde los años setenta se han utilizado MSR en trabajos enfocados a bioprocesos, pero fue hasta los años ochenta que se observó con mayor frecuencia en el empleo de la MSR en publicaciones que optimizan la actividad microbiana a través de modificar las condiciones microambientales para el cultivo de microorganismos (Saval *et. al.*, 1993). Estas modificaciones incluían - entre otros factores – optimización de los medios de cultivos de los nutrientes

especialmente aplicados en fermentaciones líquidas a nivel de "matraces" (McDaniel, *et. al.*, 1976; Maddox y Richter, 1977), crecimiento celular (Remmers y Dunn, 1961) activación y producción de enzimas (Desrochers, *et. al.* 1981; Marty, 1985) y bioconversiones (Cheynier, *et. al.*, 1983). Actualmente existe un gran número de publicaciones la mayoría relacionadas con la agricultura, análisis sensorial en la ingeniería de alimentos, métodos en laboratorio e ingeniería industrial y química.

La MSR es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para analizar problemas en los cuales una respuesta de interés está influida por diversas variables y se desea alcanzar un óptimo dentro una región explorada. Esta es una herramienta estadística sencilla, rápida y accesible para determinar las condiciones óptimas que maximizan o minimizan una respuesta, tiene la ventaja de que permite visualizar a través de imágenes tridimensionales el fenómeno que se está estudiando, lo cual es de gran ayuda para la comprensión del problema.

En la MSR se establece que la respuesta a ensayar (y) está en función de:

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_k) + \varepsilon$$

donde x_1, x_2, \dots, x_k son los k factores que se desean evaluar a distintos niveles y ε representa el ruido o error observado en la respuesta. Si la respuesta esperada se denota por $E(y) = f(x_1, x_2, \dots, x_k) = \eta$, entonces la superficie representada por

$$\eta = f(x_1, x_2, \dots, x_k)$$

se denomina *superficie de respuesta*.

Debido a la perspectiva tridimensional es posible graficar la superficie de respuesta en tres ejes, donde se grafica η contra un par de factores de respuesta (por ejemplo x_1 y x_2), obteniéndose una superficie sólida en un espacio tridimensional. Típicamente existen dos tipos de gráficas para visualizar su representación: la de superficie (arriba descrita) y la de contornos. En las gráficas de contornos se trazan líneas de respuesta constantes en el plano de los dos factores (x_i y x_j). Cada contorno corresponde a una altura específica de la superficie de respuesta o lo que equivaldría a un

"corte" de la superficie a determinada altura. En la figura 3 se muestra la representación típica de una superficie de respuesta y los contornos proyectados en la región cercana a un óptimo.

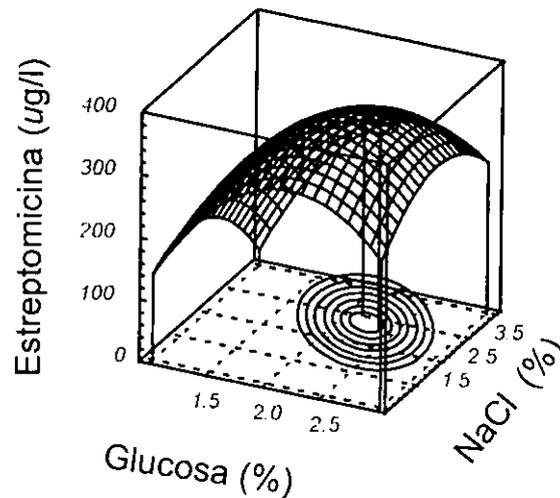


Figura 3. Gráfica típica de superficie y contornos (Saval, 1992)

La MSR es una técnica secuencial, que a partir de un punto – usualmente un punto de interés que se determina con base en las condiciones de operación habituales o por fuentes bibliográficas – se determinan los niveles (p. ej. concentraciones o temperaturas que se experimentarán) de cada factor para cubrir una primera área intentado acercarse a un óptimo. Esto se debe a que la relación entre la respuesta (y) y las variables se desconoce en un inicio.

El primer paso es determinar una aproximación apropiada a la relación real entre la respuesta (y) con el conjunto de factores o variables independientes. Para lograrlo se emplea un polinomio de primer grado como aproximación, si es adecuado entonces aún no se ha alcanzado una inflexión que demuestre la presencia de un máximo, un mínimo o un punto silla (Myers, 1971). Este modelo de primer orden se describe como:

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon$$

Su representación sería un plano inclinado, si fuese paralelo al plano de los dos factores (x_1 y x_2), entonces se podría cuestionar la dependencia de la respuesta (y) sobre los factores. En caso que el modelo de primer orden no se adecue, se debe explorar otra región (p. ej. mover las

concentraciones, pH o temperatura) hasta encontrar una en que la curvatura se haga evidente, por lo que el polinomio de primer orden deja de ser adecuado. Cuando esto se logra se debe usar un polinomio de segundo orden:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_i \sum_{\substack{j \\ i < j}} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

La estimación de los parámetros de los polinomios se realiza por el método de mínimos cuadrados y el análisis de la superficie de respuesta se hace en términos de la superficie ajustada. Tal análisis será aproximadamente equivalente al análisis del sistema real, si la superficie ajustada es una aproximación adecuada a la función de respuesta real. La estimación de los parámetros del modelo se realiza de manera más eficaz si se utilizan los diseños experimentales apropiados para recopilar los datos. A estos diseños se le denominan *diseños de superficie de respuesta* (Cochran y Cox, 1965; Montgomery, 1991).

La MSR emplea modelos para aproximar a un óptimo, que a diferencia de los modelos mecanísticos no dan una respuesta del mecanismo físico del sistema, pero sirve para adquirir este conocimiento (Montgomery, 1991).

1. Directrices para el diseño de experimentos

El desarrollo de una MSR requiere el empleo de los diseños de experimentos. Para cumplir con el enfoque estadístico al diseñar y analizar un experimento es necesario cumplir el siguiente procedimiento (Montgomery, 1991):

1. Comprensión y planteamiento del problema. Aquí se reúnen todos los conocimientos anteriores a la conceptualización del problema. Comúnmente se requiere la integración de conocimiento multidisciplinario para lograr entender todos los factores que pueden afectar una respuesta. Posibles fuentes de conocimientos son las referencias bibliográficas, experiencias adquiridas y comprensión teórica del fenómeno y estudios preliminares, entre otros.
2. Elección de factores y niveles. El experimentador debe elegir los factores que por su importancia o por interés en la investigación y por su factibilidad de ser modificados puedan emplearse en el experimento. Los niveles para cada factor deben ser los mínimos que permitan cubrir la región de

interés y que aporten suficiente información para su análisis e interpretación. También se debe analizar cuáles variables se mantendrán constantes a lo largo del experimento y a que nivel.

3. Selección de la variable de respuesta. Para la selección de la variable de respuesta o dependiente, se debe estar realmente seguro de cual es la respuesta adecuada que verterá información útil sobre el estudio y garantizar que los métodos para cuantificarla sean eficientes.
4. Selección del diseño experimental. Junto con los datos anteriores y los recursos – tanto de material, métodos, tiempo y personal - con los que se cuenta se puede determinar cuantas observaciones y repeticiones son factibles de llevar a cabo.
5. Realización del experimento. Este se lleva cabo de acuerdo con el diseño seleccionado, teniendo cuidado de cumplir todos los requisitos de aleatorización que permitan su posterior análisis. Si no se realiza de acuerdo con lo planeado o si se registran errores en su procedimiento se puede poner en juego la validez experimental. Por lo que se recomienda no subestimar los aspectos logísticos y de planeación en la realización del diseño.
6. Análisis. Para que los resultados y conclusiones sean más objetivos que apreciativos se deben emplear métodos estadísticos adecuados. Estos pueden basarse en paquetes informáticos ampliamente validados que permitan realizar los cálculos de manera automática, visualizar los resultados gráficamente y que eviten el error craso de su cálculo. Esto toma particular importancia para el análisis de los diseños estadísticos avanzados. En esta etapa se debe verificar la idoneidad del modelo – cumplimiento de todos sus supuestos - comúnmente empleando el análisis de los residuos.
7. Conclusiones y recomendaciones. Una vez que se han analizado los datos, el experimentador debe extraer conclusiones prácticas de los resultados y recomendar un curso de acción. En esta fase a menudo son útiles los métodos gráficos y la discusión en grupo. También deben realizarse corridas de seguimiento o pruebas de confirmación para validar las conclusiones del experimento.

2. Diseño de experimentos para la MSR

El desarrollo de estos diseños tiene como finalidad lograr ciertas propiedades deseables para el experimento, su demostración se basa en amplios planteamientos matemáticos que se pueden consultar en las referencias citadas en (Cochran, 1965; Myers, 1971; Montgomery, 1991). Algunas de las características deseables en los diseños experimentales para ajustar superficies de respuestas son:

- Permitir el mínimo número de corridas y de pocos niveles en cada variable.
- Admitir la construcción secuencial de diseños de orden superior, empleando la información del modelo anterior.
- Proporcionar una distribución razonable de puntos de datos (y por tanto de información) en toda la región de interés.
- Permitir investigar la idoneidad del modelo, incluyendo la falta de ajuste.
- Proporcionar una estimación del error interno.

Para los modelos de primer orden existe una única clase de diseño, los ortogonales de primer orden que minimizan las variancias de los coeficientes de regresión (Myers, 1971) y permiten obtener información igualmente precisa en todas direcciones (*rotable*). Uno de los diseños que cumplen con la ortogonalidad brinda puntos equidistantes en el espacio dimensional y producen una independencia del efecto de cada variable son los diseños factoriales 2^k y sus fracciones de la misma serie. Para estos diseños se requiere *codificar* los niveles a valores de +1 y -1. Estos diseños no permiten una estimación de la variancia del error experimental necesaria para comparar los efectos de cada factor en el ANOVA y comprobar la falta de ajuste del modelo. Esto puede obtenerse por: (i) repetición de todo el experimento; (ii) con una estimación previa si es que se mantiene estable; y (iii) agregando varios puntos centrales (repeticiones a nivel cero codificado de todos los factores). Esta última es la forma más empleada debido a que la primera involucra aumentar en gran número las corridas y la segunda porque puede variar la variancia al ensayarse o por no contar con un dato previo.

Entre las ventajas de emplear un diseño 2^k con réplicas en los puntos centrales se encuentra que el aumento de los puntos centrales no tiene influencia en los coeficientes de regresión relacionados a los factores, sólo el "corte al origen" (β_0) varía por ser el promedio general de todas las observaciones, además no se alteran las propiedades de ortogonalidad.

Otro diseño ortogonal de primer orden es el simplex, el cual es una figura regular con vértices igual al número de factores más uno ($k+1$) en k dimensiones. Pero este no permite determinar la falta de ajuste del modelo (Myers, 1971).

Para los modelos de segundo orden al menos se deben tener tres niveles para cada factor (p. ej. una curva no se aprecia con dos datos, sino al menos con tres). Entre las propiedades más importantes de

los modelos de segundo orden es que sea *rotable*. Es decir que permita obtener información igualmente precisa en todas direcciones⁷. Esto tiene sentido si se considera que se desconoce la localización del óptimo por lo que es importante contar con estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones. Para lograr esta rotabilidad se emplea con mucha frecuencia al Diseño Central Compuesto (DCC) con 2^k de su parte factorial, $2 \cdot k$ puntos axiales o estrella y n_c puntos centrales (Montgomery, 1991).

Un DCC se convierte en rotable mediante la elección de la distancia del punto axial o estrella (α). El valor de (α) para que el diseño sea rotable está en función del número de puntos en la porción factorial (2^k) de acuerdo con la siguiente fórmula⁸:

$$\alpha = (2^k)^{1/4}$$

Otras propiedades del DCC es que puede "crecer" a partir de un diseño de primer orden (2^k) sólo agregando los $2k$ puntos axiales y que se puede convertir en *ortogonal* o de *precisión uniforme* controlando el número de puntos centrales.

Los diseños para los modelos de segundo orden de *precisión uniforme* aventajan a los *ortogonales* porque permiten una mayor protección contra el sesgo de los coeficientes de regresión producido por la presencia de términos de tercer y de mayor orden. Además los diseños de *precisión uniforme* presentan la propiedad de que la variancia de \hat{y} en el origen es igual a la variancia de \hat{y} a una distancia unitaria del origen.

También se pueden emplear un Diseño No-Central Compuesto si se desea explorar un área más cercana a uno de los niveles de algún factor (Cochran y Cox, 1965) o un Diseño Central Compuesto Centrado con valores de (α) igual a 1. Este último diseño facilita el cálculo de los niveles cuando es muy difícil modificarlos de la unidad pero presenta la desventaja no ser rotable. El diseño 3^k , aunque tengan 3 datos por nivel, no se emplea debido a que no es rotable (Montgomery, 1991).

⁷ Esto se logra si la variancia de la respuesta predicha (\hat{y}) en algún punto del espacio ensayado es función sólo de la distancia al punto desde el centro del diseño y no es una función de la dirección.

⁸ Esto equivale a colocar a todos los puntos a igual distancia del centro (cuando todos los factores están a nivel 0).

Existen otros tipos de diseños como los propuestos por Box y Behnken en 1960 los cuales se emplean en tres niveles de combinaciones de diseños 2^k con diseños de bloques incompletos, estos requieren menor número de corridas y presentan rotabilidad (o son casi rotables). Otros diseños son los *equirradiales* para dos o tres variables, los diseños empleados para bloqueos y los utilizados para mezclas (Montgomery, 1991).

II. ANTECEDENTES

Para la realización de proyectos de biorremediación de suelos contaminados se debe contar - junto con aspectos básicos de geohidrología, química de contaminantes, física y química del suelo - con una base científica y tecnológica del proceso biotecnológico de la biodegradación de los hidrocarburos. En este punto es indispensable la investigación mediante modelos experimentales controlados a nivel laboratorio que permitan las mejores condiciones de biodegradación de los hidrocarburos para su futuro escalamiento al sitio contaminado (Saval, 1998c).

En estos estudios a nivel laboratorio se deben tener presentes las variables de degradación, consumo de oxígeno y producción de bióxido de carbono, para tener un conocimiento más profundo del proceso de biodegradación. Aunque son varias las condiciones ambientales que pueden afectar la biodegradación (oxígeno u otro aceptor de electrones, pH, humedad y temperatura), la de mayor interés es el aporte de nutrientes (Graham, 1995).

La gran biodiversidad de microorganismos autóctonos presentes en los distintos tipos de suelo ha demostrado gran capacidad de adaptación a los hidrocarburos contaminantes. Estos hidrocarburos ejercen una presión de selección en las poblaciones microbianas degradadoras que en condiciones favorables y con una adecuada estimulación – en especial de nutrientes básicos para el metabolismo – transforman a los hidrocarburos en compuestos químicamente más sencillos e incluso logran una completa mineralización hasta bióxido de carbono, agua y biomasa (Saval, 1997).

La aplicación de nutrientes generalmente ha tenido un efecto positivo en la estimulación de la biodegradación de hidrocarburo cuando existen condiciones favorables para la biodegradación. En contraposición existen estudios que demuestran poco o nada de efecto e incluso reportan efectos negativos (Walworth *et. al.*, 1997b). Esto se debe a la carencia de estudios sistemáticos que permita entender los requerimientos nutricionales, sus interacciones y su relación para obtener beneficios en la biodegradación.

Con esta base, el presente trabajo se enfoca a entender los efectos que los nutrientes y sus interacciones pueden causar en la biodegradación de hidrocarburos y buscar las concentraciones adecuadas para la biodegradación del contaminante. Para realizarlo se emplearon herramientas

estadísticas avanzadas con el fin de distinguir el efecto de cada nutriente y del contaminante en la biodegradación, así como sus interacciones para que las tendencias hacia un óptimo se cumplan en toda la región experimental y no sólo en los valores seleccionados.

Para el desarrollo de la primera etapa de caracterización del suelo se contó con un diagnóstico previo de la contaminación a través de un estudio geofísico en la zona cercana a un tanque de almacenamiento de 500 litros de capacidad. Este tanque instalado para alimentar diesel industrial a un generador de emergencia produjo un goteo constante por un periodo aproximado de 12 años, lo que permitió un enriquecimiento de bacterias nativas con capacidad para degradar diesel. El estudio geofísico se llevó a cabo con la metodología geoelectrica de resistividad de barrido para estimar el tamaño y forma de la mancha de contaminación (Figura 4). La información obtenida sirvió de apoyo para la caracterización previa del material del suelo y la localización del suelo control adyacente representativo de las propiedades del suelo contaminado.

El presente trabajo es parte de los estudios a nivel laboratorio que se realizan con la finalidad de entender los procesos que gobiernan la biorremediación de hidrocarburos del diesel y permiten el desarrollo de técnicas para su futura aplicación en campo.

III. EXPERIMENTACIÓN

Durante el trabajo experimental se realizó la caracterización y posteriormente la optimización. El suelo utilizado en este trabajo demostró en estudios previos la presencia de una flora microbiana nativa con capacidad de degradación (Milcic, 1998). Con la finalidad de identificar aquellos parámetros que pudieran afectar la degradación se realizó una caracterización física, química y microbiológica. Esta caracterización determinó cuáles factores microambientales se requerían ajustar durante la optimización, para estudiar el efecto de aquellos que se consideraron variables.

Para la realización del diseño estadístico se definieron tres variables a evaluar que fueron las concentraciones de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos. Estas se seleccionaron por su gran influencia en la biodegradación (Leahy y Colwell, 1990; Frankenberger, 1992; Saval, 1995).

A. Muestreo y preparación del suelo contaminado y control

Se obtuvo una muestra simple del suelo debajo del goteo del tanque de diesel para tener el material más contaminado que correspondió a las más altas concentraciones. También se obtuvo una muestra compuesta a partir de tres puntos en una zona no contaminada que sirvió como control y al mismo tiempo como medio para diluir las concentraciones del diesel (Figura 5). Ambas muestras se recolectaron en un mismo día a nivel de superficie hasta 15 cm de profundidad para aprovechar la presencia de poblaciones aerobias, previamente se les removió la primera capa del suelo que contenía hojas y piedras.

Todo el material empleado durante el muestreo, se lavó perfectamente para evitar la presencia de compuestos que interfirieran en los análisis. También se utilizó equipo adecuado para garantizar la protección del personal durante el muestreo, de acuerdo a los lineamientos de la SW-846 de la EPA (USEPA, 1996a). Las muestras se almacenaron en botellas limpias de vidrio con tapa hermética y contratapa de teflón y se etiquetaron con nombre, fecha y hora del muestreo. Posteriormente se homogeneizaron cuidadosamente con el fin de minimizar fuentes potenciales de variación en la experimentación y se refrigeraron a 4°C hasta el inicio de los experimentos.

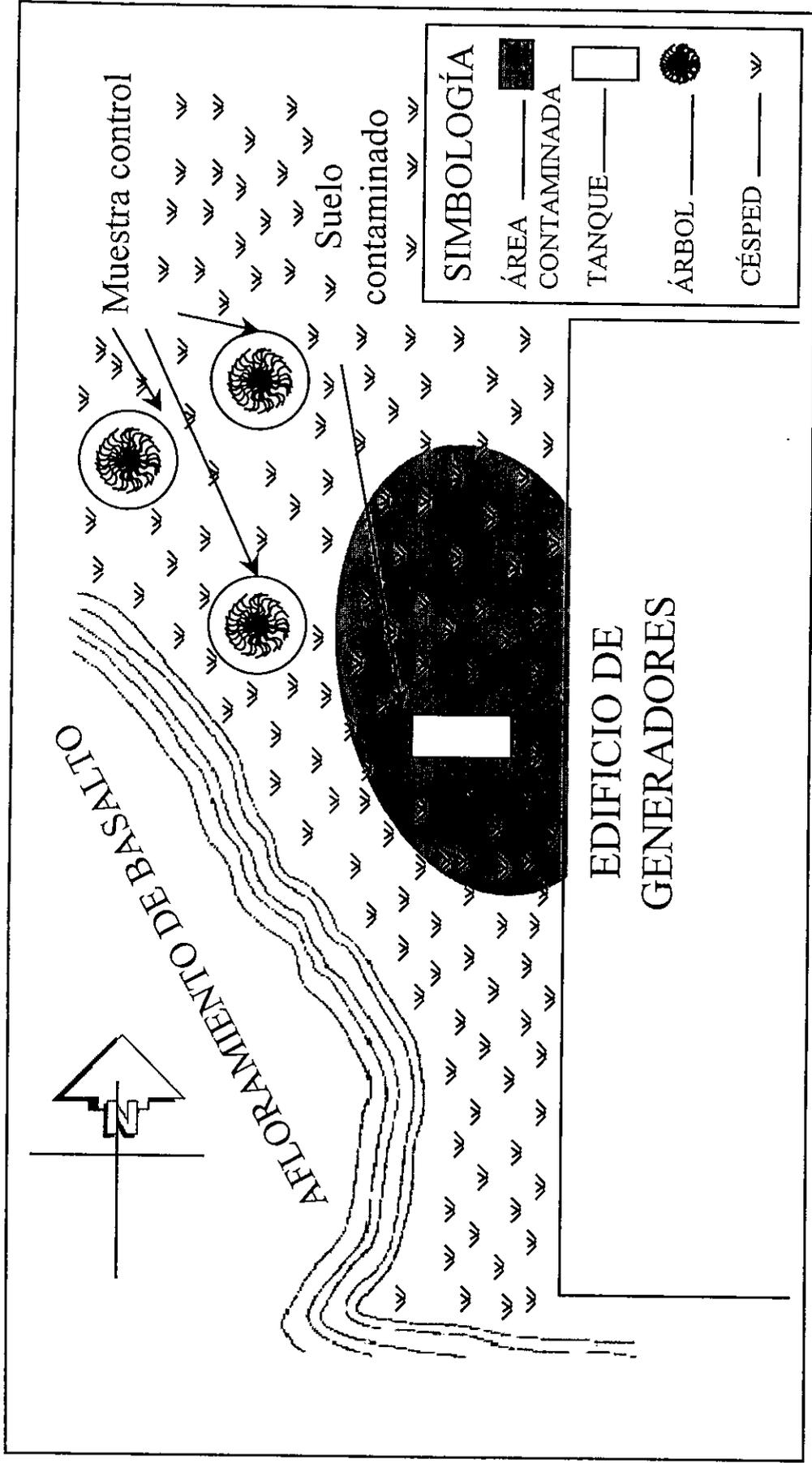


Figura 5. Puntos de muestreo del suelo contaminado y control

B. Análisis del suelo

Las características físicas y químicas del suelo se evaluaron a través de la cuantificación del contenido de humedad, densidad real, densidad aparente, porosidad, pH, carbono orgánico, nitrógeno total y amoniacal, fosfatos, capacidad de retención de agua y textura de acuerdo con las referencias (Velázquez y León, 1974; Jackson, 1982; Hute y Lee, 1986; Carter, 1993). Las metodologías se describen brevemente a continuación.

Humedad. Se determinó por el método gravimétrico, calculándose la diferencia atribuida a la pérdida de agua hasta peso constante por secado en horno a 105°C.

Densidad aparente (ρ_a). Se determinó en suelo seco mediante el método de la probeta.

Densidad real (ρ_s). Se determinó por diferencia de volúmenes relacionados a su peso a través del método del picnómetro.

Porosidad o espacios vacíos del suelo. Se calculó por la diferencia relativa porcentual entre la densidad real y la aparente de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\eta = \frac{\rho_s - \rho_a}{\rho_s} \times 100$$

pH. Se midió por determinación potenciométrica del suelo en agua desionizada utilizando una relación 1:2, con 30 minutos de agitación y 60 minutos de reposo.

Carbono orgánico. Se cuantificó por el método de Walkley-Black citado en López y López (1978) mediante la oxidación con dicromato de potasio (K_2CrO_7) a 150°C y se determinó por titulación con sulfato ferroso el dicromato de potasio gastado, con la siguiente fórmula se obtuvo el porcentaje de carbono orgánico:

$$\% \text{ C orgánico} = \frac{(\text{m.eq. } K_2CrO_7 \text{ agregados} - \text{m.eq. } FeSO_4 \text{ gastados}) * 0.336}{\text{Peso de la muestra en g}}$$

El porcentaje de materia orgánica (% M.O.) se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ M.O.} = \% \text{ C orgánico} * 1.72$$

Nitrógeno total. Se determinó por el método modificado de Kjeldahl citado en Jackson (1982). La digestión se realizó en un "Digestion Unit " Büchi 435 y la destilación en un "Distillation Unit" Büchi 323 – equipo automático para la destilación Kjeldahl.

Nitrógeno amoniacal. Se cuantificó por la misma destilación Kjeldahl en el filtrado del intercambio de iones con 450 ml de NaCl al 10% por 100 g de suelo.

Fosfatos. Se determinaron por espectrofotometría a 660 nm en el extracto de suelo de acuerdo con el método de Bray I citado por López y López (1978).

Textura. Se realizó por el método del hidrómetro modificado de Day al suelo con materia orgánica removida con H₂O₂.

Las características microbiológicas analizadas fueron la cuenta de bacterias heterótrofas empleando el medio Agar Nutritivo (No. Cat. 1.05463) y la cuenta de degradadoras con un medio mineral, extracto de suelo al 5% y diesel industrial como único substrato.

El contenido del diesel en el suelo se evaluó por el método EPA 8015 (USEPA, 1996a), por extracción con hexano a reflujo y eliminación de agua con sulfato de sodio anhidro y de partículas por filtración a través de fibra de vidrio y centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos. El extracto se inyectó a un cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3350 con inyector a 320°C y detector de ionización de flama a 300°C, se usó una columna capilar 100% metil silicona de 60 m de longitud. Se empleó un programa de temperatura de 50 a 300°C por un periodo de 40 min. El gas acarreador fue helio con un flujo de 1.3 ml/min.

Pruebas respirométricas. Se determinó durante 5 días a 25 g de suelo incubados a 25 °C y con aporte de nutrientes, el consumo de O₂ y la producción de CO₂ por cromatografía de gases.

Como una caracterización complementaria se determinó el contenido de metales pesados en el lixiviado del suelo control y contaminado por separado: As, Ba, Cd, Ni, Pb y Se por el método EPA 6010; el Cr (VI) por EPA 7196A y Hg por EPA 7470 (USEPA, 1996a).

C. Diseño estadístico

Durante los diseños experimentales de la MSR se eligió como la variable de respuesta el porcentaje de biodegradación del diesel. Las variables independientes fueron la concentración de diesel (x_1), la concentración de nitrógeno amoniacal (x_2) y la concentración de fosfatos (x_3). Las pruebas se realizaron en botellas serológicas de 120 ml con 25 g de suelo tapadas con septos de teflón y arillos de aluminio, se incubaron por un periodo de 30 días a temperatura constante de 25°C, la humedad se mantuvo a un 43.2% y el pH inicial se fijó en 7.2.

Diariamente se tomaron muestras de 0.5 ml del biogas en el espacio vacío de las botellas, las cuales se analizaron en un cromatógrafo de gases Fisher Gas Partitioner modelo 1200 con detector de conductividad térmica de doble columna, Porapak Q y malla molecular 5A equipado con un registro Fisher Recordall 5000. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 25 ml/min. Los microcosmos se abrieron cada vez que se detectaba una limitación de O_2 para garantizar las condiciones aerobias.

La MSR requirió una aproximación secuencial por lo que se empleó primero un diseño para un polinomio de primer orden y después con uno de segundo orden en cada una de las dos etapas desarrolladas. Algunas especificaciones generales para los cuatro diseños experimentales se resumen en la Tabla 5. Las concentraciones evaluadas para cada variable de acuerdo con los niveles codificados, garantizaron un adecuado proceso estadístico de optimización (Box y Wilson, 1951; Cochran y Cox, 1965; Montgomery, 1991) se detallan a continuación.

1. Etapa I

Las características principales de la etapa I se resumen en los dos primeros bloques de la Tabla 5 y se detallan por cada observación en la Tabla 6.

1.1. Experimento I

En el primer experimento se empleó un diseño ortogonal para modelos de primer orden, como se indica en la primera parte de la Tabla 6. Cada variable fue evaluada en una concentración alta (+1) y una concentración baja (-1), referidas a un punto central (0). Este último fue repetido seis veces para determinar la variabilidad experimental propia del sistema. El diseño consideró todas las posibles combinaciones a dos niveles de las variables, es decir $2^3 = 8$, adicionado de seis puntos centrales con un total de 14 observaciones (Montgomery, 1991).

Tabla 5. Especificaciones de los diseños experimentales para tres factores

Etapa	Experimento	Diseño experimental	No. de observ.	Repetición del punto central	Nivel codificado	Diesel	Nitrógeno amoniacal	Fosfatos	Objetivo
concentración en mg/kg									
I	I	Ortogonal de primer orden	14	6	+1 0 -1	41,892 30,000 18,108	2,000 1,500 1,000	15 10 5	Primera aproximación
I	II	Central Compuesto rotable de precisión uniforme	20	6	+1.682 +1 0 -1 -1.682	50,000 41,892 30,000 18,108 10,000	2,341 2,000 1,500 1,000 660	18.4 15 10 5 1.6	Observar el efecto puro de cada variable
II	III	Ortogonal de primer orden	14	6	+1 0 -1	15,351 10,000 4,649	3,070.00 2,300.00 1,530.00	49.87 35.00 20.14	Verificar curva-tura observada en la Etapa I
II	IV	Central Compuesto rotable de precisión uniforme	20	6	+1.682 +1 0 -1 -1.682	19,000 15,351 10,000 4,649 1,000	3,595.14 3,070.00 2,300.00 1,530.00 1,004.86	60.00 49.87 35.00 20.14 10.00	Determinar el efecto puro de cada variable y su tendencias

La concentración de diesel en el *punto central (0)* fue de 30,000 mg/kg y se empleó una *distancia unitaria* entre los niveles de codificación de 11,892 mg/kg, por lo tanto el nivel (+1) fue de 41,892 mg/kg por la adición del *punto central* a la *distancia unitaria* y el nivel (-1) fue de 18,108 mg/kg por la sustracción de la *distancia unitaria* al *punto central*. La concentración del diesel se ajustó a través de diluciones del suelo contaminado con suelo control. Los puntos centrales y los niveles (+1) y (-1) empleados para el nitrógeno amoniacal y los fosfatos se indican en la primera fila de la Tabla 5, en éstos la distancia unitaria fue de 500 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente.

1.2. Experimento II

En un segundo experimento, se planteó un diseño central compuesto (DCC) rotatable de precisión uniforme para tres variables. Este diseño incluyó dos puntos estrella o axiales ($+\alpha$ y $-\alpha$) para observar el efecto puro de cada variable. La distancia codificada de $\alpha = 1.682$ permitió que el diseño central compuesto sea rotatable, proporcionando estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones para la búsqueda del óptimo (Montgomery, 1991),

Las concentraciones de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos para el segundo experimento se muestran en el segundo bloque de la Tabla 5. Los seis puntos axiales que incrementaron el número de observaciones a 20 permitieron estimar el error experimental y determinaron un diseño DCC de precisión uniforme. La codificación ampliada de estas variables se muestra en la segunda parte de la Tabla 6.

En la Tabla 6. se indican además las concentraciones relativas calculadas para la relación diesel : N-NH_4^+ : P-PO_4^{3-} , las cuales fueron empleadas para analizar el efecto de la relación C:N:P en cada observación.

2. Etapa II

Los resultados de la primera etapa de optimización determinaron la necesidad de una segunda etapa experimental en el intervalo de concentraciones especificado en las dos últimas filas de la Tabla 5 y detallado para cada observación en la Tabla 7.

Tabla 6. Diseño para los experimentos I y II

		No.	x_1	x_2	x_3	Relación		
		Obs.				diesel : N-NH ₄ ⁺ : P-PO ₄ ³⁻		
Diseño Experimental	Diseño Ortogonal (modelo de primer orden)	Observaciones	1	-1	-1	-1	100 : 5.52 : 0.028	
			2	-1	-1	+1	100 : 5.52 : 0.083	
			3	-1	+1	-1	100 : 11.04 : 0.028	
			4	-1	+1	+1	100 : 11.04 : 0.083	
			5	+1	-1	-1	100 : 2.39 : 0.012	
			6	+1	-1	+1	100 : 2.39 : 0.036	
			7	+1	+1	-1	100 : 4.77 : 0.012	
			8	+1	+1	+1	100 : 4.77 : 0.036	
Diseño Experimental Compuesto (modelo de segundo orden)	Central (modelo de primer orden)	Puntos Centrales	9	0	0	0	100 : 5.0 : 0.033	
			10	0	0	0	100 : 5.0 : 0.033	
			11	0	0	0	100 : 5.0 : 0.033	
			12	0	0	0	100 : 5.0 : 0.033	
			13	0	0	0	100 : 5.0 : 0.033	
			14	0	0	0	100 : 5.0 : 0.033	
			Puntos Estrella	15	0	0	1.682	100 : 5.0 : 0.061
				16	0	0	-1.682	100 : 5.0 : 0.005
				17	0	1.682	0	100 : 7.80 : 0.033
				18	0	-1.682	0	100 : 2.20 : 0.033
				19	1.682	0	0	100 : 3.0 : 0.020
				20	-1.682	0	0	100 : 15.0 : 0.100

2.1. Experimento III

Al igual que el experimento I se desarrolló un diseño ortogonal para modelos de primer orden en el cual cada variable fue evaluada en una concentración alta (+1) y una concentración baja (-1), referidas a un punto central (0). Las distancias unitarias - establecidas por las tendencias de la Etapa

I - para el diesel, nitrógeno amoniacal y los fosfatos fueron de 5,351 mg/kg, 770 mg/kg y 14.865 mg/kg, respectivamente, obteniéndose los valores codificados del tercer bloque de la Tabla 5.

2.2. Experimento IV

Se realizó un diseño central compuesto (DCC) rotatable de precisión uniforme para tres variables (Montgomery, 1991). Este diseño incluyó dos puntos estrella o axiales ($+\alpha$ y $-\alpha$) para cada variable (Tabla 7), la codificación ampliada de estas variables se muestra en el último bloque de la Tabla 5.

Tabla 7. Diseño experimental III y IV

			No.	x_1	x_2	x_3	Relación	
			Obs.				diesel : N-NH ₄ ⁺ : P-PO ₄ ³⁻	
Diseño Experimental Central-Compuesto (modelo de segundo orden)	Diseño Experimental Ortogonal (modelo de primer orden)	2 ³ Observaciones	1	-1	-1	-1	100 : 32.91 : 0.43	
			2	-1	-1	1	100 : 32.91 : 1.07	
			3	-1	1	-1	100 : 66.03 : 0.43	
			4	-1	1	1	100 : 66.03 : 1.07	
			5	1	-1	-1	100 : 9.97 : 0.13	
			6	1	-1	1	100 : 9.97 : 0.32	
			7	1	1	-1	100 : 20.00 : 0.13	
			8	1	1	1	100 : 20.00 : 0.32	
	Puntos Centrales			9	0	0	0	100 : 23.00 : 0.35
				10	0	0	0	100 : 23.00 : 0.35
				11	0	0	0	100 : 23.00 : 0.35
				12	0	0	0	100 : 23.00 : 0.35
				13	0	0	0	100 : 23.00 : 0.35
				14	0	0	0	100 : 23.00 : 0.35
	Puntos Estrella			15	0	0	1.682	100 : 23.00 : 0.60
				16	0	0	-1.682	100 : 23.00 : 0.10
				17	0	1.682	0	100 : 35.95 : 0.35
				18	0	-1.682	0	100 : 10.05 : 0.35
				19	1.682	0	0	100 : 12.11 : 0.18
				20	-1.682	0	0	100 : 230.00 : 3.50

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Características físicas, químicas y microbiológicas del suelo

Las características del suelo contaminado utilizado en este estudio, así como el suelo no contaminado que sirvió de control se presentan en la Tabla 8. El suelo contaminado presentó una elevada concentración de diesel industrial ligeramente mayor a 50,000 mg/kg. Esta concentración, de acuerdo con las observaciones sugeridas por Dibble y Bartha (1979), Brown *et. al.* (1983), Leahy y Colwell (1990), y McAllister *et. al.* (1995) podría encontrarse por arriba de una concentración máxima o umbral para una biodegradación significativa de hidrocarburos en suelos. La relativamente elevada concentración del diesel en el suelo contaminado permitió una amplia región experimental.

La textura de los suelos control y contaminado fue del tipo migajón arenoso (según Villegas, 1966). Esto verifica - de acuerdo con el antecedente del estudio geofísico - que el muestreo se realizó efectivamente en un mismo estrato fuera y dentro de la mancha de contaminación. Este tipo de textura permite la transferencia de fluidos para garantizar una adecuada aireación por la presencia de las arenas y al mismo tiempo brinda un porcentaje de limos que garantizó un incremento en la capacidad de retención de agua, brindando la posibilidad de ajustar la humedad para favorecer el crecimiento de bacterias en la matriz del suelo (Frankenberger, 1992; Juma, 1998).

El suelo control presentó un valor de densidad aparente de 1.20, el cual quedó dentro de la región típica de 1.20 - 1.75 g/cm³ para una textura tipo migajón arenosa (Juma, 1998). Sin embargo, el suelo contaminado tuvo un valor de densidad aparente muy bajo cercano al de las arcillas de 0.98 g/cm³ (Juma, 1998) posiblemente debido al efecto del diesel en el suelo. Este suelo aunque fue secado a 105°C para la determinación de la densidad aparente no debió perder a los hidrocarburos de baja densidad y de alto punto de ebullición que en su mayoría conforman al diesel.

La densidad de partícula o real siempre es mayor que la densidad aparente debido a que esta última considera además del volumen de los sólidos, el de los espacios porosos del suelo. La densidad de partícula fue de 2.3 y 1.9 g/cm³ para los suelos control y contaminado, respectivamente. Estos valores son elevados para un suelo con materia orgánica, pero se encuentran por debajo de los suelos minerales (Porta *et. al.*, 1994; Juma, 1998).

Tabla 8. Características físicas, químicas y microbiológicas del suelo empleado

Parámetro	Suelo control		Suelo contaminado	
	Concentración de diesel (mg/kg)	ND		51 684.53 (0.18)
Textura	Arena	Limo	Arena	Limo
	55%	45 %	62.5 %	37.5 %
	Migajón arenoso		Migajón arenoso	
Densidad aparente (g/cm ³)	1.20 (4.15)		0.98 (6.12)	
Densidad de partícula (g/cm ³)	2.30 (2.61)		1.90 (4.74)	
Porosidad (adimensional)	0.48		0.59	
Capacidad de retención de agua (ml/kg)	370 (3.81)		570 (3.72)	
Humedad (%)	24.4 (3.89)		39.8 (4.45)	
pH	7.15 (± 0.05)		5.7 (± 0.1)	
Materia orgánica (%)	4.13 (4.45)		58.5 (4.59)	
Carbono orgánico (%)	2.40 (4.45)		34.01 (4.59)	
Nitrógeno total (mg/kg)	531 (0.93)		185 (2.38)	
Nitrógeno amoniacal (mg/kg)	25.73 (4.66)		ND	
Fosfatos (mg/kg)	2.91 (3.75)		2.54 (4.72)	
Cuenta de bacterias heterótrofas aerobias (ufc/g de suelo)	8.46 E5 (1.65)		8.11 E7 (4.98)	
Cuenta de bacterias potencialmente degradadoras de diesel (ufc/g suelo)	5.10 E5 (1.11)		1.78 E7 (2.75)	
Consumo de oxígeno en 5 días (mg O ₂ / kg de suelo)	344.11		1253.62	
Generación de bióxido de carbono en 5 días (mg de CO ₂ / kg de suelo)	228.97		1552.63	

Los valores para cada parámetro corresponden a los promedios en base seca, mientras que el valor entre paréntesis corresponde al % de variación con excepción del pH que representa la región del pH por triplicado.

La porosidad del suelo control fue de 48% típica para un suelo con alto contenido de arena y limos (Freeze y Cherry, 1979) y la del suelo contaminado de 59% ligeramente más elevado (para granos más finos) pero todavía dentro de la región de suelo con textura tipo migajón arenoso (Juma, 1998).

Para un suelo migajón arenoso con densidad aparente de 1.20 - correspondiente a suelos no consolidados - es de esperarse espacios porosos suficientes para el crecimiento de diversos microorganismos. De acuerdo con las observaciones de Van der Linden *et. al.* 1989 citado por Juma

(1998) se tiene para un suelo migajón arenoso con densidad aparente de 1.20 dentro de la distribución de los espacios porosos un 55% de sólidos y 9.3% de bacterias.

La capacidad de retención de agua del suelo contaminado fue mayor que la del control, esta diferencia reportada en otros estudios (Odu, 1972; Dibble y Bartha, 1979; Leahy y Colwell, 1990; Frankenberger, 1992) posiblemente se deba a cambios en la estructura física del suelo por la presencia de los hidrocarburos. También la humedad del suelo contaminado fue mayor que la del control. Esta disparidad se le puede atribuir al incremento en la capacidad de retención de agua del suelo contaminado y a una muy pequeña contribución de la fracción volátil del diesel. Jackson (1992) observó que el 5% del diesel no intemperizado puede ser volátil, dicho porcentaje sólo contribuiría en el presente trabajo hasta con un 0.25 % en la humedad del suelo, sin embargo, esta contribución debe ser más baja si se considera un diesel intemperizado. La humedad para el suelo control y contaminado representó un 66% y 70% de su CRA, por lo que se obtuvo un margen adecuado de ajuste para introducir pequeños volúmenes de soluciones que permitieran el ajuste del pH y la adición de nutrientes sin alcanzar la saturación del medio que impidiera una adecuada aireación. Una región óptima de humedad del suelo para la actividad de biodegradación es entre el 50 y el 80% de la CRA (Bossert y Bartha, 1984; Morgan *et. al.*, 1989; Leahy y Colwell, 1990; Huesemann, 1994)

El pH del suelo contaminado fue menor al del suelo control, con valores de 5.6 a 5.7. Este intervalo es muy bajo para el crecimiento de bacterias que es preferentemente entre 6.0 y 8.0 (Pelczar *et. al.*, 1982) por lo que se reconoció la necesidad de ajustar el pH para los siguientes experimentos. Variaciones de pH por contaminación con hidrocarburos por periodos largos lo reportan Bossert y Bartha (1984), Block, *et. al.*(1989) y Amadi *et. al.* (1996). Esto posiblemente por la producción de CO₂ y ácidos orgánicos (Gordon, *et. al.*, 1980).

En la Tabla 9 se observa la nominación para suelos con base en un criterio de fertilidad en el área agrícola. Debido a que el estado del arte de la biodegradación de hidrocarburos todavía no cuenta con información de una clasificación de suelos por el contenido de nutrientes y los reportes – como se discutirá más adelante – algunas veces son contradictorios, se empleó esta nominación como punto de referencia. Un respaldo para el empleo de dicha nominación es la relación directa de un suelo con actividad microbiana con un suelo fértil desde el punto de vista agrícola (Porta *et. al.*, 1994). De acuerdo con esta nominación el suelo control fue un suelo medianamente rico en contenido de materia orgánica, mientras que el contaminado fue extremadamente rico, debido al

Las pruebas de respirometría para el suelo control mostraron una producción de bióxido de carbono cercana a lo reportado en la bibliografía para un suelo control (aproximadamente 460 mg de CO₂ / kg de suelo en Bartha y Pramer, 1965), y elevada para el contaminado (Bartha y Pramer, 1965). Este incremento en más de cinco veces de la producción de CO₂ del suelo contaminado respecto al control - además de los conteos de bacterias - sugirió una población autóctona adaptada y confirmó el potencial de degradación de las bacterias autóctonas, observado en trabajos previos con este mismo suelo.

Como parte de la caracterización se determinó el contenido de metales lixiviables en ambos suelos. Los resultados dieron valores no detectados, con excepción de Ba 0.56 y 0.4 mg/l para los suelos control y contaminado, respectivamente; plata 0.37 mg/l del suelo contaminado; Cd 0.03 mg/l en el suelo control; y Ni 0.08 mg/l del suelo control. Frankenberger, reconoció la inhibición de la biodegradación del diesel a concentraciones de 10 mg/kg de plomo y de 1,000 mg/kg de cadmio en suelo y Salanitro *et. al.*, 1997 no observó efectos en la biodegradación de crudo en presencia de varios metales a concentraciones menores a 20 mg/kg.

B. Optimización de la degradación

1. Selección de las variables para la MSR

Para la optimización de la biodegradación del diesel se seleccionaron dos macronutrientes (nitrógeno y fósforo) que se han reportado como los más importantes para la biodegradación de los hidrocarburos. Estos se requieren debido al desbalance de nutrientes que ocurre como consecuencia del aporte de carbono proveniente de los hidrocarburos presentes en el suelo (Odu, 1972; Brown, *et. al.*, 1983; Bossert y Bartha, 1984; Leahy y Colwell, 1990). Bragg *et. al.*(1994) reportan que la adición adecuada de nutrientes (N y P) incrementa la biodegradación al menos en un factor de cinco.

Los compuestos orgánicos de fósforo y nitrógeno – como los fertilizantes orgánicos – fueron descartados en este estudio debido al aporte de fuente de carbono alterna (Pritchard, 1992; Troy *et. al.*, 1992; Jackson y Pardue, 1999; Mohn y Steward, 2000). De la misma forma, los compuestos que podrían tener un papel como aceptor de electrones (NO₃⁻, SO₄³⁻) se descartaron para evaluar únicamente el efecto del nutriente.

En bacterias el nitrógeno constituye el 10% del peso celular seco (Aiba *et. al.*, 1965). El nitrógeno se emplea en el metabolismo para la síntesis de los aminoácidos, bases púricas y pirimídicas y sus polímeros que son proteínas y ácidos desoxirribonucléicos (ADN) y ribonucléicos (ARN).

Se decidió utilizar como fuente de nitrógeno una sal de amonio por ser la forma asimilable (Frankenberger, 1992; Walworth y Reynolds, 1995). Su utilización no requiere oxidación o reducción, debido a que el nitrógeno en las células (aminoácidos, purinas y pirimidinas) está también en forma de amonio (Gaudy y Gaudy, 1991). A diferencia del amonio, el nitrato se debe reducir a amonio antes de que se incorpore a aminoácidos (Paul y Clark, 1989; Walworth y Reynolds, 1995). Incluso el número de bacterias capaces de asimilar directamente nitrógeno a partir del amonio es mayor comparado con aquellas que pueden reducir los nitratos (Gaudy y Gaudy, 1991). Este proceso es la desnitrificación.

El amonio puede oxidarse (nitrificarse) a nitrito y nitrato de manera relativamente rápida en condiciones aeróbicas y pH neutro (Paul y Clark, 1989). Sin embargo este efecto disminuye por la presencia de hidrocarburos o del diesel (McGill, 1977; Deni y Penninckx, 1999). Además a bajas concentraciones de amonio se reprimen las enzimas requeridas para su nitrificación y obtención de energía de las bacterias autótrofas que no favorecen la degradación de hidrocarburos (Paul y Clark, 1989). Otras posibles pérdidas son la volatilización por formación de amoníaco y adsorción en arcillas que impidan su biodisponibilidad. La primera se controló por el ajuste del pH a 7.2 que reprime la formación de amoníaco (Kim, 1994) y la segunda por la ausencia de arcillas en el suelo empleado.

El empleo de sales de amonio en general para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos lo reportan un importante número de autores (Odu, 1978; Einsele, 1990; Leahy y Colwell, 1990; Lee y Swindoll, 1993; Lewis, 1993; Montemagno, *et. al.*, 1993; Hughes, *et. al.*, 1997). Como cloruro de amonio lo recomiendan varios autores (Wodzinski y Johnson, 1968; Hunt *et. al.*, 1973; Dibble y Bartha, 1979; Brubaker y Exner, 1988; McAllister *et. al.* 1995; Greerdink *et. al.*, 1996; Fiorenza *et. al.*, 1997; Jackson y Pardue, 1999; Mohn y Steward, 2000). Además del sulfato de amonio (Raymond, 1976; Odu, 1978; Atlas, 1991; Frankenberger, 1992; Wright *et. al.*, 1996; Meo *et. al.* 1997).

Para este estudio en particular se seleccionó al NH_4Cl por ser una forma fácilmente soluble y disponible en el mercado, la cual ha sido evaluado en otros estudios como una de las sales de

nitrógeno amoniacales más recomendables (Hunt *et. al.*, 1973; Brubaker y Exner, 1988; Frankenberger, 1992; Walworth y Reynolds, 1995, Greerdink *et. al.*, 1996; Chang y Weaver, 1997; Jackson y Pardue, 1999). Hunt *et. al.* (1973) reportaron a nivel microcosmos durante 30 días que el NH_4Cl favoreció la actividad de biodegradación cinco veces más que el NH_4NO_3 y ligeramente mejor que el NaNO_3 . Mientras que un estudio más reciente Jackson y Pardue (1999) demostraron que el NH_4Cl fue más efectivo en estimular la biodegradación requiriendo sólo el 20% de la concentración de KNO_3 para alcanzar el mismo efecto.

El fósforo es el tercer elemento más requerido por las bacterias ya que representa el 2-3% del peso seco (Aiba *et. al.*, 1965). Este elemento es constituyente de los ácidos nucleicos, nucleótidos, fosfoproteínas, fosfolípidos y ácido teicoico (en gram positivas) (Ehrlinch, 1981). Las formas de sales inorgánicas demostraron ser las más aptas para la biodegradación de hidrocarburos en suelo (Graham *et. al.*, 1999). Esto debido a los requerimientos de enzimas extracelulares para transformar formas orgánicas a inorgánicas, antes de su utilización por parte de las bacterias (Ehrlinch, 1981 y Graham *et. al.*, 1999).

Las fuentes inorgánicas de fósforo utilizadas para fomentar la biodegradación de hidrocarburos en suelo comúnmente incluye a los fosfatos mono y dibásicos y la sal de fosfato más comúnmente empleada ha sido K_2HPO_4 (Wodzinski y Johnson, 1968; Dibble y Bartha, 1979; ; Swindoll *et. al.*, 1988; Song *et. al.*, 1990; Mills y Frankenberger, 1994; Zhou y Crawford, 1995; Graham *et. al.*, 1995; Greerdink *et. al.*, 1996; Chang y Weaver, 1997; Fiorenza y Ward, 1997; Meo *et. al.*, 1997; Salanitro *et. al.*, 1997; Jackson y Pardue, 1999).

El fosfato dibásico de potasio, se eligió por ser una fuente comercial de rápida solubilidad. El fosfato de amonio se descartó debido a que el aporte del P era tres veces mayor al de N, mientras que el nitrógeno amoniacal se requirió arriba de 36 veces que el fosfato, esto complicaba los cálculos experimentales y no ofrecía ninguna ventaja práctica.

El diesel por su parte es una mezcla de hidrocarburos que debido a su relativa baja volatilidad permite que los procesos de biodegradación sean un proceso atractivo en los proyectos de biorremediación de suelos (Jackson, 1990). Su biodegradación se observó en varios estudios (Morgan *et. al.*, 1989; Jackson, 1990; Tan *et. al.*, 1990; Grundmann y Rehm, 1991; Frankenberger, 1992; Jackson, 1992; Troy *et. al.*, 1992; Ying *et. al.*, 1992; Britto *et. al.*, 1993; Lee y Swindoll, 1993;

Rainwater *et. al.*, 1993; Gruiz y Kriston, 1995; Müller-Markgraf, 1995; Walworth y Reynolds, 1995; Aggarwal *et. al.*, 1997; Cassidy y Irvine, 1997; Demque *et. al.*, 1997; Savai, 1997; Paker y Burgos, 1999). Además, los destilados medios del petróleo presentan - bajo condiciones adecuadas - una importante susceptibilidad a la biodegradación. Por ello, se aprovechó un suelo contaminado con diesel que presentó una flora nativa con gran potencial biodegradador del diesel de acuerdo con los análisis preliminares y su caracterización previa (ver sección anterior).

2. Porcentaje de Biodegradación: análisis de variancia y caracterización de superficies de respuesta

2.1. Etapa I

Los resultados del porcentaje de biodegradación de diesel obtenidos de los experimentos I y II se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Porcentajes de biodegradación observados para los experimentos I y II de acuerdo con el diseño experimental

		No. Obs.	x_1	x_2	x_3	Biodegradación (%)	
Experimento I	Diseño 2^3	1	-1	-1	-1	8.79	
		2	-1	-1	1	26.67	
		3	-1	1	-1	52.14	
		4	-1	1	1	78.23	
		5	1	-1	-1	32.58	
		6	1	-1	1	12.35	
		7	1	1	-1	15.10	
		8	1	1	1	19.45	
Experimento II	(modelo de primer orden)	9	0	0	0	34.00	
		10	0	0	0	40.96	
		Puntos Centrales	11	0	0	0	30.74
			12	0	0	0	36.32
			13	0	0	0	38.01
			14	0	0	0	33.92
	(modelo de segundo orden)	Puntos Estrella	15	0	0	1.682	51.10
			16	0	0	-1.682	25.79
			17	0	1.682	0	73.77
			18	0	-1.682	0	6.58
			19	1.682	0	0	21.63
			20	-1.682	0	0	61.24

2.1.1. Experimento I

Para el modelo exploratorio de primer orden, se observó en el análisis de variancia (ver Tabla 11) que las variables no contribuyeron significativamente al ajuste y que la falta de ajuste fue significativa, por lo que la función de regresión no fue lineal. El coeficiente de determinación (R^2) obtenido en este caso fue de 0.47 debido a las interacciones entre variables o efectos de mayor orden que el modelo de primer orden no consideró.

Lo anterior justificó la necesidad de ampliar el diseño experimental con la finalidad de observar los efectos puros de cada variable, así como las interacciones y efectos cuadráticos. Se incluyeron entonces los puntos estrella.

Tabla 11. Análisis de variancia para el modelo de primer orden (Experimento I)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión (β_1, β_2 y β_3)	1923.94	3	641.315	2.98
Residuo	2150.95	10	215.095	
Falta de ajuste	2086.84	5	417.37	32.55
Error puro	64.11	5	12.82	
Coeficiente de determinación (R^2)	0.47			

2.1.2. Experimento II

Los resultados del experimento II se ajustaron a un modelo lineal de tres factores considerando los términos lineales, cuadráticos y las interacciones de primer orden. El coeficiente de determinación para el modelo ajustado fue de 0.90 indicó que sólo el 10% de la variación total no era explicada por el modelo. El análisis de variancia (ANOVA) determinó que no existía una falta de ajuste significativa y que la regresión sí era significativa, por lo que se concluyó que el modelo de segundo orden se aproximaba adecuadamente a la superficie de respuesta (ver Tabla 12).

Los coeficientes estimados para el modelo cuadrático se muestran en la Tabla 13. Los marcados con (*) mostraron un efecto significativo en el porcentaje de biodegradación. Las gráficas de diagnóstico de los residuales se presentan en el anexo 1.

Tabla 12. Análisis de variancia para el modelo de segundo orden (Experimento II)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión	6921.65	9	769.07	10.35
Residuo	743.08	10	74.31	
Falta de ajuste	678.98	5	135.80	10.59
Error puro	64.11	5	12.82	
Coefficiente de determinación (R ²)	0.90			

El modelo ajustado fue:

$$\hat{y} = 35.969 - 11.202x_1 + 14.463x_2 + 5.173x_3 - 13.161x_1x_2 - 7.481x_1x_3$$

El porcentaje de biodegradación observado en el experimento y el pronosticado basado en el modelo ajustado se comparan en la Figura 6. Las variaciones de los puntos observados con respecto a la línea teórica representan la variación de los datos con respecto al modelo de segundo orden. La variabilidad natural del sistema cuantificada como el coeficiente de variación de los seis puntos centrales fue de 10.04%.

Tabla 13. Coeficientes para el modelo cuadrático ajustado en el Experimento II

Variable	Coefficiente	Suma de cuadrados (%)	Valores de t-student	Significancia (P<0.05)	
Constante	β_0	35.969	10.231	*	
x_1	β_1	-11.202	24.760	-4.802	*
x_2	β_2	14.463	41.274	6.201	*
x_3	β_3	5.173	5.281	2.218	*
x_1^2	β_{11}	0.012	0.004	0.005	
x_2^2	β_{22}	-0.432	0.023	-0.190	
x_3^2	β_{33}	-1.045	0.227	-0.460	
$x_1 x_2$	β_{12}	-13.161	20.020	-4.318	*
$x_1 x_3$	β_{13}	-7.481	6.469	-2.455	*
$x_2 x_3$	β_{23}	4.098	1.941	1.345	

* Efecto significativo en la biodegradación

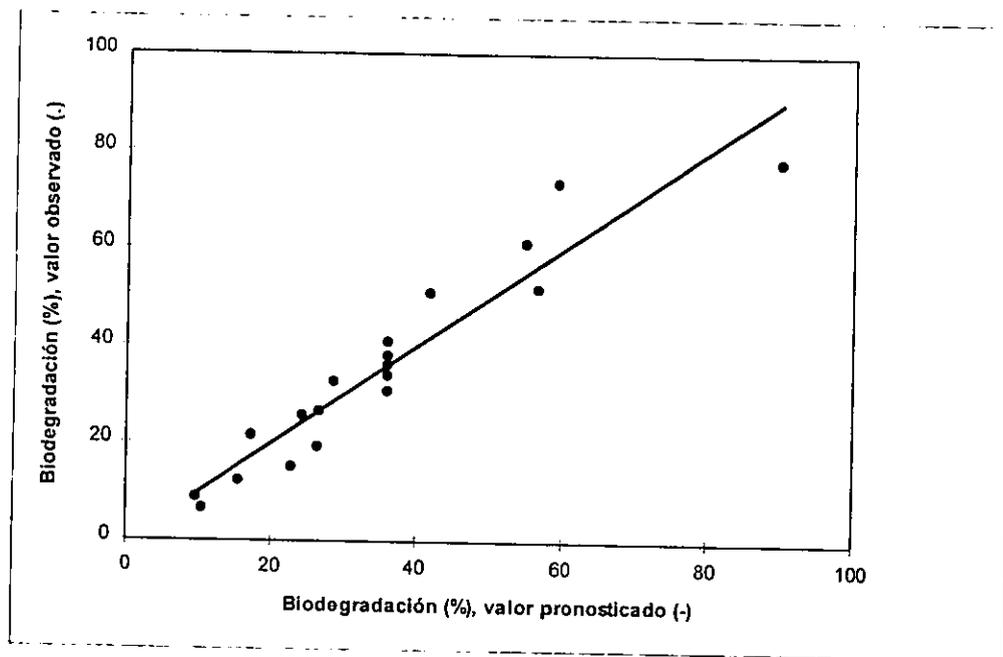


Figura 6. Comparación entre la biodegradación observada y la pronosticada por el modelo cuadrático obtenido en el Experimento II

Las superficies de respuesta y las gráficas de contornos generadas por cada par de variables se muestran en la Figura 7 (para x_1 y x_2), la Figura 8 (para x_1 y x_3) y la Figura 9 (para x_2 y x_3).

2.1.2.1. Efecto del diesel y sus interacciones

Como se observa en la Figura 7 a una alta concentración de diesel se observaron los porcentajes de biodegradación más bajos, esto posiblemente se debió a efectos inhibitorios y/o tóxicos del combustible sobre los microorganismos. A concentraciones más bajas de diesel se incrementó la biodegradación y empezó a ser más representativo el efecto de la concentración del nitrógeno amoniacal sobre la biodegradación. En la Figura 8 se observa un comportamiento similar al de la Figura 7, con la disminución de la concentración del diesel se presentó un punto de inflexión en el cual se favoreció la biodegradación y se hizo más evidente el efecto de la concentración del fosfato. Este punto de inflexión que se observó en la cercanía del punto central para la concentración de diesel, se evaluó con base en los coeficientes del modelo matemático mediante un sistema de ecuaciones. Como resultado se obtuvo una concentración de 37,873 mg/kg que se interpreta como la concentración máxima que puede soportar la flora nativa bajo las condiciones de experimentación para que ocurra la biodegradación. Lo anterior sugiere la necesidad de diluir un 27% el suelo contaminado para llegar a la concentración indicada.

Efectos de inhibición de la actividad degradadora por altas concentraciones de hidrocarburos se observó en varios estudios (Brown *et. al.*, 1983; Jackson, 1990; Song y Bartha, 1990; Raymond, 1992; Ying *et. al.*, 1992; McAllister *et. al.*, 1995; Chang *et. al.*, 1996; Atlas y Bartha, 1998). Leahy y Colwell (1990) consideraron que debido a la presencia de algunos compuestos tóxicos en la mezcla de hidrocarburos existe un umbral o concentración máxima en el suelo a la cual se inhibe la actividad microbiana. Otra posibilidad sugerida por Frankenberger (1992) fue la acumulación de intermediarios hasta niveles tóxicos. Sin embargo, Brown *et. al.* (1983) y Bossert y Bartha (1984) sugirieron que también puede ser consecuencia de la reducción de la biodisponibilidad de oxígeno y/o de nutrientes. Los reportes de niveles de concentración de hidrocarburos por debajo de los cuales la degradación sea representativa se reportan de 7,000 a 100,000 mg/kg (Odu, 1972; Jackson, 1990; Leahy y Colwell, 1990; Ying *et. al.*, 1992) y de inhibición arriba de 100,000 mg/kg (Atlas y Bartha, 1998) o 150,000 mg/kg (Leahy y Colwell, 1990).

El relativo gran incremento en el porcentaje de biodegradación al disminuir la concentración de diesel por debajo del punto de inflexión y aplicar nutrientes, se debió al efecto sinérgico de la interacción diesel - nitrógeno amoniacal y diesel - fosfatos. Este efecto sinérgico fue significativo en el análisis de variancia con un aporte del 20% en la suma de cuadrados para diesel - nitrógeno amoniacal y de 6.5% para diesel - fosfatos. Algunos autores reportaron este sinergismo (Bossert y Bartha, 1984; Swindoll *et. al.*, 1988), por ejemplo Bossert y Bartha (1984) observaron que el efecto de la adición de nutrientes sólo se hizo evidente cuando se degradó la mitad de la concentración de los hidrocarburos presentes.

2.1.2.2. Efecto del nitrógeno amoniacal y fosfatos

Se observa en la Figura 9 que a mayor concentración de nitrógeno amoniacal y de fosfatos se obtuvo un mayor porcentaje de biodegradación, pero que a baja concentración de nitrógeno amoniacal el aporte de fosfato dejó de ser importante. Esto último puso de manifiesto la importancia de la adición de nitrógeno, observado también en el alto porcentaje de la suma de cuadrados en la Tabla 13. La interacción nitrógeno amoniacal-fosfatos no resultó significativa en el ANOVA, esto también se observó en la poca curvatura de la gráfica de contornos. La carencia de significancia de la interacción nitrógeno amoniacal-fosfato indicó que dentro del dominio experimental no se observaron efectos de interacción sinérgica comúnmente atribuidos a los ciclos biogeoquímicos en suelos, posiblemente por no limitarse la disponibilidad de uno de ellos.

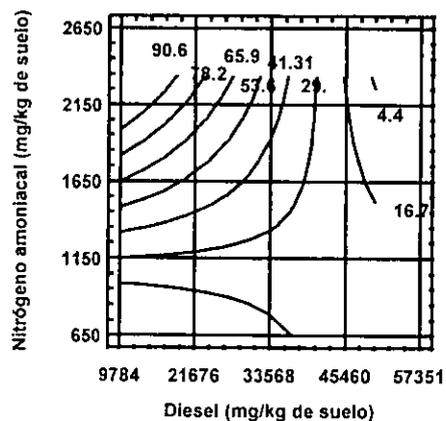
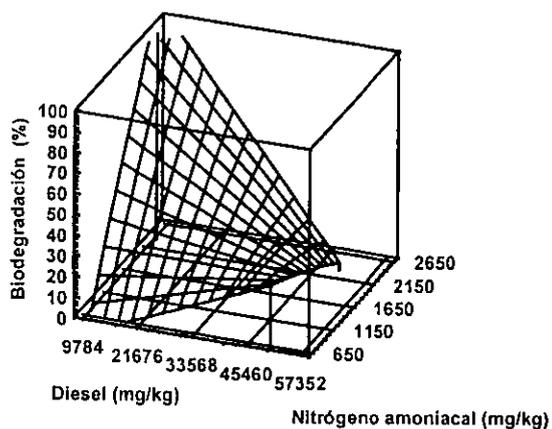


Figura 7. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de diesel (x_1) y de nitrógeno amoniacal (x_2).

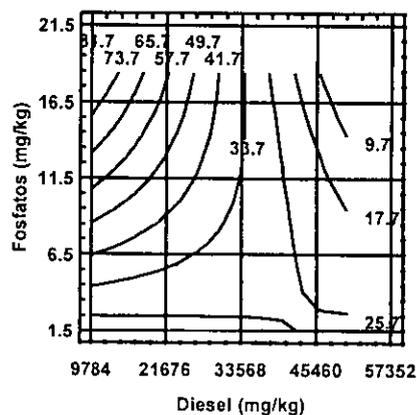
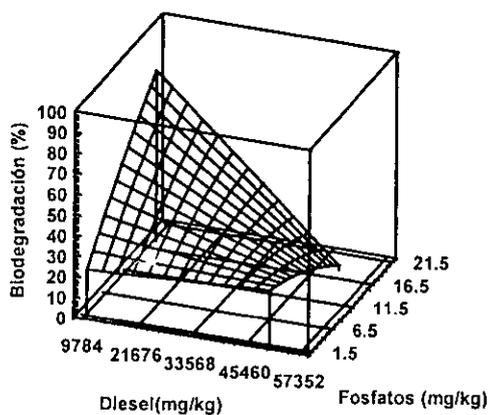


Figura 8. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de diesel (x_1) y de fosfatos (x_3).

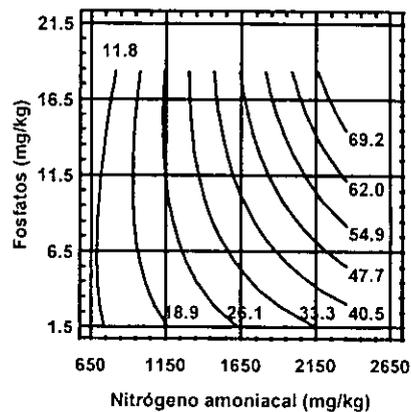
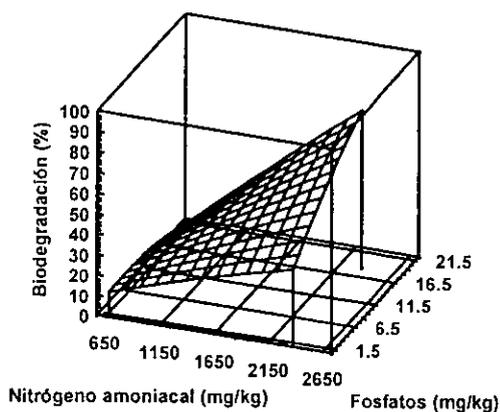


Figura 9. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de nitrógeno amoniacal (x_2) y de fosfatos (x_3).

Las figuras 7, 8 y 9 revelaron que no se alcanzó un valor óptimo, lo que hizo necesario mover el dominio experimental a valores de diesel más bajos y de nitrógeno amoniacal y de fosfatos más altos.

2.2. Etapa II

Con base en los resultados de la primera etapa experimental se desarrolló la segunda evaluando el efecto del diesel de una concentración de 1,000 a 19,000 mg/kg, de nitrógeno amoniacal de 1,004.86 a 3,595.14 mg/kg; y de fosfatos de 10 a 60 mg/kg de acuerdo con el diseño experimental anteriormente descrito. Del mismo modo que en la etapa I, en la etapa II se determinó un primer diseño experimental (experimento III) que permitiera observar la curvatura identificada en la región explorada en la etapa I y justificara el empleo de un cuarto diseño experimental (experimento IV). Los datos del experimento se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Porcentajes de biodegradación observados para los experimentos III y IV de acuerdo con el diseño experimental

		No.	x_1	x_2	x_3	Biodegradación (%)	
		Obs.					
Experimento III	Diseño Experimento III (modelo de primer orden)	1	-1	-1	-1	82.58	
		2	-1	-1	1	78.14	
		3	-1	1	-1	77.36	
		4	-1	1	1	87.43	
		5	1	-1	-1	78.97	
		6	1	-1	1	82.75	
		7	1	1	-1	71.73	
		8	1	1	1	81.19	
	Experimento IV	Puntos Centrales	9	0	0	0	81.99
			10	0	0	0	79.8
			11	0	0	0	83.31
			12	0	0	0	82.09
			13	0	0	0	79.34
			14	0	0	0	79.18
(modelo de segundo orden)	Puntos Estrella	15	0	0	1.682	85.17	
		16	0	0	-1.682	80.93	
		17	0	1.682	0	69.48	
		18	0	-1.682	0	83.45	
		19	1.682	0	0	69.5	
		20	-1.682	0	0	87.12	

Al mismo tiempo de la realización de la Etapa II se corrieron dos controles del suelo contaminado sin diluir, los cuales no se incluyeron en el diseño ni se aleatorizaron con este. El primero identificado como Control I se le ajustó el pH y la humedad, pero no se le adicionaron nutrientes. Mientras que al Control II se le sometió a 5 periodos de esterilización manteniendo 121°C y 1.1 atm durante 30 minutos para eliminar la actividad degradadora nativa (Alef, 1995). El Control I presentó una pérdida de diesel del 2.99% mientras que en el Control II fue del 1.1%.

Respecto a la pérdida de diesel por la esterilización, en algunos estudios se reporta de 6 a 9.5% de pérdida para un diesel relativamente fresco (Atlas, 1991; Aggarwal *et. al.*, 1997; Cassidy y Irvine, 1997). También se han reportado valores más altos con una incertidumbre de la eficiencia en la esterilización (Kästner *et. al.*, 1998). Un posible mecanismo de pérdida - además del fraccionamiento y la volatilización - es la reacción por la oxidación con la materia orgánica del suelo (Banerjee *et. al.*, 1997). Si se consideran las posibles pérdidas durante el proceso de esterilización, el 1% de disminución que se observó aseguró que la disminución en la concentración de diesel - en los experimentos realizados - se debe a un proceso de biodegradación. La aplicación de los controles I y II se discute a lo largo del capítulo.

2.2.1. Experimento III

En este segundo modelo exploratorio de primer orden se observó que las variables en el modelo no contribuyeron significativamente al ajuste y que la falta de ajuste fue significativa, determinando la necesidad de evaluar términos de mayor orden, ver Tabla 15. Por lo que se concluyó que la función de regresión no fue lineal. Esto era de esperarse debido a la evidencia de curvatura del sistema en una sección de la región explorada (experimento II) y a que el sistema presentó un comportamiento similar de continuidad de la Etapa I a la Etapa II (ver sección 3 de la MSR). Sin embargo, fue necesario confirmar si la segunda etapa experimental reflejaba la tendencia de la primera. La curvatura no explicada por el modelo se reflejó también en el bajo coeficiente de determinación (R^2) con un valor de 0.37.

Tabla 15. Análisis de variancia para el experimento III

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión (β_1, β_2 y β_3)	62.08	3	20.69	1.94
Residuo	106.63	10	10.66	
Falta de ajuste	91.62	5	18.33	6.11
Error puro	15.00	5	3.00	
Coeficiente de determinación (R^2)	0.37			

2.2.2. Experimento IV

Los resultados de la Etapa II se ajustaron a un modelo lineal de un polinomio de segundo orden. El análisis de variancia (ANOVA) indicó que no existía una falta de ajuste significativa y que la regresión sí fue significativa, por lo que se concluyó que el modelo de segundo orden se aproximaba adecuadamente a la superficie de respuesta (Tabla 16). El experimento IV presentó una variación natural menor que el experimento II, representada por el coeficiente de variación de los puntos centrales, con un valor de 2.14% comparado con el 10.04% observado en el experimento II. Asimismo, las gráficas de diagnóstico comprobaron que el modelo era idóneo (ver anexo 1).

Tabla 16. Análisis de variancia para el modelo de segundo orden (Experimento IV)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión	359.22	9	39.91	3.25
Residuo	122.93	10	12.29	
Falta de ajuste	107.93	5	21.59	7.20
Error puro	15.00	5	3.00	
Coefficiente de determinación (R^2)	0.75			

Los coeficientes estimados para los términos lineales, cuadráticos y las interacciones de primer orden del modelo propuesto y su significancia se muestran en la Tabla 17. Los marcados con (*) mostraron un efecto significativo en el porcentaje de biodegradación.

Tabla 17. Coeficientes para el modelo cuadrático ajustado en el Experimento IV

Variable	Coeficiente	Suma de cuadrados (%)	Valores de t-student	Significancia (P<0.05)
Constante	β_0 80.924		56.591	*
X_1	β_1 -2.966	33.758	-3.126	*
X_2	β_2 -2.067	16.393	-2.178	*
X_3	β_3 1.904	13.910	2.007	*
X_1^2	β_{11} -0.755	2.312	-0.818	
X_2^2	β_{22} -1.408	8.027	-1.524	*
X_3^2	β_{33} 0.920	3.428	0.996	
$X_1 X_2$	β_{12} -1.609	5.818	-1.298	*
$X_1 X_3$	β_{13} 0.951	2.034	0.767	
$X_2 X_3$	β_{23} 2.524	14.319	2.036	*

* Efecto significativo en la biodegradación

El modelo ajustado fue:

$$\hat{y} = 8.924 - 2.966x_1 - 2.067x_2 + 1.904x_3 - 1.408x_2^2 - 1.609x_1x_2 + 2.524x_2x_3$$

Del ANOVA para la regresión se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.75, este valor es bajo en comparación con el 0.90 alcanzado en el experimento II, sin embargo, se debe considerar que en sistemas heterogéneos – como es el suelo – los coeficientes de determinación no alcanzan valores altos y se permite su análisis siempre que cumpla con los análisis de falta de ajuste del modelo y de la contribución significativa de las variables a la regresión (Lind *et. al.*, 1960; Büyüksönmez *et. al.*, 1998; Launen *et. al.*, 1999; Lyons *et. al.*, 1999; y McCarron *et. al.*, 1999). Otros análisis de biodegradación en suelo que emplean modelos de regresión han empleado valores más bajos en su análisis e interpretación (Hinchee y Ong, 1992; Walworth y Reynolds, 1995; Freijer *et. al.*, 1996; Mohn y Steward, 2000).

Las superficies de respuesta y las gráficas de contorno generadas por cada par de variables se muestran en la figura 10 (para x_1 y x_2), figura 11 (para x_1 y x_3) y figura 12 (para x_2 y x_3).

2.2.2.1. Efecto del diesel y sus interacciones

Como se muestra en la Figura 10, a menor concentración del diesel se obtuvo un mayor porcentaje de biodegradación. Esto pudo deberse a la disminución de los efectos inhibitorios y/o tóxicos del diesel sobre los microorganismos, sin alcanzar niveles tan bajos de la fuente principal de carbono. La interacción diesel - nitrógeno amoniacal que fue significativa en el ANOVA, se observó también en la gráfica de contornos de la Figura 10, representándose curvas y no sólo líneas paralelas. Así mismo, las líneas paralelas de la gráfica de contornos de la Figura 11 muestran poca curvatura demostrando la falta de interacción del diesel con los fosfatos, reportada también en el ANOVA (Tabla 17).

2.2.2.2. Efecto del nitrógeno amoniacal y sus interacciones

De acuerdo con la Figura 10, a baja concentración de nitrógeno amoniacal se observó poco efecto en el porcentaje de biodegradación por la adición del diesel. Sin embargo, al aumentar la concentración de nitrógeno amoniacal se alcanzó un máximo en el porcentaje de biodegradación para volver a disminuir incluso muy por debajo de la biodegradación alcanzada inicialmente. Este resultado concuerda con las referencias y datos reportados por Hunt *et. al.* (1973); Graham *et. al.* (1995); Walworth *et. al.* (1997); Graham *et. al.* (1999) quienes observaron un máximo y/o inhibición al aumentar de manera sistemática la concentración de sales de nitrógeno en la biodegradación de hidrocarburos.

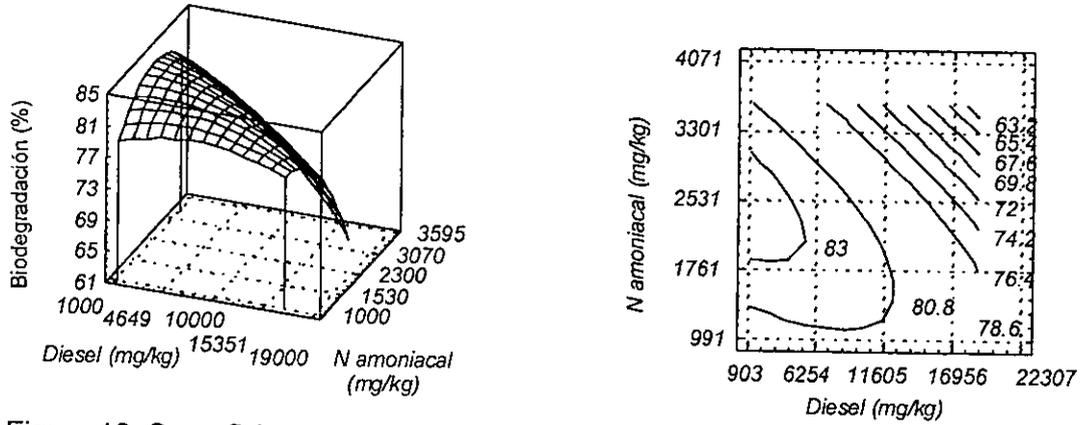


Figura 10. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de diesel (x_1) y nitrógeno amoniacal (x_2).

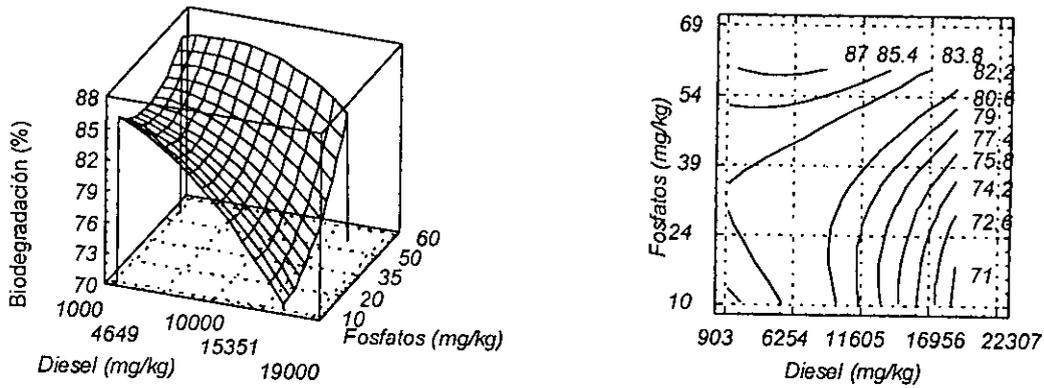


Figura 11. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de diesel (x_1) y de fosfatos (x_3).

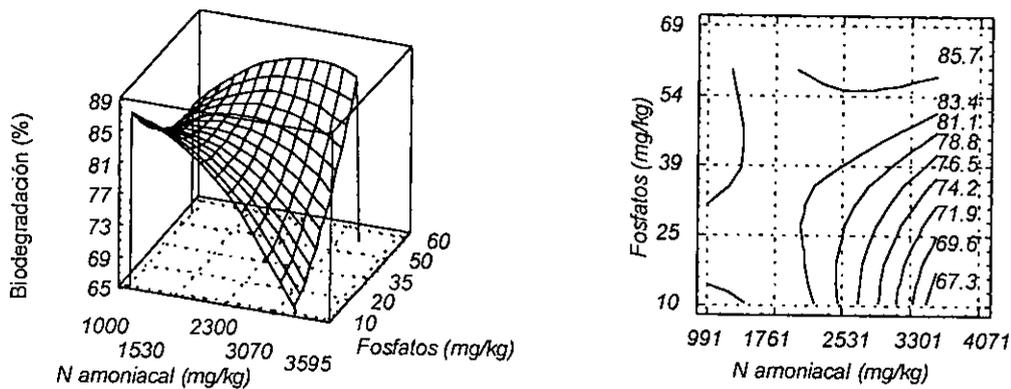


Figura 12. Superficie de respuesta y gráfica de contornos del porcentaje de biodegradación en función de las concentraciones de nitrógeno amoniacal (x_2) y fosfatos (x_3).

Este efecto máximo producido por el nitrógeno depende de la humedad por el impacto del nitrógeno inorgánico fertilizante en el potencial osmótico del suelo según sostienen Walworth *et. al.* (1997). Efectos negativos en la población degradadora por salinidad al aplicar nutrientes se reportan por McGill (1977) y Käster *et. al.* (1998). Por otro lado, Graham *et. al.* (1995) observaron el efecto sobre la biodegradación de hidrocarburos a altas concentraciones de sales de nitrógeno, descartan la posibilidad de un cambio de nutriente limitante de nitrógeno a carbono y plantean la hipótesis de un efecto colimitante de N y C, incluyendo cambios de la población microbiana hacia aquellas con menor actividad degradadora. Esta última posibilidad fue más desarrollada por Smith *et. al.* (1998) verificando los efectos del nitrógeno y fósforo y sus interacciones, pero sin un respaldo estadístico de optimización. Las sugerencias de Smith *et. al.* (1998) se basan en cambios en la composición de la comunidad microbiana de acuerdo con la teoría "Tasa de Recursos" utilizada ampliamente en el área de ecología de poblaciones.

La hipótesis de un efecto colimitante de N y C se podría verificar si se observan cambios drásticos en la tasa de crecimiento microbiano y el rendimiento celular como función de cambios sutiles en la composición de la fuente de carbono (Egli, 1991). Esta hipótesis no ha sido evaluada, sin embargo Egli (1991) y Alexander (1994) reafirman que en el ambiente - a diferencia de lo que sucede en estudios de laboratorio al utilizar sustratos puros - existen nutrientes no homólogos (como el C, N y P) necesarios para distintas funciones fisiológicas que pueden presentar limitaciones múltiples (colimitaciones).

Algunos antecedentes que reportan disminución de la actividad biodegradadora de hidrocarburos por exceso de nitrógeno como nutriente reportados en la literatura se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Estudios previos que determinaron una disminución de la actividad biodegradadora de hidrocarburos por la adición excesiva de nitrógeno

Concentración de nitrógeno adicionado mg/kg	Tipo de suelo	Referencia
100	Suelo tipo migajón limoso	Frankenberger, 1992
119	Subsuelo arenoso	Zhou y Crawford, 1995
200 a 300	Suelo tipo cuarso de arena	Braddock <i>et. al.</i> , 1997
300	Subsuelo tipo grava - arena	Walworth, 1997
400	Suelo tipo arena	Huntjens <i>et. al.</i> , 1986
903	Suelo tipo franco limoso	Walworth <i>et. al.</i> , 1997
913	Suelo tipo arcilla arenosa	Brown <i>et al.</i> , 1983
1667	Suelo tipo franco arenoso	Dibble y Bartha, 1979
1750	Suelo arenoso	Morgan y Watkinson, 1992
2200	Tres suelos superficiales	Mohn y Steward, 2000
4000	Suelo tipo migajón limoso	Walworth <i>et. al.</i> , 1997
4005	Suelo tipo franco limoso	Genouwet <i>et. al.</i> , 1994

De acuerdo con las referencias de la Tabla 18, la concentración a la cual el nitrógeno causa inhibición o disminución de la actividad biodegradadora puede variar dependiendo de la humedad del suelo, de la biodisponibilidad de los nutrientes, entre ellas de la concentración de nitrógeno propia del suelo, concentración del contaminante y en general de las condiciones de experimentación. De la misma manera, algunos autores indican que una excesiva fertilización puede resultar en una disminución de la actividad oxidativa de hidrocarburos por parte de los microorganismos en el suelo - e incluso su inhibición - debido a un aumento de la nitrificación y de la toxicidad de amonio y nitrato (Hunt *et. al.*, 1973; Huesemann, 1994; Zhou y Crawford, 1995). Hunt *et. al.* (1973) plantearon dos hipótesis de la toxicidad del nitrógeno en la biodegradación de hidrocarburos, la primera se relaciona con la acumulación de nitrito debido a la mayor sensibilidad de *Nitrobacter* (bacteria nitrificante de NO₂ a NO₃) a algunos compuestos tóxicos que *Nitrosomona*, bacteria nitrificante de NH₃ a NO₂ (respaldada por Paul y Clark, 1989). La segunda hipótesis se basa en la formación de óxidos de nitrógeno, especialmente en condiciones ácidas de estrés de oxígeno, o de compuestos organonitrogenados, formados a partir de la materia orgánica o de los hidrocarburos. Ninguna de estas dos hipótesis de Hunt *et. al.* (1973) se han podido corroborar. Algunos reportes no determinaron de manera sistemática el efecto negativo del nitrógeno, pero si reportaron su efecto sobre la biodegradación e incluso inhibición (Song y Bartha, 1990; Durant, 1995; Müller - Markgraf, 1995; USEPA, 1999)

Otros autores incluso recomiendan no adicionar nitrógeno si el suelo naturalmente contiene más de 50 mg/kg de nitrógeno basal y no añadir más de 100 mg/kg de nitrógeno en una aplicación y brindar varias aplicaciones hasta alcanzar el aporte estimado como requerido (Frankenberger, 1992; Huesemann, 1994; Walworth y Reynolds, 1995 y Walworth *et. al.*, 1997). Sin embargo esta recomendación no concuerda con los datos obtenidos en este estudio.

Walworth *et. al.* (1997a y b) recomiendan que para comprender el fenómeno de inhibición es necesario calcular la concentración de nitrógeno en función del contenido de agua, dividiendo los mg/kg de nitrógeno entre la humedad. Según sus investigaciones para varios tipos de suelo el óptimo se encuentra entre 1,000 y 2,000 mg de N/kg de agua en suelo y la inhibición en 5,500. En el presente estudio el óptimo se evaluó a 4,501 y 5,220 para 2,500 y 2,900 mg/kg de nitrógeno amoniacal, respectivamente, en un suelo con 43.2% de humedad. Aparentemente sí aplicaron las observaciones de Walworth en el presente estudio. Cabe destacar aquí, que no se observó un efecto inhibitorio como tal pues el porcentaje de biodegradación no fue menor al del Control I (3%).

Una particularidad del máximo alcanzado por la adición del nitrógeno amoniacal fue que varía en función de la concentración del diesel (ver figura 10). El máximo del nitrógeno amoniacal fue reflejo del significativo efecto de su término cuadrático x_2 , mientras que su variación con respecto a la concentración del diesel fue tanto consecuencia de este efecto como de la interacción diesel - nitrógeno amoniacal. Por ejemplo, de acuerdo con el modelo de segundo orden y como se observa en la Figura 10 a 1,000 mg/kg de diesel, se alcanzó un mayor porcentaje de biodegradación (84%) cuando el nitrógeno amoniacal fue de 2,475 mg/kg, pero cuando el diesel se encontró en una concentración de 19,000 mg/kg el mayor porcentaje de biodegradación (77%) se obtuvo cuando el nitrógeno amoniacal fue ligeramente mayor a 1,000 mg/kg. Así mientras más se incrementó la concentración de diesel se requirió una menor cantidad de nitrógeno amoniacal para alcanzar el mayor porcentaje de biodegradación. Este efecto de interacción puede deberse a los requerimientos nutricionales de los microorganismos, una mayor concentración de diesel produce un menor porcentaje de biodegradación, por lo que se requerirá menos nitrógeno amoniacal.

Por otro lado, de acuerdo con la Figura 12, el efecto del nitrógeno amoniacal también produjo un máximo dependiendo de la concentración de los fosfatos. Este efecto de "umbral" máximo de la concentración de nitrógeno amoniacal, el cual varió dependiendo del aporte de los fosfatos concuerda con otros experimentos (Graham *et. al.*, 1999). De acuerdo con Graham *et. al.* (1999) este fenómeno fue producido por el efecto limitante del nitrógeno y fósforo biodisponible. En este trabajo,

se observó que a 60 mg/kg de fosfatos, hubo una mayor biodegradación (87.5%) cuando el nitrógeno amoniacal fue de 2,865 mg/kg. Al parecer, mayores o menores aportes de nitrógeno amoniacal no producen una mayor biodegradación, pero en cambio a 35 mg/kg de fosfatos se alcanzó una mayor biodegradación (81.7%) cuando el nitrógeno amoniacal fue de 1,734 mg/kg. Este efecto máximo de nitrógeno amoniacal continuó disminuyendo conforme menor fue el aporte de fosfatos, incluso por debajo de la región experimental. Esto se debió a que ambos nutrientes se requirieron en mayor cantidad al presentar una mayor actividad degradadora. Además se debe considerar el efecto sinérgico positivo que producen ambos, esto se confirmó en el signo positivo del coeficiente estimado de interacción X_2X_3 y en su alto aporte en la suma de cuadrados en la Tabla 17.

Efectos de sinergismo de nitrógeno - fósforo fue reportado por otros autores (Atlas y Bartha, 1972; Alexander, 1984; Walworth y Reynolds, 1995; Wright, et. al, 1996; Braddock *et. al.*, 1997; y Swindoll *et. al.*, 1998; y Graham *et. al.*, 1999). La interacción nitrógeno amoniacal con los fosfatos resulta fácil de elucidar si se consideran que en las rutas metabólicas, así como en la formación de metabolitos, las bacterias requieren de la presencia de nitrógeno y de fósforo. Esta no se evidenció en la primera etapa dado que no fue significativa posiblemente por el bajo requerimiento de nutrientes debido a la inhibición y/o toxicidad del diesel.

2.2.2.3. Efecto de los fosfatos y sus interacciones

De acuerdo con la Figura 11, se observó que a altas concentraciones de diesel el aporte de fosfatos incrementó el porcentaje de biodegradación, mientras que a bajas concentraciones el aporte de fosfatos no fue muy relevante. Esto se confirmó en el ANOVA, donde el diesel tuvo un importante efecto en el porcentaje de biodegradación con un 34% en aporte de la suma de cuadrados, en cambio el efecto por aporte de fosfatos fue dos veces y media menor (13%), como se puede ver en la Tabla 17. Altas concentraciones de fósforo favorecen la biodegradación de hidrocarburos significativamente de acuerdo con Chang *et. al.*, 1996.

La interacción nitrógeno amoniacal con los fosfatos fue significativa, lo cual se representó en las líneas curvadas de la gráfica de contornos de la Figura 12. De acuerdo con esta figura a bajas concentraciones de fosfatos se observaron bajos porcentajes de biodegradación, pero al aumentar la concentración de fosfatos se obtuvo un mayor porcentaje e incluso mejoró con un mayor aporte de nitrógeno amoniacal. También se incrementó el porcentaje de biodegradación al aumentar la concentración de nitrógeno amoniacal, pero a diferencia de los fosfatos éste alcanzó un máximo.

La concentración de fosfatos posiblemente alcance un máximo a concentraciones más altas de 60 mg/kg (Morgan *et. al.*, 1981; Song y Bartha, 1990; USEPA, 1999), contradiciendo las expectativas de su efecto y las recomendaciones de concentración óptima entre 25 y 35 mg/kg (Pope, 1996). Sin embargo, Walworth y Reynolds reportaron una mejor biodegradación del diesel a 120 y 180 mg/kg comparado con 60 mg/kg de P-fosfato. Otros autores reportaron que con aportes por arriba de 500 mg/kg de fosfatos (aplicado como K_2HPO_4) se apreció una disminución de la degradación del diesel en suelo y arriba de 1,000 mg/kg se inhibió la biodegradación (Mills y Frankenberger, 1994). Este estudio coincide con otro más reciente que reportó inhibición a 520 mg/kg de fosfatos (Mohn y Steward, 2000). De acuerdo con Atlas y Bartha (1972) se puede alcanzar un máximo por saturación del sistema de fosfatos, por lo que un mayor aporte no incrementaría la mineralización. Autores como Morgan *et. al.* (1981); Song y Bartha (1990); Mills y Frankenberger (1994); y USEPA (1999) recomiendan considerar que los posibles excesos de fosfatos que no favorezcan la biodegradación, puedan fomentar el crecimiento de algas por aporte nutrientes y con ello se produzcan un alza de los costos de la remediación. En el presente estudio los fosfatos presentaron un efecto menor (ver aportes de suma de cuadrados en la Tabla 17) e incluso su aporte fue marginal en las condiciones de mayor porcentaje de biodegradación a bajas concentraciones de diesel.

2.3. Resumen de los efectos

Tanto en las gráficas como en el análisis de eigenvalores (no mostrados) se observó que no se alcanzó un óptimo. Sin embargo, se determinó que por debajo de 38,000 mg/kg de diesel se incrementó significativamente la biodegradación y que a menor concentración aumentó el porcentaje de biodegradación. Explorar con un diseño experimental a concentraciones iniciales de diesel menores a 1000 mg/kg puede fácilmente alcanzar el límite de cuantificación del método analítico (100 mg/kg) al final del periodo de 30 días de biodegradación.

El nitrógeno amoniacal sí presentó un óptimo en el intervalo de 2,500 a 2,900 mg/kg dependiendo de la concentración del diesel y de los fosfatos. En cambio los fosfatos no alcanzaron un óptimo, pero es de esperarse que su incremento tenga poco efecto en la biodegradación del diesel.

Aunque no se alcanzó un óptimo en el sentido estricto, sí se incrementó el porcentaje de biodegradación hasta un 87.45%, es decir un 85% por arriba del suelo Control I. Este porcentaje para 30 días estuvo en la mayoría de los casos por arriba de los máximos reportados de diesel o calculados para 4,649 mg/kg de diesel (Tabla 19). Sin embargo, Morgan *et. al.*, 1989 recopilaron

tasas de degradación de hidrocarburos de la literatura con las se calcularon biodegradación desde el 12% hasta cerca de 100% para las condiciones actuales. Se debe considerar que a nivel de campo estas las variaciones de los reportes suelen ser mayores (Glazovskaya y Pikovsky, 1985), incluso por ordenes de magnitud (Atlas, 1991).

Tabla 19. Porcentajes de biodegradación reportados en la literatura*

Porcentaje de biodegradación	Condición	Referencia
0.25 a 12.26%	En campo por bioventeo	Hinchee y Ong, 1992
10 a 74%	En campo por biopila	Troy <i>et. al.</i> , 1992
11%	Calculado en reactor	Cassidy y Irvine, 1997
15%	Aumento de la biodegradación en 9 semanas en columnas	Rainwater <i>et. al.</i> , 1993
16%	Incremento de la biodegradación	Britto <i>et. al.</i> , 1997
21 - 47%	Para crudo	Salanitro <i>et. al.</i> , 1997
30%	Composteo en biopilas	Jorgensen <i>et. al.</i> , 2000
44%	A nivel de campo	Piotrowski <i>et. al.</i> , 1992
44%	Bioventeo en 42 días	Lee y Swindoll, 1993
50 a 60%	Estudio a nivel laboratorio	Margesin y Schinner, 1997b
53%	Durante 20 días	Margesin y Schinner, 1997a
56%	A nivel mesocosmos	Taylor y Viraraghavan, 1999
66%	Aproximado a nivel laboratorio	Frankenberger, 1992
77%	A nivel piloto	Grundmann y Rehm, 1991
80%	Biorreactor continuo de 105 l	Britto, <i>et. al.</i> , 1996
84%	Para Jet Fuel	Atlas y Bartha, 1993
84 a 88%	A nivel piloto	Demque <i>et. al.</i> , 1997
85%	Para diesel a 180 mg/kg	Walworth y Reynolds, 1995
86%	Durante 40 días	Wilson, 1999
97%	Mineralización alcanzada a bajas concentraciones de diesel de 100 a 300 mg/kg durante 60d	Tan <i>et. al.</i> , 1990
99.81%	Para diesel durante 88 días	Frankenberger, 1992
cercano 100%	Durante 30 días por hidrocarburos poliaromáticos en sedimentos	Hughes <i>et. al.</i> , 1997

* Algunos valores se calcularon para 4,649 mg/kg de diesel durante 30 días.

Los datos corresponden a la biodegradación de diesel, al menos que se indique lo contrario.

3. Continuidad de la Etapa I a la Etapa II

Aunque los experimentos de los modelos de segundo orden, tanto de la Etapa I como la II, no se diseñaron para determinar la continuidad de las superficies ajustadas, se pudo observar la tendencia de la primera etapa reflejada en la segunda (Figura 13).

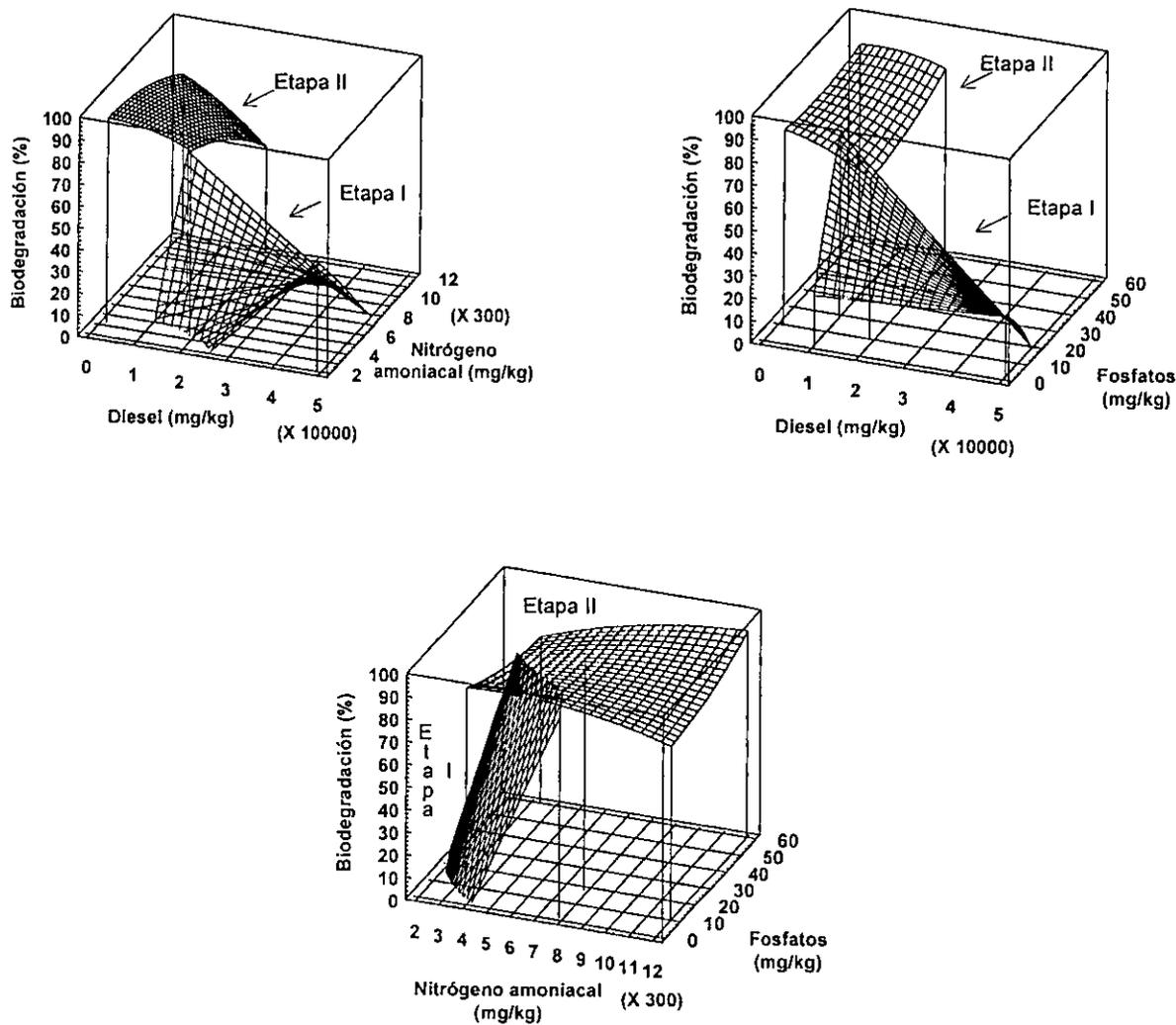


Figura 13. Comparación de las superficies de respuesta de la etapa I y II

La Figura 13 muestra las gráficas de la superficie de respuesta de la etapa I y II, por pares de los efectos de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos. Cada gráfica permite observar el porcentaje de biodegradación por el efecto de dos variables a la vez, pero no distingue el efecto de la tercera variable. Por ejemplo en la gráfica de Diesel - Nitrógeno amoniacal, el efecto benéfico de haber incrementado la concentración de fosfatos para la segunda etapa no se puede representar en dicha gráfica. Sin embargo si se observa un incremento en el porcentaje de biodegradación de la superficie de respuesta.

Otra opción para observar la continuidad de las etapas es considerar el efecto de las tres variables al mismo tiempo. Esto se logró calculando los porcentajes de biodegradación tanto para el modelo de la superficie de respuesta de la etapa I como la II dentro de la región experimental que se traslapó. Con los puntos de la Tabla 20 que corresponden a valores que pertenecen tanto a la región experimental de la primera etapa, como a la segunda, se construyó la Figura 14, en la que se observa una aproximación muy cercana en la respuesta que es el % de biodegradación.

Tabla 20. Valores de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos empleados en la primera y segunda etapa

Punto	Diesel (ppm)	Nitrógeno amoniacal (ppm)	Fosfatos (ppm)
1	14500	1672,5	14,205
2	10000	1672,5	14,205
3	19000	1672,5	14,205
4	10000	1800,0	14,205
5	10000	1672,5	12
6	10000	1672,5	16

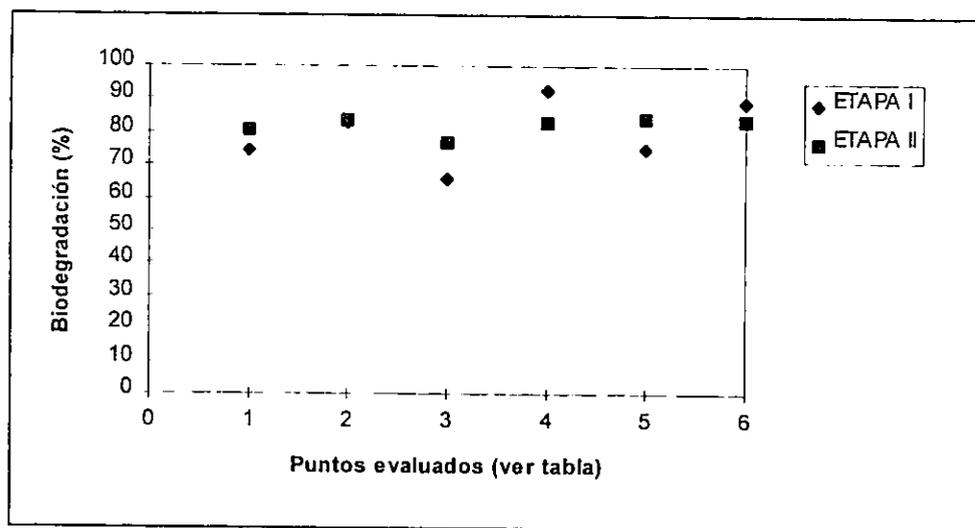


Figura 14. Valores estimados para los puntos de la Tabla 20.

Tanto la Figura 14, como la 13, permiten demostrar la secuencia de la segunda etapa con base en la tendencia determinada por la primera, y confirma que la región experimental propuesta para el segundo diseño fue adecuada.

C. Relación C:N:P

Con base en los resultados obtenidos tanto de la Etapa I como la Etapa II se intentó vislumbrar algún patrón que relacionara los valores de C:N:P, calculados a partir de los diseños experimentales de superficie de respuesta, con los porcentajes de biodegradación. Se decidió basar la relación C:N:P en cien partes de carbono (diesel) por permitir comparar todos los valores de nitrógeno (amoniaco) y fósforo (fosfato) al mismo tiempo. Si se hubiera relacionado de la forma tradicional fijando con el valor de 1 al nitrógeno o al fósforo, no se les podría comparar con una revisión directa de los datos.

1. Etapa I

En la Tabla 21, se muestran los porcentajes de biodegradación para los valores de C:N:P de cada una de las observaciones de la Etapa I. Los porcentajes de biodegradación se graficaron en orden ascendente contra la relación C:N:P conforme a la Tabla 21 y Figura 15.

Tabla 21. Porcentaje de biodegradación para cada relación C:N:P de la Etapa I

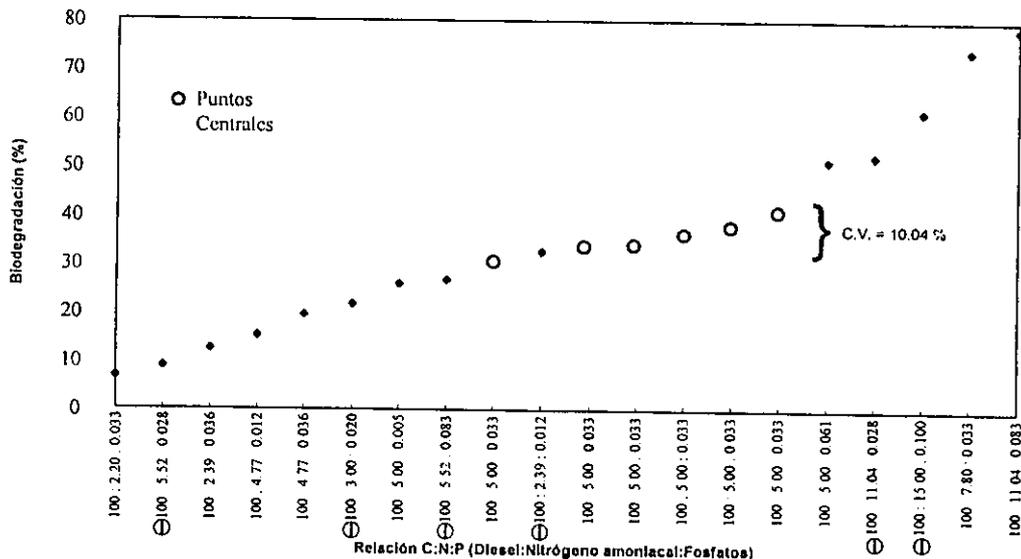
No. Obs.	Diesel	$N-NH_4^+$	PO_4^{3-}	Relación C : N: P*	Biodegradación (%)
18	30,000	660	10	100 : 2.20 : 0.033	6.58
1	18,108	1,000	5	100 : 5.52 : 0.028	8.79
6	41,892	1,000	15	100 : 2.39 : 0.036	12.35
7	41,892	2,000	5	100 : 4.77 : 0.012	15.10
8	41,892	2,000	15	100 : 4.77 : 0.036	19.45
19	50,000	1,500	10	100 : 3.0 : 0.020	21.63
16	30,000	1,500	1.6	100 : 5.0 : 0.005	25.79
2	18,108	1,000	15	100 : 5.52 : 0.083	26.67
11	30,000	1,500	10	100 : 5.0 : 0.033	30.74
5	41,892	1,000	5	100 : 2.39 : 0.012	32.58
14	30,000	1,500	10	100 : 5.0 : 0.033	33.92
9	30,000	1,500	10	100 : 5.0 : 0.033	34.00
12	30,000	1,500	10	100 : 5.0 : 0.033	36.32
13	30,000	1,500	10	100 : 5.0 : 0.033	38.01
10	30,000	1,500	10	100 : 5.0 : 0.033	40.96
15	30,000	1,500	18.4	100 : 5.0 : 0.061	51.10
3	18,108	2,000	5	100 : 11.04 : 0.028	52.14
20	10,000	1,500	10	100 : 15.0 : 0.100	61.24
17	30,000	2,341	10	100 : 7.80 : 0.033	73.77
4	18,108	2,000	15	100 : 11.04 : 0.083	78.23

*Se supuso un 86 % de contenido de carbono en el diesel (Odu, 1972; Freijer, 1996; Jackson, 1992)

La Figura 15 pone en evidencia que a mayor concentración de nitrógeno existió un mayor porcentaje de biodegradación, salvo en seis excepciones y que a altas concentraciones de nitrógeno una alta concentración de fósforo fue relevante.

El análisis aquí descrito sería equivalente al de bloquear el efecto de la concentración de diesel (todos a 100 partes) en la Etapa I de la MSR, por lo que las excepciones a las tendencias generales de aumento de nitrógeno amoniacal se explicaron por el efecto de la concentración del diesel, de los fosfatos o por posibles interacciones de diesel-nitrógeno amoniacal o diesel-fosfatos.

La baja variabilidad del sistema se observó en la reproducibilidad los porcentajes de biodegradación alcanzados por los seis puntos centrales indicados como 100 : 5 : 0.033. Es de observarse que el coeficiente de variación que explica la variabilidad natural de la Etapa I de la MSR fue de 10.04%.



Los ⊕ muestran las seis excepciones de la relación directamente proporcional entre la concentración del nitrógeno amoniacal y el porcentaje de biodegradación.

Figura 15. Relaciones C:N:P ordenadas en forma ascendente para la Etapa I

De acuerdo con la bibliografía, al ocurrir un derrame de hidrocarburos en el suelo se produce un desbalance de nutrientes debido al alto aporte de carbono (Odu, 1972; Leahy y Colwell, 1990). Con base en las propiedades discutidas en la sección A, la relación C:N:P original para el suelo contaminado fue de 100:0.45:0.006, considerando un 86% de carbono en el diesel (Odu, 1972; Jackson, 1992; Freijer, 1996). Esta relación mostró un serio desbalance de acuerdo con la tendencia marcada en la Figura 15 y observó sólo un 3% de biodegradación.

Existen diversas publicaciones en las que se recomienda una relación que varía de 100:0.2:0.067 a 100:10:10, siendo las más comunes entre 100:5:1 y 100:10:1, como se muestran en orden ascendente en la Tabla 22. Los valores varían ampliamente debido a las diferencias en las concentración del contaminante, de los tipos de hidrocarburos y de su grado de intemperización, así como de los nutrientes disponibles (generalmente considerados extraíbles), de las características del suelo, de condiciones de experimentación y del cálculo de la relación C:N:P.

Las relaciones C:N:P citadas en la Tabla 22 fueron obtenidas de estudios basados en teóricas o reportadas en la práctica. Las primeras se basan en la relación C:N:P de las bacterias e incluso algunas consideran una fracción mineralizada. De las prácticas ninguna se basa en diferencias significativas medidas directamente de la biodegradación variando los nutrientes al mismo tiempo que la concentración del hidrocarburo.

Tabla 22. Relaciones C:N:P empleadas en distintos estudios de biodegradación de hidrocarburos en suelo

C:N:P	Observación	Referencia
100:0.004 a 0.4	Nitrógeno requerido para residuos oleosos	Huddleston, 1979
100:0.1:0.1	Medio para aislamiento	Hunt <i>et. al.</i> , 1973
100:0.1:0.1	Medio para aislamiento	Braddock <i>et. al.</i> , 1997
100:0.2:0.067	Suelo con 150,000 mg/kg de crudo	Hunt <i>et. al.</i> , 1973
100:0.2:0.67	Para 150,000 mg/kg de crudo	Braddock, <i>et. al.</i> , 1997
100:0.4:0.04	Referencia de C:N:P inadecuado	Demque <i>et. al.</i> , 1997
100:0.5 a 11.1	Región "óptima" de varios estudios	Morgan <i>et. al.</i> , 1989
100:0.5:0.1	Degradación de diesel oil	Wang <i>et. al.</i> , 1990
100:0.5:0.125	Calculado como la relación "hidrocarburo":N:P	Atlas y Bartha, 1998
100:0.625:0.05	Biorremediación en general	Nooman y Curtis, 1990
100:0.8:0.16	Suponiendo un 100% de carbono en hidrocarburos	Salanitro <i>et. al.</i> , 1998
100:0.84:0.16	Compuestos puros	Atlas y Bartha, 1998
100:0.87	Biodegradación de hidrocarburos con un $t_{1/2}$ de 1 año	Huesemann, 1994
100:1	Mínimo requerido para degradación efectiva	Jobson <i>et. al.</i> , 1974
100:1 a 100:10	Recopilado de la literatura por el autor	Frankenberger, 1992
100:1 a 100:10	Recomendado para varios compuestos	USEPA, 1995
100:1 a 100:2	Suponiendo C:N de bacterias 100:20 y Y_{xs} de 0.05 a 1	Walwoth <i>et. al.</i> , 1997
100:1:0.2	Recomendado para diesel	Huesemann, 1994
100:1:0.2	Ajustado suponiendo un 80% de carbono en hidrocarburos	Salanitro <i>et. al.</i> , 1998
100:1.05:0.2	Combustible de avión	Song y Bartha, 1990
100:1.67:0.125	Crudo en suelo	Chang <i>et. al.</i> , 1996
100:1.67	Biodegradación de diesel	Grundmann y Rehm, 1991
100:1.7:0.1	Requiere más nutrientes	Demque <i>et. al.</i> , 1997
100:1.7:0.125	Nutrientes nativos	Dibble y Bartha, 1979
100:1.79:0.28	Crudo:N:P en agua de mar	Atlas y Bartha, 1972
100:2 a 100:4	Recomendado para varios hidrocarburos	Kostecki, 1989
100:2:0.18		Enning, 1995

... continua Tabla 22. Relaciones C:N:P empleadas en distintos estudios de biodegradación de hidrocarburos en suelo

C:N:P	Observación	Referencia
100:2:0.18	Gasolina	Zhou y Crawford, 1995
100:2.6 a 4	Recomendado para varios hidrocarburos	Huesemann, 1994
100:3	Diesel	Britto <i>et. al.</i> , 1993
100:3.3:0.3	Máximo de nutrientes recomendado	Pope, 1996
100:3.3	Composta	Baker <i>et. al.</i> , 1994
100:3.33	Mayor degradación a 3,000 mg/kg de diesel, gasolina y JP-5.	Walwoth <i>et. al.</i> , 1997
100:4:1.2	Kerosina, aceite pesado y mineral.	Frankenberger, 1992
100:4:2	Durante toda la experimentación	Block <i>et. al.</i> , 1989
100:4:2	Recomendado para varios hidrocarburos	Baker <i>et. al.</i> , 1994
100:4:2	Recomendado para varios hidrocarburos	Cole, 1994
100:4.55 a 5.55	Lodos oleosos	Rasiah <i>et. al.</i> , 1991
100:4.66	Aproximadamente 86,000 mg/kg de crudo.	Odu, 1978
100:4.81	Hidrocarburos en suelo	Raymond <i>et. al.</i> , 1976
100:N:2.25 ¹	Diesel	Walworth y Reynolds, 1995
100:5:0.3	N y P extraíbles	Eve, 1992
100:5:1	Para residuos en general	Gaudy y Gaudy, 1981
100:5:1	Diesel	Jackson, 1990
100:5:1	Tratamiento <i>in situ</i>	Chambers <i>et. al.</i> , 1991
100:5:1	Recomendado para varios hidrocarburos	Müller-Markgraf, 1995
100:5:3.4	5,000 mg/kg de diesel	Walwoth <i>et. al.</i> , 1997
100:5.4	8,000 mg/kg de diesel	Walwoth <i>et. al.</i> , 1997
100:5.4:0.8	Hidrocarburos poliaromáticos (HPA) en lodo	Lewis, 1993
100:8.3 a 10	Crudo	Odu, 1972
100:8.3	Recomendado para varios hidrocarburos	Sims <i>et. al.</i> , 1989
100:8.3:0.83	Recomendado para varios hidrocarburos	Sims <i>et. al.</i> , 1990
100:8.3:0.83	Recomendado para varios hidrocarburos	Rogers <i>et. al.</i> , 1993
100:8.3:0.83	Recomendado para varios hidrocarburos	Pope, 1996
100:8.3:1.7	Tanques subterráneos	USEPA, 1999
100:10:0.78	Diesel a nivel de campo	Demque <i>et. al.</i> , 1997
100:10:1	En biolabranza	Morgan <i>et. al.</i> , 1989
100:10:1	Conversión de hidrocarburo en biomasa	Frankenberger, 1992
100:10:1	Diesel	Troy <i>et. al.</i> , 1992
100:10:1	Recomendado para varios hidrocarburos	USEPA, 1995
100:10:1	Recomendado para varios hidrocarburos	Elekrowicz <i>et. al.</i> , 1996
100:10:1	Referencia para biorremediación	Demque <i>et. al.</i> , 1997
100:10:2	Calculado con un Y _{x/s} de 0.3	Alexander, 1994
100:10:2	5,000 y 4,000 mg/kg diesel	Margesin y Schinner, 1997a y 1997b
100:11.1	Lodos de refinería	Brown <i>et. al.</i> , 1983
100:14.58:2.92	1,0000 mg/kg de aceite de motor y 10,000 mg/kg de diesel	Gruiz y Kriston, 1995
100:15	Modelo de McCarty (ver sección de balance de materia)	McCarty, 1988
100:15	Basado en la concentración inicial y Y _{x/s} de 0.3	Alexander, 1994
100:15:3	Calculado por consumo de nutrientes por gramo de hidrocarburo a material celular	Rosenberg, <i>et. al.</i> , 1992
100:20:1	Basado en requerimientos de bacterias	Huesemann, 1994
100:20:1	Reactor por lotes de 8 litros a 700 rpm	Cassidy <i>et. al.</i> , 1997

¹ N = Sin efecto del nitrógeno de 100:5 a 100:15

t_{1/2} = vida media

Y_{x/s} = rendimiento celular

Contrario a lo que se observa en la Tabla 22, los resultados obtenidos para la primera etapa experimental del presente estudio indicaron que fue necesario emplear mayores aportes de nitrógeno amoniacal y fosfatos y menores de diesel para alcanzar un mayor porcentaje de biodegradación.

2. Etapa II

Los resultados del porcentaje de biodegradación para las distintas relaciones C:N:P calculados en la Etapa II se observan en la Tabla 23. De acuerdo con esta tabla y con los datos graficados en la Figura 16, no existió patrón alguno entre la relación C:N:P y el porcentaje de biodegradación. Esto posiblemente se debió al efecto negativo del nitrógeno amoniacal en concentraciones relativamente más altas. De la misma manera el relativo gran efecto del nitrógeno amoniacal - fosfatos de la Etapa II, que en las concentraciones de la Etapa I no fue significativo, pudo permitir que en esta segunda etapa la relación C:N:P no fuera directamente proporcional al porcentaje de biodegradación.

Tabla 23. Porcentaje de biodegradación para cada relación C:N:P de la Etapa II

No. Obs.	Diesel	$N-NH_4^+$	PO_4^{3-}	Relación C : N: P*	Biodegradación (%)
17	10,000	3,595	35.00	100 : 35.95 : 0.35	69.48
19	19,000	2,300	35.00	100 : 12.11 : 0.18	69.5
7	15,351	3,070	20.14	100 : 20.00 : 0.13	71.73
3	4,649	3,070	20.14	100 : 66.03 : 0.43	77.36
2	4,649	1,530	49.87	100 : 32.91 : 1.07	78.14
5	15,351	1,530	20.14	100 : 9.97 : 0.13	78.97
14	10,000	2,300	35.00	100 : 23.00 : 0.35	79.18
13	10,000	2,300	35.00	100 : 23.00 : 0.35	79.34
10	10,000	2,300	35.00	100 : 23.00 : 0.35	79.8
16	10,000	2,300	10.00	100 : 23.00 : 0.10	80.93
8	15,351	3,070	49.87	100 : 20.00 : 0.32	81.19
9	10,000	2,300	35.00	100 : 23.00 : 0.35	81.99
12	10,000	2,300	35.00	100 : 23.00 : 0.35	82.09
1	4,649	1,530	20.14	100 : 32.91 : 0.43	82.58
6	15,351	1,530	49.87	100 : 9.97 : 0.32	82.75
11	10,000	2,300	35.00	100 : 23.00 : 0.35	83.31
18	10,000	1,004	35.00	100 : 10.05 : 0.35	83.45
15	10,000	2,300	60.00	100 : 23.00 : 0.6	85.17
20	1,000	2,300	35.00	100 : 230.00 : 3.50	87.12
4	4,649	3,070	49.87	100 : 66.03 : 1.07	87.43

*Se supuso un 86 % de contenido de carbono en el diesel (Odu, 1972; Freijer, 1996; y Jackson, 1992)

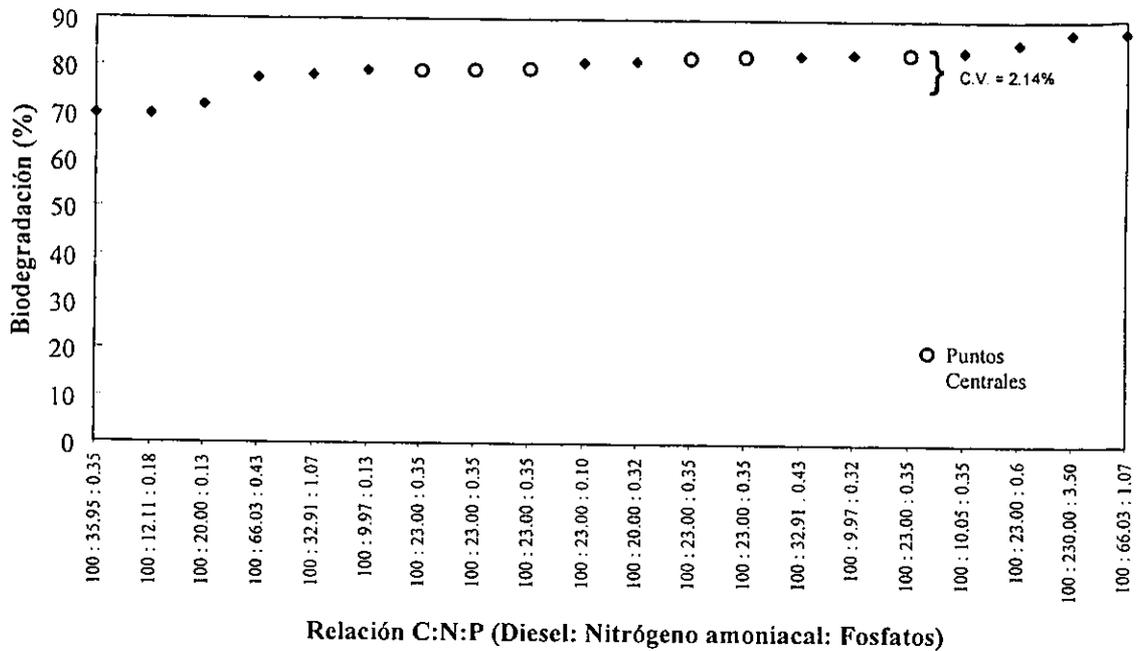


Figura 16. Relaciones C:N:P ordenadas en forma ascendente para la Etapa II

Esta carencia de proporcionalidad entre la relación C:N:P y el porcentaje de biodegradación se puede fácilmente elucidar si se considera los resultados antes discutidos sobre el efecto del diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos. De acuerdo con esta explicación no se pueden comparar concentraciones relativamente altas y bajas de diesel con una sola relación C:N:P. Suponiendo por ejemplo, que la concentración del diesel es cercana a las 50,000 mg/kg y que sus efectos de inhibición observados sobre la biodegradación son evidentes, si se le asigna una relación C:N:P típica de 100:5:1, entonces de debería agregar 2,500 mg/kg de nitrógeno amoniacal y 500 mg/kg de fosfatos. Una concentración tan alta de nitrógeno amoniacal podría ser perjudicial para la biodegradación por exceder el "umbral" máximo con consecuentes efectos negativos como los observados en la Etapa II (Müller-Markgraf, 1995). Mientras que los fosfatos podrían aportar - junto con el amonio - una concentración demasiado elevada de sales con un posible exceso de la presión osmótica y una drástica reducción del agua biodisponible (Walworth, *et. al.*, 1997; y Mills y Frankenberger, 1994). En general, de acuerdo con los resultados obtenidos la relación C:N:P es aplicable en una región de concentración del contaminante, valores elevados pueden tener efectos adversos y valores muy bajos pueden no alcanzar niveles que permitan que los nutrientes estén biodisponible en el suelo. En un estudio reciente Mohn y Steward (2000) reportaron en varios tipos

de suelo que aportes en concentraciones absolutas de NH_4Cl y fosfatos que estimularon la mineralización de hidrocarburos produjeron relaciones C:N:P muy variantes de 100:0.325:0.075 a 100:147.7:34.1, como las arriba observadas. También reconocen en su estudio que si aplicaran los nutrientes necesarios a alguno de sus suelos evaluados con una concentración de 50,000 mg/kg de hidrocarburos, la concentración elevada de N y P probablemente causarían efectos tóxicos.

Otro factor que se debe tener en cuenta son los nutrientes que aporta el suelo de manera natural. En este caso se realizó a través de un prudente acercamiento a distintas nominaciones de suelos como se explicó en la caracterización del suelo, sección A. Esto permitió tener un reflejo más real del reto que involucra el obtener información útil de la biodegradación del contaminante a través de un modelo a nivel microcosmos.

Es necesario considerar los fundamentos de la aplicación de la relación C:N:P y su aplicación en la biodegradación de contaminantes en suelo (Müller-Markgraf, 1995). La relación C:N:P se incorporó al área de la biotecnología - posiblemente de origen agrícola - debido al balance de nutrientes requeridos para satisfacer la actividad y el crecimiento microbiano. Este balance existe como consecuencia de la composición de elementos observada en la biomasa para determinados grupos microbianos; de su funcionalidad como sustrato (fuente de energía, soporte y aceptor de electrones); y de la eficiencia de uso de nutrientes por parte de los microorganismos.

La relación C:N:P no debe ser vista como un aporte inicial de nutrientes para un proceso de biodegradación sino como un ajuste en el balance requerido para cubrir una demanda de nutrientes durante todo el tiempo que dure la biodegradación. Esto es muy claro si se considera que la biodegradación realmente se realiza en un proceso en lotes. Para este proceso el contenido de carbono del suelo disminuirá al mineralizarse los contaminantes, entonces la mínima cantidad requerida de N y P variará con los cambios de carbono (Müller-Markgraf, 1995). Es decir que la relación C:N:P se define por un criterio de cinética para concentraciones absolutas de N y P, y no sólo simplemente como un argumento de balance de materia. En el actual estudio, el aporte inicial para el periodo de 30 días fue menor al considerado y ejemplificó pequeños reactores en lote donde se evaluó el efecto de la concentración del diesel a varios niveles. Por esto se recomiendan pequeños aportes de nutrientes en vez de uno sólo inicial para periodos prolongados (Huesemann, 1994; Müller-Markgraf, 1995; Walworth y Reynolds, 1995; y Walworth *et. al.*, 1997) o lo que sería equivalente a considerar la concentración absoluta de los nutrientes en función de los hidrocarburos. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la experimentación realizada, en la que a pesar del

corto periodo se observó que una mayor concentración como aporte inicial no fue benéfica y que se desfavoreció la biodegradación, aunque no se alcanzaron concentraciones inhibitorias de la biodegradación por debajo de la Control I (3%).

Otra desventaja de aplicar un fuerte aporte inicial de nutrientes es el posible desperdicio de nutrientes que puede tener otro destino ajeno al fin de la biodegradación del contaminante debido a que se puede integrar a otras etapas de los ciclos biogeoquímicos del suelo en vez de introducirse como nutriente en el proceso de biodegradación (Mills y Frankenberger, 1994). Müller-Markgraf, 1995, también indicó que pueden requerirse mayores aportes de amonio debido a las pérdidas iniciales por fijación en el suelo y que el fosfato puede precipitar y tener otra función como la de amortiguación del pH del suelo, por lo que debería considerarse un gradiente calculado inicial de exceso de las concentraciones de las sales. Para este estudio el ajuste del pH estable a 72 horas se realizó con hidróxido para poder observar el efecto del fosfato como nutriente y no confundir los aportes por amortiguación del pH con aporte de nutrientes.

3. Resumen de las limitaciones de la relación C:N:P

Las consideraciones discutidas de posibles efectos negativos por altas concentraciones de los nutrientes; de las observaciones de la biodegradación como cinética y de las posibles "perdidas" de las sales aplicadas como nutrientes, pone en evidencia las limitaciones del empleo de la relación C:N:P, si no se consideran las respectivas concentraciones absolutas. Esta puede ser una de las causas de los fracasos de algunos estudios en la adición de nutrientes o bioestimulación (Müller-Markgraf, 1995; Walworth y Reynolds, 1995; Walworth *et. al.*, 1997).

D. Pruebas de respirometría

El muestreo de los gases para cuantificar la concentración de oxígeno y bióxido de carbono en el espacio gaseoso de los microcosmos tuvo como primer propósito garantizar un sistema aerobio. Todos los microcosmos fueron ventilados permitiendo el intercambio de gases cada vez que el oxígeno disminuía hasta 1.4% (v/v). Este porcentaje estuvo al menos seis veces por arriba de una concentración limitante para la biodegradación de hidrocarburos en suelo (Zhou y Crawford, 1995; Freijer, 1996). Debido a que el mismo método de cuantificación de gases permitió dar seguimiento a la presencia de metano se corroboró la ausencia de este gas en los microcosmos, por lo que se garantizaron sistemas aerobios.

Las pruebas respirométricas se han empleado como un parámetro indirecto en la búsqueda de mejores condiciones para la biodegradación de hidrocarburos (Bartha y Pramer, 1965; Dibble y Bartha, 1979; Mills y Frankenberger, 1994; Rhykerd *et. al.*, 1995; Freijer, 1996; Freijer y Leffelaar, 1996), por lo que se trató de relacionar el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono con la biodegradación. Todos los datos obtenidos tanto para el consumo de O_2 como para producción de CO_2 mostraron una cinética típica de primer orden, con una fase exponencial claramente definible tanto en los experimentos de la Etapa I como en la Etapa II (ver figura 17). El análisis intentó relacionar el efecto producido por las concentraciones de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos sobre el consumo de O_2 y la producción de CO_2 , medidas tanto como producción o consumo total o representada como tasas (ver tabla 24).

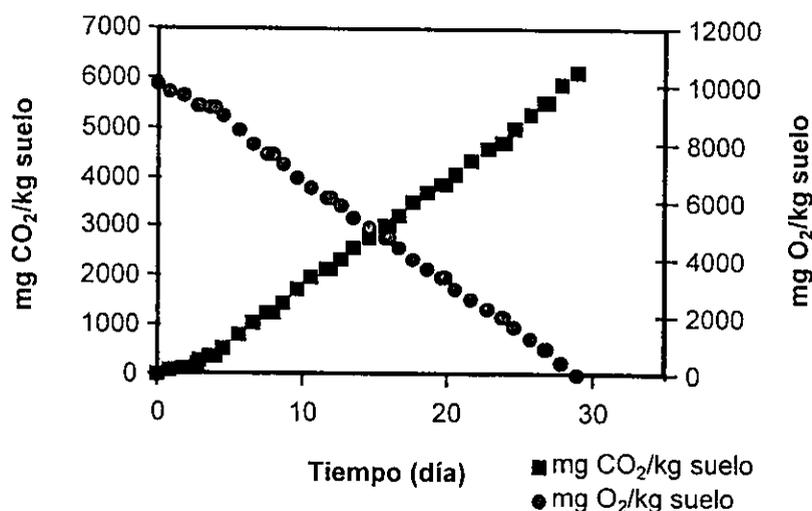


Figura 17. Cinética típica de la producción de CO_2 consumo de O_2 Corrida 10, Etapa II

La relación entre la biodegradación y las pruebas respirométricas se intentó determinar con base en modelos estadísticos y determinísticos. Los modelos estadísticos se realizaron a través del análisis de regresión múltiple aprovechando los diseños experimentales establecidos para las etapas I y II, pero evaluando como respuesta a los datos de la respirometría. Con la finalidad de complementar los resultados establecidos por los análisis de regresión se realizaron pruebas de correlación producto o momento r de Pearson para observar el grado de dependencia lineal entre las pruebas respirométricas y la biodegradación (Montgomery y Peck, 1982). Las unidades empleadas para las respuestas de la respirometría se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 24. Respuestas y unidades empleadas en las pruebas respirométricas

Respuesta	Unidades	Medido durante
Producción de CO ₂	mg de CO ₂ producidos por kg de suelo	30 días de experimentación
Tasa de producción CO ₂	mg de CO ₂ producidos por kg de suelo al día	fase exponencial
Consumo de O ₂	mg de O ₂ consumidos por kg de suelo	30 días de experimentación
Tasa de consumo de O ₂	mg de O ₂ consumidos por kg de suelo al día	fase exponencial

Por otro lado los modelos determinísticos se basaron en balances de materia establecidos para reacciones de biodegradación de hidrocarburos (ver más adelante, Sección E). De acuerdo con estos modelos se determinaron las principales constantes para la biodegradación, consumo de oxígeno y producción de bióxido de carbono. Estos valores se compararon con los reportados en la bibliografía, para discutir su aplicación en el presente estudio.

Los datos de producción de CO₂ y consumo de O₂ del suelo control fueron siempre los menores en todas las observaciones de la etapa I y II. Los datos obtenidos para el suelo control presentaron valores de 1,895.28 mg de CO₂/kg para los 30 días, debido al alto contenido de materia orgánica, con una tasa en la fase exponencial de 64.39 mg/kg-d. Otros valores observados para suelos control en la literatura presentan valores ligeramente más altos o menores dependiendo del tipo de suelo de 92.63 mg/kg-d (Bartha y Pramer, 1965); de 1.5 mg/kg-d (Kanaly *et. al.*, 1997) y de 3 a 6 mg/kg-d (Frankenberger, 1992). El consumo de O₂ para el suelo control fue de 2,958.25 mg/kg en 30 días o 28.03 mg O₂/kg-d para todos los diseños experimentales, Walworth *et. al.* (1997) reportó valores aproximados entre 25 y 35 mg O₂/kg-d.

La diferencia de adaptación de los microorganismos en un suelo contaminado por periodos relativamente largos y la de un suelo sin contaminar o control, no justifica la simple resta aritmética de la producción de CO₂. Esto debido a que no se puede garantizar que la producción de CO₂ proveniente de la materia orgánica del suelo contaminado sea igual a la del suelo sin hidrocarburos, porque dicha producción corresponde a la actividad de poblaciones distintas en tipo, número y distribución (Odu, 1972; y Smith, *et. al.*, 1998). A este respecto Alef (1995) indicó que existen cambios poblacionales en pruebas respirométricas después de 4 a 6 horas de experimentación.

Odu (1972) determinó que la población microbiana de un suelo contaminado con hidrocarburos tenía una mayor cuenta por más de un orden de magnitud al control, lo cual indicó una población más adaptada (como la del presente estudio) debido a la presión de selección impuesta por la presencia del contaminante. Odu (1972) también experimentó con diferentes concentraciones de hidrocarburo y determinó que la producción de CO₂ no presentaba una cantidad comparable -, y por lo tanto no "restable" - debido a que no correspondieron a una misma diversidad microbiana. Así también se reportó que la producción de CO₂ varió en función de la distribución y número de grupos poblacionales presentes en el suelo (Smith *et. al.*, 1998). Es por lo anterior que en el análisis que a continuación se presenta no se restó ni la producción de CO₂, ni el consumo de O₂ del suelo control, pero si se comparó con el control como referencia. Esta práctica es usual en otros reportes (Odu, 1972; Brown *et. al.*, 1983; Mills y Frankenberger, 1994; Freijer, 1996; Smith *et. al.*, 1998; Graham *et. al.*, 1999). Si en lugar de diluir el suelo contaminado se hubiese introducido el diesel a un suelo control para fijar los niveles de contaminación, las consideraciones de resta hubiesen sido factibles.

1. Análisis de las pruebas de respirometría de la Etapa I

1.1. Modelo de regresión

Con base en los resultados de la respirometría se plantearon modelos con los que se intentó relacionar las concentraciones de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos con la producción de CO₂ y consumo de O₂. Estos modelos fueron ecuaciones de regresión de polinomios de bajo orden que permitieron establecer una relación entre las variables. Aplicando el principio estadístico de emplear "el modelo más sencillo" se plantearon nuevos modelos de acuerdo con los resultados de los anteriores hasta alcanzar una relación consistente.

Se realizó un análisis de regresión a los modelos a través del método de mínimos cuadrados y se verificó a través de un ANOVA tanto el "ajuste del modelo" como el efecto de cada uno de los

regresores (variables independientes) sobre la respuesta. En la siguiente Tabla 25 se muestran las variables de respuesta (dependiente) y regresores (independiente) ensayados.

Tabla 25. Variables seleccionadas para en análisis estadístico de las pruebas respirométricas

Variable de respuesta	Regresores		
Y	X ₁	X ₂	X ₃
Producción de CO ₂	Concentración de diesel	Concentración de nitrógeno amoniacal	Concentración de fosfatos
Tasa de producción de CO ₂			
Consumo de O ₂			
Tasa de consumo O ₂			

Los datos de la respirometría para cada corrida de la Etapa I se muestran en la Tabla 26. Los valores de x₁, x₂ y x₃ son los mismos datos codificados para las concentraciones de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos, respectivamente, que fueron empleados en la Etapa I (ver sección III. Experimentación).

Tabla 26. Resultados de la respirometría de la Etapa I

Corrida	Regresor			Respuesta			
	x ₁	x ₂	x ₃	Producción de CO ₂ mg CO ₂ /kg suelo	Tasa de CO ₂ mg CO ₂ /kg suelo /d	Consumo de O ₂ mg O ₂ /kg suelo	Tasa de O ₂ mg O ₂ /kg suelo /d
1	-1	-1	-1	6,206.57	214.33	6,537.03	289.85
2	1	-1	-1	8,323.06	352.95	9,536.21	440.92
3	-1	1	-1	7,802.32	284.03	9,156.50	407.99
4	1	1	-1	7,770.63	339.14	9,613.09	448.26
5	-1	-1	1	7,949.38	287.89	9,623.80	426.13
6	1	-1	1	8,234.40	353.86	9,523.54	440.21
7	-1	1	1	7,777.24	284.26	9,194.90	410.23
8	1	1	1	7,784.48	339.82	9,431.43	438.11
9	0	0	0	8,324.19	302.90	10,666.90	481.55
15	0	0	1.682	8,129.12	329.42	10,038.02	458.81
16	0	0	-1.682	8,909.50	340.31	10,728.02	485.15
17	0	1.682	0	7,750.29	317.18	9,836.38	450.56
18	0	-1.682	0	9,334.95	353.45	10,533.87	475.06
19	1.682	0	0	7,755.34	341.07	9,235.40	437.16
20	-1.682	0	0	4,344.90	132.27	3,072.12	134.54
Control	-	-	-	1,895.28	64.39	2,958.25	28.03

Como un primer ajuste para cada variable de respuesta se empleó un modelo lineal de polinomio de primer orden:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \epsilon$$

En la Tabla 27 se resumen los datos de los análisis de variancia (los originales se muestran en el anexo 2).

Tabla 27. ANOVA para el modelo lineal del polinomio de primer orden

Variable de respuesta	B_0	B_1	B_2	B_3	Significancia del modelo (P<0.05)	R ²
Producción de CO ₂	7,759.76	594.03**	NS	NS	*	0.27
Tasa de producción de CO ₂	304.86	48.80	NS	NS	*	0.63
Consumo de O ₂	9,115.15	1,022.00**	NS	NS	*	0.28
Tasa de consumo O ₂	414.97	54.35	NS	NS	*	0.36

NS = No significativo;

* = Al menos un regresor contribuyó significativamente al 95% de confianza

** = Significativas al 10 %

De acuerdo con los análisis de variancia cada una de las cuatro variables de respuesta tuvieron al menos una variable que contribuyó significativamente al modelo (ANOVA “de ajuste” del modelo por regresión). Posteriormente se aplicó un ANOVA para cada uno de los regresores y se observó que la concentración de diesel fue el único regresor que presentó un efecto significativo para las cuatro variables de respuesta. Sin embargo, las cuatro variables de respuesta respirométrica mostraron un coeficiente de determinación muy bajo. Estos resultados sugirieron que el modelo no era adecuado por lo que se ajustó un modelo que involucrara más términos:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \epsilon$$

Este ajuste se pudo realizar debido a las propiedades del diseño central compuesto - aún sin réplicas - ya que los 15 datos permitían tener suficientes grados de libertad para ajustar el polinomio. El ANOVA mostró que todas las variables de respuesta respirométricas presentaban algún regresor significativo (ver anexo 2). Por lo que se realizó un ANOVA para cada regresor observándose que sólo la concentración de diesel tuvo algún efecto. Los modelos ajustados fueron:

$$\hat{y}_{producciónCO_2} = 8,311.87 + 594.03x_1 - 786.71x_1^2$$

$$\hat{y}_{tasa,producción.CO_2} = 301.98 + 48.80x_1 - 22.14x_1^2$$

$$\hat{y}_{consumoO_2} = 10,614.15 + 1022.00x_1 - 1522.04x_1^2$$

$$\hat{y}_{tasa.consumo.CO_2} = 479.57 + 54.35x_1 - 66.43x_1^2$$

Debido a que no tiene un sentido físico emplear modelos más complejos o introducir términos de mayor orden, no se desarrollaron modelos más avanzados. Es decir, si el diesel, el nitrógeno amoniacal y los fosfatos no presentaron efectos, no es muy factible creer que los efectos de mayor orden (efectos cúbicos e interacciones mayores de dos) pudieran tener un aporte real al sistema y menos aún una explicación razonable de su aporte. Esto se menciona ya que en todo modelo ocurre que al aumentar el número de términos se permite un mejor ajuste a los datos y al alcanzar un número de términos igual a los números de datos más uno se logrará un ajuste "perfecto", debido a un ardid numérico, como en el más conocido caso de ajustar una recta con dos datos.

Del mismo modo, es factible pensar que los nutrientes tengan efectos por interacciones y efectos directos en el consumo de oxígeno y producción de CO₂ en suelos. Respaldo con la teoría de aporte de nutrientes en suelos desarrollado en los temas microbiológicos, edafológicos y biotecnológicos (efectos sinérgicos por el aporte de nutrientes relacionados por los ciclos biogeoquímicos), es posible explicar los efectos de los modelos propuestos, pero no de interacciones de orden mayor. Por lo que desarrollar una hipótesis de efectos de mayor orden de dos pudo no estar bien sustentada.

Como tercera opción se desarrolló un modelo más sencillo en el que sólo se considerara como regresor al diesel, debido al efecto del nitrógeno amoniacal y el fosfato no fueron significativos en los modelos anteriores. El modelo planteado fue:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_1^2 + \epsilon$$

Los coeficientes estimados se muestran en la Tabla 28. De acuerdo con esta tabla se determinó el efecto significativo de la concentración del diesel en la respirometría. Esta dependencia de la concentración de hidrocarburos en suelo en las pruebas respirométricas fue reportada en varias referencias (Odu, 1972; Sharabi y Bartha, 1993) por lo cual usualmente se recomienda establecerla a una misma concentración para poder comparar otros efectos como el de los nutrientes. Sin embargo, el desarrollo secuencial de los modelos aquí planteados y el diseño de experimentos de la Etapa I permitió discernir estadísticamente la carencia de efectos de los nutrientes. Los modelos ajustados se reportan en el Anexo 2.

Tabla 28. ANOVA para el modelo que sólo considera al regresor del diesel

Variable de respuesta	B_0	B_1	B_2	Significancia ($P < 0.05$)	R^2
Producción de CO_2	8,539.16	594.04	-856.06	*	0.70
Tasa de producción de CO_2	333.85	48.80	-31.85	*	0.85
Consumo de O_2	10,457.83	1,022.01	-1,474.74	*	0.75
Tasa de consumo O_2	473.89	54.35	-64.71	*	0.78

NS = No significativo

De acuerdo con los modelos el valor óptimo de producción de CO_2 se observó a 36,619 mg/kg de diesel, mientras que el consumo de O_2 fue a un valor cercano de 34,557 mg/kg. Esta región no concuerda con un incremento de la biodegradación, debido a que el porcentaje de biodegradación fue baja a estas altas concentraciones de diesel (ver sección B).

Estas diferencias en respuesta entre la biodegradación y las pruebas respirométricas pudieron deberse al efecto que tuvo el nitrógeno amoniacal y los fosfatos en el porcentaje de biodegradación (no así en la producción de CO_2) y a la presencia de otras fuentes de carbono como la proveniente de la materia orgánica y fuentes abióticas como los carbonatos (Aelion *et. al.*, 1997).

1.2. Correlación de la producción de CO_2 y consumo de O_2 con la biodegradación

Se determinó el grado de dependencia lineal entre las pruebas respirométricas y la biodegradación. La biodegradación en este caso no sólo se consideró como porcentaje, sino que se evaluó como *disminución de la concentración de diesel* (concentración inicial menos concentración final al día 30). Esta nueva variable se empleó por el efecto directo que el consumo de sustrato de la fuente principal de carbono (diesel) tiene sobre la producción de CO_2 y el consumo de O_2 . También se evaluó la *concentración inicial de diesel* (variable x_1 de la Etapa I) debido a su efecto significativo reportado en el análisis de regresión anterior.

La respirometría se evaluó - al igual que en el análisis de regresión - como *producción de CO_2 , tasa de producción de CO_2 , consumo de O_2 y tasa de consumo O_2* . Los resultados de las variables correlacionadas, coeficientes de correlación (Pearson), estadísticos de prueba (t-student) y la hipótesis aceptada se muestran en la Tabla 29.

De acuerdo con los resultados de la Tabla 29 sólo la *concentración inicial de diesel* se relacionó con las cuatro variables respirométricas. Los coeficientes de correlación de la *concentración inicial de*

diesel con la *producción de CO₂*, *tasa de producción de CO₂*, *consumo de O₂*, y *tasa consumo de O₂*, fueron de 0.505; 0.791; 0.521; y 0.595, respectivamente. Todos estos valores fueron positivos, indicando que la *concentración inicial de diesel* fue directamente proporcional a estas variables respirométricas, es decir que una mayor concentración de diesel produjo una mayor producción de CO₂ y consumo de O₂. Este análisis concuerda con el análisis de regresión arriba descrito. Sin embargo, se debe recalcar que esta relación entre la respirometría y la *concentración inicial de diesel* no fue un buen indicador de un mayor porcentaje de biodegradación o de una mayor actividad microbiana, pues no dependió en realidad de cuánto se degradó, sino de cuanto sustrato existió en un inicio.

Por otro lado, se observó una muy fuerte correlación entre el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono, tal como se muestra en la Tabla 30.

Tabla 30. Prueba de hipótesis para entre el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono

Variables relacionadas	Pearson	 t₀ 	Conclusión
Tasas CO ₂ y O ₂	0.93	9.34	Distinto a 0 al 5%
Producción CO ₂ y consumo O ₂	0.97	13.7	Distinto a 0 al 5%

Esta correlación indicó que sí existió una fuerte dependencia entre la producción de CO₂ y el consumo de O₂, tanto como en la tasa de la fase exponencial o como totales a los 30 días. Valores cercanos a 0.97 de correlación los reporta de Aelion *et. al.* (1997). Estos resultados, junto con el análisis del coeficiente de respiración y el balance de materia, se discutirán más adelante (sección E).

Tabla 29. Prueba de hipótesis para evaluar la significancia del coeficiente de correlación de la Etapa I

Variables correlacionadas	Pearson	$ t_0 $	Conclusión	Variables correlacionadas	Pearson	$ t_0 $	Conclusión
Producción de CO ₂				Consumo de O ₂			
Producción de CO ₂ con % biodegradación de diesel	-0.295	1.12	No es distinto de 0	Consumo de O ₂ con % biodegradación de diesel	-0.208	0.77	No es distinto de 0
Producción de CO ₂ con disminución de la concentración de diesel	0.132	0.48	No es distinto de 0	Consumo de O ₂ con disminución de la concentración de diesel	0.263	0.98	No es distinto de 0
Producción de CO ₂ con concentración inicial de diesel (x ₁)	0.505	2.11	Distinto a 0 al 10%	Consumo de O ₂ con concentración inicial de diesel (x ₁)	0.521	2.20	Distinto a 0 al 5%
Tasa de producción de CO ₂ con % biodegradación de diesel	-0.354	1.37	No es distinto de 0	Tasa de consumo de O ₂ con % biodegradación de diesel	-0.231	0.85	No es distinto de 0
Tasa de producción de CO ₂ con disminución de la concentración de diesel	0.221	0.82	No es distinto de 0	Tasa de consumo de O ₂ con disminución de la concentración de diesel	0.279	1.05	No es distinto de 0
Tasa de producción de CO ₂ con concentración inicial de diesel (x ₁)	0.791	4.67	Distinto a 0 al 5%	Tasa de consumo de O ₂ con concentración inicial de diesel (x ₁)	0.595	2.67	Distinto a 0 al 5%

T_{crítica} = 2.16 al 5% y 1.77 al 10% de significancia

2. Análisis de las pruebas de respirometría de la Etapa II

2.1. Modelo de regresión

En la segunda etapa experimental se muestrearon los de gases de todo el diseño experimental - incluyendo sus réplicas - por lo que se pudieron evaluar las mismas respuestas respirométricas de la Etapa I en un análisis de regresión que además incluyó la realización de pruebas de "falta de ajuste". Esto último debido a que se pudo obtener el "error puro" de la distribución de las réplicas de los seis puntos centrales, semejante al análisis de la MSR aplicado en la sección B y discutido en el Marco Teórico. Los datos obtenidos en la Etapa II se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 31. Resultados de la respirometría de la Etapa II

Corrida	Regresor			Respuesta			
	x_1	x_2	x_3	Producción de CO ₂ mg CO ₂ /kg suelo	Tasa de CO ₂ mg CO ₂ /kg suelo /d	Consumo de O ₂ mg O ₂ /kg suelo	Tasa de O ₂ mg O ₂ /kg suelo /d
1	-1	-1	-1	2,667.82	104.20	5,527.75	184.59
2	-1	-1	1	4,507.69	174.12	9,437.20	328.67
3	-1	1	-1	3,366.13	128.70	7,895.57	254.51
4	-1	1	1	3,495.76	136.76	7,571.91	261.04
5	1	-1	-1	6,978.42	266.83	14,171.76	497.27
6	1	-1	1	5,571.04	213.60	11,985.60	420.92
7	1	1	-1	6,122.30	239.62	12,827.74	459.42
8	1	1	1	5,679.62	215.66	11,449.69	403.30
9	0	0	0	5,119.11	194.04	9,550.35	328.46
10	0	0	0	5,177.61	201.58	10,086.60	357.52
11	0	0	0	4,508.99	173.15	8,639.57	295.48
12	0	0	0	4,797.34	185.65	8,997.07	306.26
13	0	0	0	5,018.82	193.70	9,669.51	340.21
14	0	0	0	5,599.68	213.74	10,852.67	372.54
15	0	0	1.682	5,185.97	199.01	10,759.04	354.58
16	0	0	-1.682	5,888.02	227.95	12,623.14	437.19
17	0	1.682	0	4,943.60	188.91	10,205.76	344.79
18	0	-1.682	0	6,351.87	243.20	12,580.58	414.00
19	1.682	0	0	6,641.43	256.79	13,485.36	468.35
20	-1.682	0	0	1,924.34	75.95	4,004.89	111.46
Control	-	-	-	1,895.28	64.39	2,958.25	28.03

Los resultados de la producción de CO₂ de la primera etapa mostraron valores de 132 a 353 mg CO₂/kg suelo-d y 4,344 a 9,334 mg CO₂/kg suelo (Tabla 26), mayores a los de la etapa dos de 76 a 266 mg CO₂/kg suelo-d y 1,924 a 6,978 mg CO₂/kg suelo (Tabla 31). Estos datos concuerdan con los reportados por Dibble y Bartha (1979) de 150 a 380 mg CO₂/kg suelo-d y 4,600 a 11,500 mg CO₂/kg suelo para 30 días y Hunt *et. al.* (1973) de 60 a 450 mg CO₂/kg suelo-d y 1900 a 1300 mg CO₂/kg suelo.

Inicialmente se empleó un polinomio de primer orden con base en un diseño experimental que no incluyó a los puntos axiales. El primer modelo fue:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \epsilon$$

Para cada variable de respuesta se ajustó un modelo a través del método de mínimos cuadrados, se realizó una prueba de "ajuste" de la regresión para verificar si algún coeficiente de regresión aportaba significativamente al modelo; se verificaron los regresores que aportaba al modelo; y se realizó una prueba de "falta de ajuste" para verificar si el modelo era adecuado.

En la Tabla 32 se observan los coeficientes de regresión significativos al 95% estimados para el modelo de primer orden; la prueba de ajuste de la regresión (verificó si al menos una variable contribuyó al modelo); y la prueba de falta de ajuste al modelo (verificó si el modelo era lineal o se requerían más términos). Los detalles de los análisis de variancia se muestran en el Anexo 2.

Tabla 32. ANOVA para el modelo polinomio de primer orden

Variable de respuesta	B_0	B_1	B_2	B_3	Ajuste de la regresión	Falta de ajuste del modelo
Producción de CO ₂	4,900.74	1,289.25	NS	NS	*	**
Tasa de producción de CO ₂	188.67	48.99	NS	NS	*	**
Consumo de O ₂	9,904.50	2,500.30	NS	NS	*	**
Tasa de consumo O ₂	343.59	94.01	NS	NS	*	**

NS = No significativo al 95%

* = Rechazo Ho. Con 95% de confianza al menos una variable contribuye al modelo

** = Acepto Ho: El modelo es lineal.

En todos los casos se comprobó que el efecto del nitrógeno amoniacal y del los fosfatos en la región ensayada no tuvieron efectos significativos en las variables de respuesta de la respirometría y que en

todos los casos el modelo lineal fue adecuado por el efecto de la concentración inicial del diesel en la respirometría. Se debe observar que los modelos indican que a mayor concentración de diesel existe una mayor producción de CO₂, lo cual no tiene relación directa con el porcentaje de biodegradación. Estos resultados no concordaron con los obtenidos en la MSR, debido a que a mayor concentración inicial de diesel el porcentaje de biodegradación fue menor. Las pruebas de ANOVA de ajuste de la regresión y de la falta de ajuste del modelo de primer orden determinaron que no se justificaba el empleo de modelos más elaborados para la región experimental de la Etapa II.

2.2. Correlación de la producción de CO₂ y consumo de O₂ con la biodegradación

Al igual que en el análisis de las pruebas respirométricas de la Etapa I, se desarrolló una prueba estadística con el coeficiente de correlación producto o momento r de Pearson para observar el grado de dependencia lineal entre las pruebas respirométricas y la biodegradación. Las variables empleadas fueron las mismas que se seleccionaron en la sección 1.2, obteniéndose la Tabla 33.

Tabla 33. Prueba de hipótesis para evaluar la significancia del coeficiente de correlación

Variables correlacionadas	Pearson	$ t_0 $	Conclusión	Variables correlacionadas	Pearson	$ t_0 $	Conclusión
Producción de CO ₂				Consumo de O ₂			
Producción de CO ₂ con % biodegradación de diesel	-0.445	2.11	Distinto a 0 al 5%	Consumo de O ₂ con % biodegradación de diesel	-0.474	2.29	Distinto a 0 al 5%
Producción de CO ₂ con disminución de la concentración de diesel	0.873	7.60	Distinto a 0 al 5%	Consumo de O ₂ con disminución de la concentración de diesel	0.855	6.99	Distinto a 0 al 5%
Producción de CO ₂ con concentración inicial de diesel (x ₁)	0.872	7.56	Distinto a 0 al 5%	Consumo de O ₂ con concentración inicial de diesel (x ₁)	0.860	7.15	Distinto a 0 al 5%
Tasa de producción de CO ₂ con % biodegradación de diesel	-0.451	2.15	Distinto a 0 al 5%	Tasa de consumo de O ₂ con % biodegradación de diesel	-0.488	2.37	Distinto a 0 al 10%
Tasa de producción de CO ₂ con disminución de la concentración de diesel	0.871	7.53	Distinto a 0 al 5%	Tasa de consumo de O ₂ con disminución de la concentración de diesel	0.869	7.46	Distinto a 0 al 5%
Tasa de producción de CO ₂ con concentración inicial de diesel (x ₁)	0.873	7.58	Distinto a 0 al 5%	Tasa de consumo de O ₂ con concentración inicial de diesel (x ₁)	0.875	7.67	Distinto a 0 al 5%

T_{crítica} = 2.10 al 5% y 1.73 al 10% de significancia

En este análisis todas las variables mostraron una diferencia significativa con respecto al cero, pero sólo la *concentración inicial de diesel* y la *disminución de la concentración de diesel* tuvieron una relación lineal arriba del 60% (explica arriba del 60% de las variaciones, $|\text{Pearson}| \geq 0.78$) con respecto al consumo de O_2 y producción de CO_2 . En las figuras 18 y 19 se muestra la tendencia obtenida de mayor producción de CO_2 al aumentar la *concentración inicial de diesel* y a la *disminución de la concentración de diesel*. Sin embargo, no se observó un aumento en la producción de CO_2 por un mayor *porcentaje de biodegradación*, Figura 20.

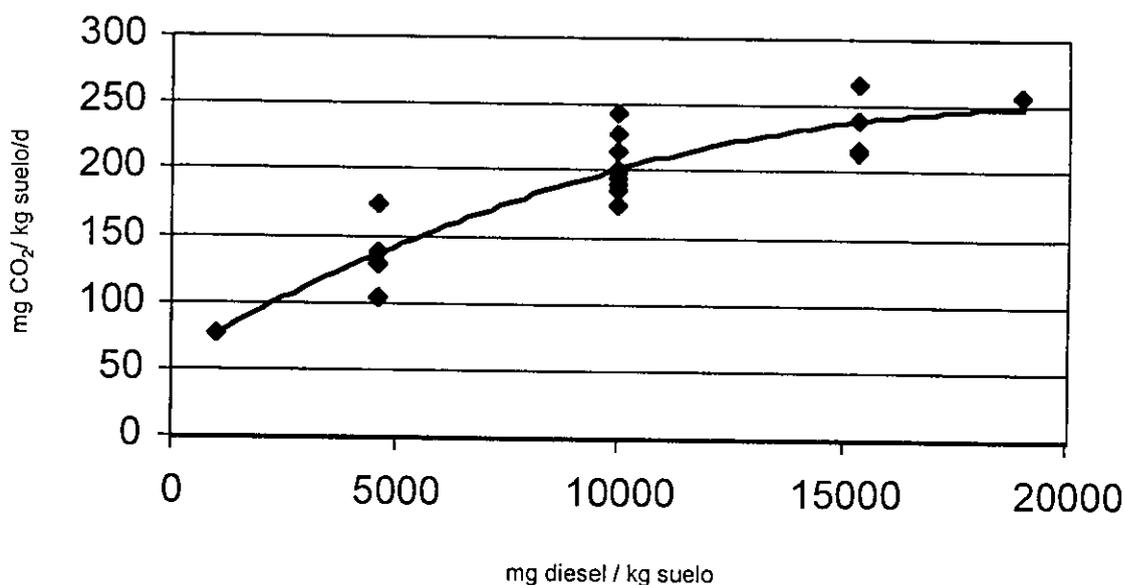


Figura 18. Tasa de producción de CO_2 en función de la concentración inicial de diesel

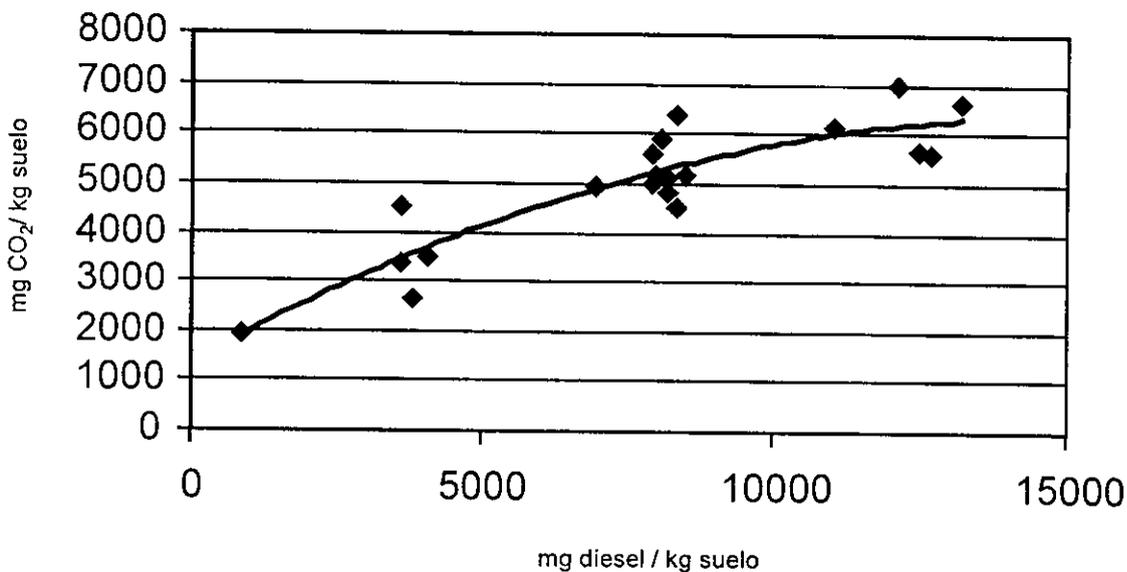


Figura 19. Producción de CO_2 en función de la disminución de la concentración de diesel

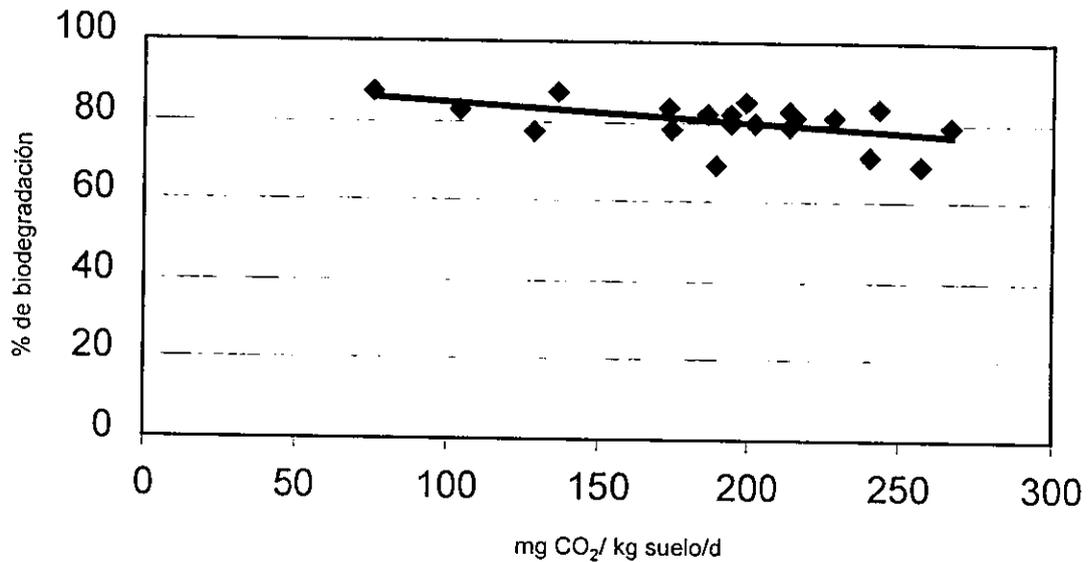


Figura 20. Porcentaje de biodegradación en función de la tasa de producción de CO₂

El aumento en la producción de CO₂, observado en la Figura 18, mostró una dispersión amplia de sus resultados, aunque de acuerdo con el análisis de regresión arriba planteada, sí existió una relación lineal con la concentración inicial de diesel. Lo mismo ocurrió en la Figura 19 en la que se observó “agrupación en escalas” debido a los niveles ensayados en el diseño central compuesto. Estos valores mostraron una gran dispersión con excepción de los valores extremos que son los que dan un mayor peso en la tendencia de la regresión (Montgomery y Peck, 1982).

En esta segunda etapa, al igual que en la Etapa I, la correlación entre la producción de CO₂ y consumo de O₂ presentó una fuerte relación lineal, Tabla 34

Tabla 34. Prueba de hipótesis para el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono

Variables relacionadas	Pearson	t ₀	Conclusión
Tasas CO ₂ y O ₂	0.980	21.10	Distinto a 0 al 5%
Producción CO ₂ y consumo O ₂	0.981	21.52	Distinto a 0 al 5%

3. Limitaciones de las pruebas respirométricas

Si se hubiese elegido a la producción de CO₂ como variable de respuesta en la optimización de la biodegradación, no se hubiera logrado un resultado adecuado debido a que su respuesta depende más de la concentración inicial de diesel que de los aportes de los otros macronutrientes (nitrógeno

amoniaco y fosfatos). Sharabi y Bartha (1993) evaluaron los supuestos de biodegradabilidad medido como la producción de CO₂. Ellos reconocieron que el empleo de esta técnica se desarrolló para comprender - en los años sesenta (Primer y Bartha, 1965) - la susceptibilidad de biodegradabilidad de algunos compuestos tóxicos como lo demandaba cierta normatividad norteamericana. El concepto de biodegradable se le atribuyó a aquella sustancia que produjera el 50% de CO₂ del carbono contenido en ésta. Sin embargo, debido a su sencillez, rapidez y bajo costo se empleó como una técnica de investigación con objetivos más amplios, sin evaluar adecuadamente los supuestos involucrados, más aún en el área de suelos que son sistemas complejos por naturaleza.

Sharabi y Bartha (1993) determinaron que más del 50% del CO₂ producido - incluso sustrayendo el producido por el control - puede representar a la biodegradación de la biomasa y de la materia orgánica y en ningún caso la proveniente de la biodegradación de la sustancia evaluada en suelo. Esto puede explicar la diferencia evaluada entre el consumo del diesel y las pruebas respirométricas. Otra indicación de Sharabi y Bartha - discutida párrafos arriba - es la fuerte dependencia entre la producción de CO₂ y el contenido inicial de la sustancia evaluada, en este caso diesel. Esta fuerte dependencia - reportada en otros estudios (Brown *et. al.*, 1983; Balba *et. al.*, 1998) - no permitió evaluar los efectos de los nutrientes a diferentes concentraciones del diesel, como se logró con éxito en la MSR. Incluso se reportó que la adición de hidrocarburos fomenta la biodegradación de la materia orgánica que no se puede contabilizar en los experimentos control (Korda *et. al.*, 1997).

Es posible que las poblaciones autóctonas microbianas no degradadoras de diesel tengan otros requerimientos nutricionales de fuentes de nitrógeno y fósforo con respecto a las poblaciones degradadoras de diesel, como lo reporta Smith *et. al.* (1998). Por lo que el efecto de los aportes del nitrógeno amoniacal y fosfatos no produjeron una respuesta equivalente al de la biodegradación en el consumo de oxígeno y la producción de CO₂. Incluso es factible que otras fuente de carbono capaces de producir CO₂ no permitieran observar en las pruebas respirométricas el efecto real de la biodegradación (Frankenberger, 1992; Aelion *et. al.*, 1997).

Por último, la biodegradabilidad reconoce a los compuestos cuya concentración se reduce por actividad biológica, mientras que la producción de CO₂ mide al carbono mineralizado. Sin embargo, la otra alternativa de medición del consumo de oxígeno - reportada como más sensible a la biodegradación (Odu, 1978) - brindó la misma respuesta. Otros destinos cuantificados del carbono proveniente de los hidrocarburos en suelo fueron reportados por Bouchez *et. al.*, (1996) y Kanaly, *et.*

al. (1997). Según este estudio del remanente no degradado, el 20% se incorporó a metabolitos (biomasa) y el 25% se incorporó al humus del suelo - se presentaron posibles mecanismos. Bouchez *et. al.*, (1996) observó que del 56 al 77% se mineraliza, del 16 al 35% se introduce en la biomasa y del 5 al 23% se acumula en metabolitos durante la biodegradación de hidrocarburos poliaromáticos en líquido. Otro reporte en campo (Glazovskaya y Pikovskiy, 1985) observó que el 27% de los hidrocarburos se mineralizó y 40% del residuo se introdujo en metabolitos y en humus.

E. Balance de materia

En los procesos de biorremediación se han realizado varios intentos teóricos y prácticos para comprender la biodegradación de los hidrocarburos. Entre los estudios que se han llevado a cabo con la finalidad de optimizar la biodegradación a través de un balance adecuado de nutrientes, se incluyen a los balances de materia (Davis, 1967; McCarty, 1988; Rosenberg *et. al.*, 1992; Cole, 1994; Gruiz y Kriston, 1995; Müller-Markgraf, 1995; Freijer, 1996; Freijer *et. al.*, 1996; Freijer y Leffelaar, 1996; Geerdink *et. al.*, 1996). Estos balances se basan en la estequiometría de algunas reacciones teóricas establecidas como las reacciones químicas de oxidación o reacciones que involucran la producción de biomasa tanto en condiciones aerobias como anaerobias. Otros balances de materia se basan en determinaciones teóricas de los coeficientes de rendimiento celulares tanto de productos como de consumo de sustratos.

En la Tabla 35 se muestran algunas reacciones aerobias "globales" de la degradación de hidrocarburos y se consideraron los siguientes supuestos:

- En todos los casos se trató de un sólo sustrato, no se consideraron mezclas, pero se permitió suponer a un compuesto representativo de una mezcla (Jackson, 1992);
- Todos los hidrocarburos fueron igualmente susceptibles a la biodegradación. No se consideró la distinta capacidad de los microorganismos de biodegradar a todos los hidrocarburos presentes en una mezcla - como en el diesel. Comúnmente se reporta el orden decreciente de biodegradación: alifáticos lineales, aromáticos y alifáticos cíclicos y ramificados (Jonson *et. al.*, 1974; Walker *et. al.*, 1976; Gordon *et. al.*, 1980; Leahy y Colwell, 1990; Fogth *et. al.*, 1990; Olson *et. al.*, 1999) y conforme aumenta su peso molecular (Fedorak y Westlake, 1981; Wodzinki y Johnson, 1981; Cerniglia, 1992; De Jonge *et. al.*, 1997);
- No se consideró un umbral del efecto tóxico y/o inhibitorio de los hidrocarburos o de sus metabolitos intermediarios sobre la población degradadora. Sin embargo, este umbral lo reportan varias publicaciones (Raymond, 1992; Ying *et. al.*, 1992; Jackson, 1990; Chang *et. al.*, 1996; McAllister *et. al.*, 1995; Song y Bartha, 1990; Atlas y Bartha, 1998);
- El oxígeno fue el único aceptor de electrones;
- No se consideró que los metabolitos intermediarios de la degradación de los hidrocarburos pueden tener como destino su incorporación al humus del suelo en lugar de mineralizarse (Kanaly *et. al.*, 1997).

Tabla 35. Reacciones, balances y parámetros de degradación calculados a partir de la literatura

Reacciones / Balances	Parámetros calculados*	Referencia
$-\text{CH}_2 + 1.5\text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ <p>Oxidación teórica de un grupo metilo</p>	<p>3.43 g O₂/g diesel; 3.14 g CO₂/g diesel; 0.92 g CO₂/g O₂; y CR = 0.67 mol CO₂ / mol O₂</p>	<p>Davis, 1967</p>
$\frac{1}{e} \text{C}_n \text{H}_m + \frac{Y_e}{4} \text{O}_2 + \frac{Y_{x/s}}{20} \text{NH}_3 \rightarrow \left(\frac{n}{e} - \frac{Y_{x/s}}{4} \right) \text{CO}_2 + \frac{Y_{x/s}}{20} \text{C}_5 \text{H}_7 \text{O}_2 \text{N} + \left(\frac{Y_e}{2} + \frac{2Y_{x/s}}{5} - \frac{2n}{e} \right) \text{H}_2\text{O}$ <p>e = 4n + m; Ye = Rendimiento energético; Yx/s = Rendimiento celular Yx/s = 0,5 (0,12 a 0,6 aerobia para hidrocarburos); Ye = 1 - Yx/s; Biomasa = C₅H₇O₂N</p>	<p>1.71 g O₂/g diesel; 0.79 g CO₂/g diesel; 0.46 g CO₂/g O₂; CR = 0.33 mol CO₂ / mol O₂ 200 g diesel requiere 343 mg O₂ y 36 mg NH₃ y produce 242 mg biomasa y 157 mg CO₂</p>	<p>McCarty, 1988</p>
<p>150 mg de N y 30 mg de P se consumen en la conversión de 1 g de hidrocarburos</p>	<p>C:N:P = 100:15:3</p>	<p>Rosenberg et. al., 1992</p>
<p>(C_nH_m)_x + (N,P,S) + O₂ → Intermediarios + CO₂ + H₂O + NO₃⁻ + SO₄²⁻ + Energía + Células</p> <p>Hasta el 60% del hidrocarburos es utilizado por bacterias para material celular</p>	<p>Yx/s=0,6</p>	<p>Cole, 1994</p>
<p>2nCH₂ + 2nO₂ + 0.19nNH₄⁺ → n(CH_{1.7}O_{0.5}N_{0.19}) + nCO₂ + 1.5nH₂O + (nx48,000 KJ)</p> <p>Para fase de mantenimiento: no disminuye tasa O₂</p>	<p>2.29 g O₂/g diesel; 1.57 g CO₂/g diesel; 0.72 g CO₂/g O₂; CR = 0.5; [C:N] 100:10.2; Yx/s = 0.87; y 1,714 KJ / g diesel</p>	<p>Müller-Markgraf, 1995</p>

... continua Tabla 35. Reacciones, balances y parámetros de degradación calculados a partir de la literatura

Reacciones / Balances	Parámetros calculados*	Referencia
$C_7H_{12} + 5O_2 + NH_3 \rightarrow C_5H_7N + 2CO_2 + 4H_2O$ <p>Mezcla 10 000 mg/kg de aceite de motor y 10000 mg/kg de diesel con fórmula C_7H_{12} y biomasa C_5H_7N y $P = 1/5N$</p>	<p>1.67 g O_2/g hidrocarburos y 0.92g CO_2/g hidrocarburos; 0.55 g CO_2/ g O_2; CR = 0.4; y [C:N:P] 100:14.58:2.92</p>	<p>Gruiz y Kriston, 1995</p>
$aC_nH_m + a\left(n + \frac{1}{4m}\right)O_2 \rightarrow anCO_2 + \frac{am}{2}H_2O$ <p>Mineralización</p>	<p>3.43 g O_2/g diesel; 3.14 g CO_2/g diesel; 0.92 g CO_2/ g O_2; y CR = 0.67</p>	<p>Freijer, 1996</p>
$(1-a)C_nH_m + (1-a)\left(\frac{1}{2k} + \frac{1}{4p}\right)O_2 \rightarrow (1-a)C_nH_{(m-p)}O_k + \left(\frac{1-a}{2}\right)pH_2O$ <p>Conversión a células y metabolitos</p>	<p>0.74 g O_2/g diesel, si la composición celular es $CH_{1.7}O_{0.5}N_{0.19}$</p>	<p>Freijer, 1996</p>
$Y_{sIN} NH_3 + CH_2 + Y_{sIO} O_2 \rightarrow Y_{sIX} CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2} + Y_{sIC} CO_2 + Y_{sIW} H_2O$ <p>Y_{sIN} = mol NH_3/molC; Y_{sIO} = mol O_2/ molC; Y_{sIX} = molC en biomsa/molC; Y_{sIC} = mol CO_2/molC; Y_{sIW} = mol H_2O/molC; y mol C = mol del sustrato.</p> <p>Reactor Continuo Agitado; Biomasa 24.6 g equivale a 1 mol C ($CH_{1.8}O_{0.5}N_{0.2}$)</p>	<p>Y_{sIS} de 0.1 mol de C en biomasa / mol de C en diesel (0.057 g célula/g biomasa). 0.114 g célula/g C_{16}; 0.23g célula/g C_{15}</p>	<p>Geerdink et al., 1996</p>

*Algunos parámetros fueron calculados para la elaboración de la tabla tomando como referencia al diesel con la fórmula $C_{15}H_{30}$ (Jackson, 1992)

Las reacciones citadas fueron tomadas directamente de la literatura

C_nH_m = Hidrocarburos.

CR = Coeficiente de Respiración.

- Los hidrocarburos fueron la principal fuente de carbono. Este supuesto es real en suelos con muy bajo contenido de materia orgánica (como los arenosos) o con materia orgánica muy estable como en el caso de la presencia de arcillas minerales y carbonatos de calcio que forman asociaciones con la materia orgánica muy difíciles de degradar (Freijer, 1996). Incluso durante la biorremediación en suelos fríos la materia orgánica aporta a la producción de CO₂, esperándose un crecimiento diáuxico (White y Luyong, 1997);
- La tasa neta de crecimiento microbiano fue positiva; y
- Se consideraron despreciables otras reacciones que involucran al O₂ y CO₂. Por ejemplo, la presencia de suelos calcáreos que produce CO₂ (Aelion *et. al.*, 1997) la nitrificación por aportes de fertilizantes amonificados resulta en un aumento de iones H⁺ que pueden reaccionar con el CO₂ y disminuir su producción al formar CO₃²⁻; la adición de cal (CaCO₃) para el control del pH produce CO₂; y el consumo de O₂ y producción de CO₂ a partir de la biomasa y materia orgánica del suelo de la población degradadora y no degradadora (Frankenberger, 1992; Sharabi y Bartha, 1993);

Las reacciones de McCarty (1988) y Freijer (1996), junto con algunos parámetros estimados, se discuten a continuación. Estos se eligieron para emplear los resultados obtenidos en el presente estudio en los balances de materia.

1. Modelo de Freijer

Este modelo incluyó en su fuente original al estudio más elaborado de la literatura citada sobre las condiciones de las pruebas respirométricas para el balance de materia de la biodegradación de hidrocarburos en suelos. De acuerdo con Freijer (1996) el coeficiente de mineralización (**a**) se calculó en moles de carbono producidos de CO₂ por moles de carbono de los hidrocarburos consumidos, como lo indica la siguiente ecuación:

$$a = \frac{\text{moles.de.C} - \text{CO}_2}{\text{moles.de.C} - \text{HC}} \dots\dots\dots(1)$$

Este coeficiente varía de cero a uno. Un valor cercano a cero demostraría muy poca formación de CO₂ por consumo de hidrocarburos, lo que indicaría una mineralización relativamente baja (Freijer, 1996). En cambio, un valor cercano a uno indicaría una mayor actividad mineralizadora y si es igual a uno una completa mineralización.

Freijer (1996) definió también al coeficiente de respiración r (también conocido como CR o RQ por sus siglas en inglés) como las moles de CO_2 producidos por mol de oxígeno consumido. A partir de las dos reacciones arriba planteadas en la Tabla 35, Freijer (1996) obtuvo:

$$r = \frac{an}{a(n + \frac{1}{4}m) + (1-a)(\frac{1}{2}k + \frac{1}{4}p)} \dots\dots\dots(2)$$

Para aplicar este modelo a los resultados obtenidos en el presente estudio, las constantes n , m , k y p se calcularon de las ecuaciones descritas arriba, mientras que el coeficiente de mineralización (a) se estimó a partir de los datos de consumo de hidrocarburos y producción de CO_2 .

Los datos calculados del coeficiente de mineralización (a) y el coeficiente de respiración (r) para las etapas I y II se muestran en las tablas 36 y 37, respectivamente. En esta primera sección los coeficientes de respiración fueron calculados con base en el modelo de Freijer (1996) pero estos también pueden calcularse directamente con base en los datos de producción de CO_2 y consumo de oxígeno como se discutirá en la sección 3 (*Otros parámetros*).

Tabla 36. Coeficientes de mineralización y respiración calculados para la Etapa I de acuerdo con Freijer (1996)

No. Obs	Coeficiente de mineralización (a)	Coeficiente de respiración (r)	No. Obs	Coeficiente de mineralización (a)	Coeficiente de respiración (r)
1	1.24	0.70	9	0.26	0.40
2	0.52	0.55	15	0.17	0.31
3	0.26	0.40	16	0.37	0.47
4	0.17	0.32	17	0.11	0.23
5	0.19	0.34	18	1.50	0.72
6	0.51	0.54	19	0.23	0.37
7	0.39	0.49	20	0.23	0.37
8	0.30	0.43			

Tabla 37. Coeficientes de mineralización y respiración calculados para la Etapa I de acuerdo con Freijer (1996)

No. Obs	Coeficiente de mineralización (a)	Coeficiente de respiración (r)	No. Obs	Coeficiente de mineralización (a)	Coeficiente de respiración (r)
1	4.91	0.82	11	5.31	0.82
2	4.86	0.82	12	5.42	0.82
3	4.34	0.81	13	5.28	0.82
4	4.70	0.82	14	5.25	0.82
5	5.01	0.82	15	4.90	0.82
6	4.73	0.82	16	4.74	0.82
7	4.85	0.82	17	4.93	0.82
8	5.04	0.82	18	5.13	0.82
9	5.45	0.82	19	5.01	0.82
10	5.22	0.82	20	4.89	0.82

1.1 Modelo de Freijer: coeficiente de mineralización (a)

Algunas referencias del coeficiente de mineralización tomadas de la bibliografía se muestran como referencia en la Tabla 38.

Tabla 38. Coeficiente de mineralización reportados

Coeficiente de mineralización (a)	Observación	Referencia
0.23	Biodegradación de hexadecano en lodos	Buitron y Capdeville, 1993
0.45	Hidrocarburos C ₁₀ - C ₂₀ en suelo	Freijer <i>et. al.</i> , 1996
0.66 a 0.91	Biodegradación terrestre de lodos aceitosos	Dibble y Bartha, 1979
0.71	Hidrocarburos C ₂₀ - C ₃₀ en suelo	Freijer, 1996
0.80	Hidrocarburos C ₂₀ - C ₃₀ en suelo	Freijer <i>et. al.</i> , 1996
0.86	Hidrocarburos C ₁₀ - C ₂₀ en suelo	Freijer, 1996
1.00	Teórica para 100% de mineralización	Freijer <i>et. al.</i> , 1996
1.21	Diesel y aceite lubricante en suelo arenoso. Posiblemente mineraliza otra fuente de carbono	Freijer <i>et. al.</i> , 1996
3	Petróleo en un suelo migajón arenoso. La producción de CO ₂ se relacionó muy poco con el consumo de HC	Freijer <i>et. al.</i> , 1996

De acuerdo con los datos de la Etapa I se calcularon - con excepción de las corridas 1 y 21 - valores agrupados de 0.11 a 0.52 para el coeficiente de mineralización, que corresponden a una baja

mineralización. Esta baja mineralización comúnmente se atribuye al consumo de carbono para la producción de biomasa; la biodegradación parcial de hidrocarburos a intermediarios; y al consumo de los hidrocarburos más ligeros que C_{15} los cuales se cuantifican como un sólo compuesto $C_{15}H_{30}$, por el supuesto empleado. Sin embargo, las corridas 1 y 21 presentaron valores de 1.24 y 1.50 indicando que se mineralizó otra fuente de carbono ajena al diesel. Estas corridas fueron las de menor biodegradación (por un menor aporte de nitrógeno, ver sección B). Esta escasa biodegradación, disminuyó el denominador de la ecuación (1) de Freijer por lo que se incrementó el coeficiente de mineralización por arriba de su máximo teórico de 1, revelando el representativo aporte de la producción de CO_2 a partir de otra fuente de carbono.

En la Etapa II los valores se agruparon en un solo intervalo de 4.34 a 5.45. Estos valores demostraron claramente que la producción de CO_2 se relacionó muy poco con el consumo de diesel por exceder la máxima mineralización teórica de 100% que equivale a un coeficiente (a) igual a 1.

La evidente presencia de otra fuente de carbono en la producción de CO_2 reforzó las observaciones de la sección D sobre la carente relación directa entre la producción de CO_2 y la biodegradación. Según Freijer *et. al.* (1996) la producción de CO_2 parece ser un buen indicador de la tasa de mineralización sólo en suelos minerales y cuando los hidrocarburos son la principal fuente de carbono. Otro elemento de variación – además de la producción de CO_2 a partir de otras fuentes bióticas y abióticas - podría incluir las insuficiencias en los supuestos del modelo como la representación del diesel por $C_{15}H_{30}$, que pudo alterar directamente el cálculo de las moles de carbono en el diesel consumido. Para el suelo experimental los supuestos son difíciles de sustentar por la materia orgánica propia del suelo y por la rica mezcla de hidrocarburos presentes en el diesel. Valores excedidos de (a) se reportan en suelos de la misma textura tipo migajón arenoso (ver Tabla 38). Este análisis recalca las limitaciones de las pruebas respirométricas como indicadores directos de la biodegradación diesel y otros derivados del petróleo o el crudo mismo en suelos contaminados.

1.2 Modelo de Freijer: coeficiente de respiración (r)

De acuerdo con las referencias para hidrocarburos con relación C/H de 0.5 (grupo $-CH_2-$), el coeficiente de respiración teórico es de 0.67, mientras que para la mayoría de los constituyentes de la materia orgánica en suelo el coeficiente de respiración oscila de 0.80 a 1 (Freijer *et. al.*, 1996). Bajo los supuestos del modelo observados en la Tabla 35, y considerando que todo el diesel degradado se mineralizó, teóricamente los valores no debieron exceder de 0.67.

Los valores de (**r**) para la Etapa I fueron de 0.23 a 0.55 con dos valores elevados de 0.70 y 0.72, mientras que para la Etapa II de 0.81 a 0.82 (ver tablas 36 y 37). Estos valores de (**r**) fueron calculados en función de sus respectivos coeficientes de mineralización (**a**) de acuerdo con la ecuación (2) de Freijer. Los valores estimados de (**r**) de 0.70 y 0.72 fueron mayores que 0.67 (máximo teórico) debido a que se calcularon en función de sus respectivos coeficientes de mineralización (**a**) (corridas 1 y 21). En la Etapa II todos los valores excedieron el máximo teórico de 0.67, también debido a los altos coeficientes de mineralización (**a**) calculados.

Los valores altos de coeficientes de respiración indicaron que posiblemente existió otra fuente de producción de CO_2 o que este coeficiente – al igual que el coeficiente de mineralización - no sustentó los supuestos del modelo.

2. Modelo de McCarty

El Modelo de McCarty, 1988 (ver Tabla 35) se basa en las reacciones parciales de oxidación de compuestos orgánicos, de aceptor de electrones y síntesis celular. Este modelo se empleó para determinar las condiciones de biodegradación en otros estudios (Cookson, 1995; Gruiz y Kriston, 1995). A diferencia del Modelo de Freijer, McCarty considera el consumo de nutrientes para la producción de biomasa. Basado en este modelo se calcularon los valores de consumo de oxígeno, requerimiento de amonio y fosfatos, así como la producción de CO_2 y biomasa para las etapas I y II (tablas 39 y 40). Cada estimación se basó en el consumo real de diesel observado en la experimentación.

Tabla 39. Cálculo de requerimiento de oxígeno y nutrientes y producción de CO₂ y biomasa para la Etapa I de acuerdo con el Modelo de McCarty*

Corrida	O ₂		NH ₄ ⁺		PO ₄ ³⁻		CO ₂		Biomasa
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	
1	68.24	239.50	7.25	344.83	3.05	4.10	31.27	496.13	48.19
2	206.99	116.24	21.99	113.68	9.25	4.05	94.87	209.48	146.18
3	404.62	56.57	42.99	116.30	18.08	0.69	185.45	105.18	285.76
4	607.13	37.86	64.51	77.51	27.13	1.38	278.27	69.87	428.78
5	584.86	40.76	62.14	40.23	26.14	0.48	268.06	77.62	413.06
6	221.77	107.36	23.56	106.10	9.91	3.78	101.65	202.53	156.63
7	271.08	88.66	28.80	173.60	12.11	1.03	124.24	156.36	191.45
8	349.13	67.54	37.09	134.79	15.60	2.40	160.02	121.62	246.57
9	437.10	61.01	46.44	80.75	19.53	1.28	200.34	103.88	308.70
15	656.96	38.20	69.80	53.72	29.36	1.57	301.11	67.49	463.98
16	331.62	80.88	35.23	106.43	14.82	0.27	151.99	146.55	234.20
17	948.52	25.93	100.78	58.07	42.39	0.59	434.74	44.57	669.89
18	84.63	311.18	8.99	183.25	3.78	6.61	38.79	601.67	59.77
19	463.40	49.82	49.24	76.16	20.71	1.21	212.39	91.29	327.28
20	262.47	29.26	27.89	134.47	11.73	2.13	120.30	90.29	185.37

* Los porcentajes son de los valores reales con respecto a los estimados de O₂, NH₄⁺, PO₄³⁻ y CO₂, medidos como % = (real/estimado)x100.

Tabla 40. Cálculo de requerimiento de oxígeno y nutrientes y producción de CO₂ y biomasa para la Etapa II de acuerdo con el Modelo de McCarty*

Corrida	O ₂		NH ₄ ⁺		PO ₄ ³⁻		CO ₂		Biomasa
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	
1	164.53	83.99	17.48	218.80	7.35	6.85	75.41	88.44	116.20
2	155.69	151.54	16.54	231.23	6.96	17.92	71.36	157.93	109.95
3	154.13	128.06	16.38	468.65	6.89	7.31	70.64	119.12	108.86
4	174.20	108.67	18.51	414.67	7.79	16.01	79.84	109.46	123.03
5	519.54	68.19	55.20	69.29	23.22	2.17	238.12	73.26	366.93
6	544.41	55.04	57.84	66.13	24.33	5.12	249.52	55.82	384.49
7	471.91	67.96	50.14	153.07	21.09	2.39	216.29	70.76	333.29
8	534.15	53.59	56.75	135.23	23.87	5.22	244.82	58.00	377.24
9**	351.39	67.95	37.33	154.01	15.70	5.57	161.05	79.46	248.17
10**	342.00	73.73	36.34	158.24	15.28	5.72	156.75	82.58	241.54
11**	357.04	60.49	37.94	151.57	15.96	5.48	163.64	68.88	252.16
12**	351.81	63.93	37.38	153.82	15.72	5.57	161.25	74.38	248.47
13**	340.03	71.09	36.13	159.16	15.20	5.76	155.85	80.51	240.15
14**	339.34	79.95	36.06	159.48	15.17	5.77	155.53	90.01	239.66
15	365.01	73.69	38.78	148.26	16.31	9.20	167.30	77.50	257.79
16	346.84	90.99	36.85	156.03	15.50	1.61	158.97	92.60	244.96
17	297.77	85.68	31.64	284.08	13.31	6.58	136.48	90.56	210.30
18	357.64	87.94	38.00	66.11	15.98	5.47	163.92	96.87	252.59
19	565.93	59.57	60.13	95.63	25.29	3.46	259.38	64.01	399.69
20	37.34	268.16	3.97	1449.43	1.67	52.44	17.11	281.13	26.37

* Los porcentajes son de los valores reales con respecto a los estimados de O₂, NH₄⁺, PO₄³⁻ y CO₂, medidos como % = (real/estimado)x100.

** Puntos centrales

De acuerdo con el modelo de McCarty (1988) para 25 g de suelo con 10,000 mg/kg de diesel (representativo de los puntos centrales de la Etapa II, ver Tabla 40) se necesita un consumo de 342.86 mg de oxígeno y 36.43 mg de nitrógeno amoniacal para que la reacción se realice adecuadamente con un 80% de biodegradación. En este proceso, se produciría 242.14 mg de biomasa (células bacterianas representadas por la fórmula empírica de $C_5H_7O_2N$) y 157.14 mg de CO_2 . En la ecuación balanceada no se incluyen otros nutrientes, pero McCarty (1988) indicó que el requerimiento de fósforo es un sexto del nitrógeno. Por lo que se necesitaría 15.32 mg de fosfato (5.0 mg de fósforo). En cambio los datos (puntos centrales de la Etapa II) mostraron un consumo medio de 250.06 mg de oxígeno y producción de 125.06 mg de CO_2 , es decir 74 y 83% menos que el teórico respectivamente, por lo que no se hubiese alcanzado el 80 % de biodegradación. De acuerdo con este balance se brindó un 50 % de nitrógeno amoniacal extra al requerido, pero los fosfatos aportados fueron sólo el 6% del requerido para que se lleve a cabo la reacción. Estas diferencias pueden ser una respuesta de la idealización del balance.

Aplicando el mismo análisis del párrafo anterior a las 15 observaciones de la Etapa I se determinó que seis de ellas requirieron un mayor aporte de nitrógeno (abajo del 100% en Tabla 39), mientras que todas necesitaron un mayor aporte de fosfatos (abajo del 7%). Aunque el consumo real de nutrientes no se midió y a pesar de existir un aporte natural del suelo (de hasta 0.65 y 0.07 mg por microcosmos para el nitrógeno amoniacal y fosfatos, respectivamente), esta adición no permitiría la reacción para la biodegradación alcanzada. La opción de pérdidas de diesel o una degradación ajena a la biológica se descartó debido a que la pérdida máxima podría ser del 1%. Este porcentaje representado por las pérdidas del suelo contaminado sometido 5 veces a esterilización (Control II).

Para la Etapa I se encontró que se consumió menos oxígeno que el requerido en 11 observaciones y que se produjo más CO_2 que el esperado en nueve observaciones. Esto permitió elucidar que el Modelo de McCarty no se puede aplicar directamente en suelos muy posiblemente debido a la presencia de otras fuentes de carbono que se cuantifican en la producción de CO_2 y a las idealizaciones del modelo, como es el empleo de un compuesto lineal para representar a todos los hidrocarburos presentes en el diesel.

Del mismo modo las 20 observaciones de la Etapa II presentaron las mismas incongruencias al modelo (ver Tabla 40), observándose que en 16 de ellas no consumió suficiente oxígeno para la

reacción; 10 observaciones no tuvieron suficiente nitrógeno amoniacal; y todas estuvieron muy por debajo del fosfato requerido.

A pesar de las fallas del modelo la desviación del consumo de oxígeno fue $\pm 77\%$ y $\pm 54\%$ para el consumo de CO_2 (medidos como la desviación estándar del porcentaje de error¹). Con base en este modelo se determinó que las pruebas respirométricas son indicativas de la biodegradación al menos dentro de un orden de magnitud, pero que no es recomendable emplearlas directamente como parámetros de biodegradación, ni como respuesta en sistemas sensibles de evaluación (como en el presente estudio) debido a su incertidumbre asociada. Los nutrientes, en cambio, presentaron requerimientos mayores a los aportados por más de un orden de magnitud, en especial en el caso de los fosfatos. Algunas mejoras al modelo se hubieran podido realizar si se hubiera cuantificado la biomasa producida.

Los dos modelos empleados se basaron en supuestos difíciles de sustentar. La idealización de un compuesto por el diesel y que todos los hidrocarburos de la mezcla presentaron la misma susceptibilidad de biodegradación es difícil de sustentar. Bouchez *et. al.* (1995) en un estudio detallado demostró que las mezclas de hidrocarburos poliaromáticos, pueden inhibir o tener un efecto sinérgico positivo en su degradación. Los demás supuestos no sustentables se discutieron a través del texto.

3. Otros parámetros

Con base en los resultados de la degradación y las pruebas respirométricas en esta tercera sección se presentan algunos parámetros estimados como el coeficiente de respiración y los gramos de O_2 consumido por gramo de hidrocarburo degradado.

3.1 Coeficiente de Respiración (CR)

En la Tabla 41 se muestran los coeficientes de respiración de la etapa I y II. Estos valores fueron calculados *directamente* como las moles de CO_2 producidas dividida por las moles de oxígeno consumidas, durante los 30 días de experimentación. Este parámetro cuantificado directamente se denominó CR (coeficiente de respiración) para diferenciarlo del estimado por el Método de Freijer, (r).

¹ % de error = (real - estimado) / real * 100

Tabla 41. Coeficientes de respiración (CR) para las etapas I y II

Etapa I		Etapa II	
Corrida	CR	Corrida	CR
1	0.69	1	0.35
2	0.60	2	0.35
3	0.62	3	0.31
4	0.62	4	0.34
5	0.63	5	0.36
6	0.63	6	0.34
7	0.59	7	0.35
8	0.60	8	0.36
9	0.57	9	0.39
15	0.59	10	0.37
16	0.60	11	0.38
17	0.57	12	0.39
18	0.64	13	0.38
19	0.61	14	0.38
20	1.03	15	0.35
		16	0.34
		17	0.35
		18	0.37
		19	0.36
		20	0.35

En la Tabla 42 se muestran valores de CR reportados en varios estudios de suelos contaminados con hidrocarburos que fueron calculados de la misma forma que se mencionó en el párrafo anterior para hacerlos comparativos. Los valores citados cubren un relativo amplio intervalo de 0.32 a 1.5. Algunos reportes sobrepasaron el valor teórico de 0.67, posiblemente debido a la presencia de otras fuentes como la materia orgánica. Graham, *et. al.* (1999) reportaron valores esperados de 0.51 a 0.73 para condiciones aeróbias. Mientras que otros fueron menores posiblemente por no mineralizar toda la fuente de carbono debido a la producción de la biomasa o por cambios en la producción de CO₂ como consecuencia de la disminución de la fracción más biodegradable. Aelion *et. al.* (1997) reportaron en un estudio con ¹⁴C en campo para la biorremediación de un suelo arcilloso contaminado con hidrocarburos del petróleo que del 59 a 87% del CO₂ producido se debió a una biodegradación aerobia y que las fuentes principales de dilución del bióxido de carbono fueron las formaciones geológicas carbonatadas, reacciones de H₂CO₃ con CaCO₃ mineral del suelo y la presencia de materia orgánica (materia lignínica entre otras). Mientras que Balba *et. al.* (1998) mostraron que la tasa de producción de CO₂ no fue indicativa de un aumento en la biodegradación total de los hidrocarburos presentes y observó una disminución en la tasa de producción de CO₂ debido al agotamiento de la fracción orgánica más fácilmente degradable. Kanaly *et. al.* (1997) en

pruebas con ^{14}C observaron que parte de los hidrocarburos del petróleo se mineralizaron, otra se introdujo en la biomasa de las células, se formaron intermediarios y se incorporó como materia orgánica del suelo (humus). En este último caso los compuestos parcialmente degradados forman uniones covalentes irreversibles con los compuestos que son parte del humus del suelo.

De acuerdo con la Tabla 41, para la Etapa I se obtuvieron valores de 0.57 a 0.69 con un dato "disparado" de 1.03. Estos datos fueron más elevados a los calculados con el modelo de Freijer (ver Tabla 36), pero son más similares a los datos reportados en la bibliografía (Tabla 42).

Por otro lado los datos de la Etapa II (Tabla 41) mostraron valores de coeficientes de respiración de 0.31 a 0.39, que fueron menores a los calculados con el modelo de Freijer y se encontraron en un intervalo un poco por debajo a los reportados en la literatura.

Al menos para las condiciones de experimentación empleadas fue mejor estimar directamente los coeficientes de respiración que a través del Modelo de Freijer. Al parecer la estimación del consumo de oxígeno a partir de un balance estequiométrico es menos adecuada por considerar constantes que se alejan de la realidad. Sin embargo, los coeficientes de respiración reportados indican que son muchas las condiciones que pueden permitir una variación al CR, desviándose del teórico para hidrocarburos de 0.67.

Tabla 42. Valores de coeficientes de respiración (CR) reportados para suelos contaminados con hidrocarburos

CR	Observaciones	Referencia
0.32	Hidrocarburos nafténicos	Davis, 1967
0.4	Diesel y motor oil	Gruiz y Kriston, 1995
0.4	TPH (aerobia con células)	McCarty, 1988
0.45	El O ₂ se consume 2.2 más rápido que el CO ₂ producido	Aelion <i>et. al.</i> , 1997
0.46	Reactor con hexano	Einsele, 1985
0.46	Hidrocarburos aromáticos-nafténicos	Davis, 1967
0.5	Variando el caudal de entrada de oxígeno al sistema	Freijer y Leffelaar, 1996
0.5	Con base en las reacciones estequiométricas	Müller-Markgraf, 1995
0.51	Headspace de columnas durante 19 días	Wirdrig, <i>et. al.</i> , 1995
0.578	Medido en laboratorio	Freijer y Leffelaar, 1996
0.58	Para distintos tipos de suelo	Freijer <i>et. al.</i> , 1996
0.59	Medido en laboratorio, la disminución se debe a la prod. de biomasa, suelo contaminado con 6730 mg/kg HC	Freijer, 1996
0.6	Para distintos tipos de suelo	Freijer <i>et. al.</i> , 1996
0.62	Suelos contaminados	Odu, 1978
0.63	Oxidación total de compuestos ligeros del petróleo	Frankenberger, 1992
0.63	Biodegradación de hexadecano	Graham <i>et. al.</i> , 1999
0.64	Parafinas ligeras	Davis, 1967
0.64	Hidrocarburos aromáticos	Davis, 1967
0.65	Para aceites ligeros	Frankenberger, 1992
0.65	Para distintos tipos de suelo	Freijer <i>et. al.</i> , 1996
0.67	Oxidación de un grupo metil	Davis, 1967
0.67	Alcanos lineales	Frankenberger, 1992
0.67	Mineralización total teórica	Freijer, 1996
0.67	Para -CH ₂ -	Odu, 1978
0.68	Parafinas pesadas	Davis, 1967
0.81	Suelo control	Odu, 1978
0.84	Conversión a células y metabolitos	Freijer, 1996

... continua Tabla 42. Valores de CR reportados para suelos contaminados con hidrocarburos

CR	Observaciones	Referencia
1	Varía en función de las condiciones ambientales y tipo de sustrato	Alef, 1995
1	Variando el caudal de entrada de oxígeno al sistema	Freijer y Leffelaar, 1996
1,5	Variando el caudal de entrada de oxígeno al sistema	Freijer y Leffelaar, 1996
1.6	En columnas degradación de diesel	Wirdrig y Manning, 1995
Otros compuestos		
0.15	Aprox. 7370 mg/kg de 2,4-D	Bartha y Pramer, 1965
0.42	Aprox. 3360 mg/kg de glucosa	Bartha y Pramer, 1965
0.81	Aprox. 1250 mg/kg de fenol	Bartha y Pramer, 1965

3.2. Producción de CO₂ y consumo de O₂ por consumo de hidrocarburo

Otros coeficientes del balance global de la degradación total de los hidrocarburos consideran al consumo de O₂ y la producción de CO₂. Para la Etapa I se obtuvo de 0.44 a 5.33 g O₂ / g de hidrocarburos y para la Etapa II de 0.92 a 4.60 g O₂ / g de hidrocarburos. Mientras que para la producción de CO₂ en la Etapa I se obtuvo de 0.35 a 4.73 g CO₂ / g de hidrocarburos y para la Etapa II de 0.44 a 2.21 g CO₂ / g de hidrocarburos. Con el único fin de observar un marco de referencia se presenta en la Tabla 43 algunos parámetros reportados en la literatura. La región de los valores obtenidos de la bibliografía no involucra valores límites, sino algunos ejemplos calculados o reportados.

Los datos extraídos de la literatura corresponden a pruebas realizadas en distintas condiciones experimentales por lo que es de esperarse que varíe su respuesta. Mientras que los resultados obtenidos en el presente trabajo corresponden a variaciones en las condiciones experimentales propias - concentración de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos - que produjeron cambios significativos en los patrones de degradación del diesel.

Otra fuente de variación en la producción de CO₂ es la humedad en el suelo (Sharabi y Bartha, 1993; Balba *et. al.*, 1998), debido a que se libera por procesos físicos y químicos del material degradado y

del carbonato abiótico (Alef, 1995; Margesin y Schinner, 1997b) y a que afecta la distribución del CO₂ en equilibrio (Freijer, 1996). Lo mismo ocurre con O₂, Li (1999) reportó que el coeficiente de transferencia de oxígeno en la matriz del suelo disminuye al disminuir el nivel de saturación. En el presente estudio la humedad se fijó constante en los microcosmos, pero no se consideró la transferencia de gases en los modelos, ni en las comparaciones con la literatura.

Evaluaciones más detalladas como el empleo de trazadores radiactivos permitirían determinar el origen real de la fuente de CO₂ y el destino del O₂ y tener así una interpretación más clara de los balances de materia en la biodegradación de mezclas ricas de hidrocarburos en un medio tan complejo como el suelo.

Tabla 43. Parámetros reportados o calculados de la bibliografía

g O₂/g hidrocarburos	Observaciones	Referencia
0.46	Sin considerar biomasa y metabolitos	Bouchez <i>et. al.</i> , 1997
0.62	Considera biomasa y metabolitos	Bouchez <i>et. al.</i> , 1997
0.74	Conversión a células y metabolitos	Freijer, 1996.
1.08 a 1.7	Biodegradación con biomasa	Fiorenza y Ward, 1997
1.67	HTP (aerobia con células)	McCarty, 1988
1.67	Diesel y aceite de motor	Gruiz y Kriston, 1995
2	Benceno en pozo	Nooman y Curtis, 1990
2 a 3	Necesario para diseño	Zegarra, 1994
2.29	Reacciones sin biomasa	Müller-Markgraf, 1995
3 a 3.5	Requerido	USEPA , 1999
3 a 5	Por g de HTP	Cole, 1994
3.00	Completa oxidación sin biomasa	Fiorenza y Ward, 1997
3.40	Reacciones con biomasa	Müller-Markgraf, 1995
3.43	Mineralización	Freijer, 1996
3.43	Oxidación de un grupo metil por 15	Davis, 1967
3.5	Petróleo en grava	Gibbs y Davis, 1976
3.5	Por g de n-octano	Cole, 1994
3.8	kg de O ₂ / l diesel	Frankenberger, 1992

... continua Tabla 43. Parámetros reportados o calculados de la bibliografía.

g CO ₂ /g hidrocarburos	Observaciones	Referencia
0.32	g de CO ₂ /g de diesel	Jackson, 1992
0.86	g de C de HC/ g C de CO ₂	Freijer, 1996
0.92	Diesel y aceite de motor	Gruiz y Kriston, 1995
0.97	HTP (aerobia con células)	McCarty, 1988
1.57	Reacciones	Müller-Markgraf, 1995
3.14	Mineralización	Freijer, 1996
3.14	Oxidación de un grupo metil por 15	Davis, 1967

F. Consideraciones Finales

Las condiciones de experimentación consideradas como el ajuste del pH, humedad, temperatura y aireación así como el aporte de nutrientes permitió incrementar significativamente la biodegradación del diesel por parte de la microflora nativa del suelo a nivel microcosmos.

El método seleccionado para la optimización estadística, así como las variables y sus niveles evaluados permitieron demostrar la influencia y el efecto del diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos y sus interacciones en la biodegradación de diesel en un suelo contaminado. Sin embargo, estas mejoras no alcanzaron un óptimo. A concentraciones más bajas de diesel y mayores aportes de fosfatos se podrían favorecer aún más a la biodegradación por arriba del 87.4% alcanzado. No se evaluaron niveles más bajos de diesel debido a que resulta poco práctico diluir más el diesel y a las limitaciones analíticas para la cuantificación de éste. Los fosfatos por su parte presentaron un bajo efecto en la biodegradación, relativo a las otras dos variables.

El consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono no constituyeron una respuesta adecuada como variables alternas para evaluar la biodegradación del diesel. Los modelos planteados determinaron que estas variables indican una actividad degradadora, pero que debido a que varían más en función de la concentración inicial del diesel no permitieron discernir los efectos de los nutrientes. Entre las principales causas elucidadas fueron la presencia de otras fuentes bióticas y abióticas productoras de CO₂ y el destino ajeno a la mineralización del carbono proveniente de los hidrocarburos. La respirometría es un método rápido, efectivo y económico, pero no es el método óptimo para evaluar parámetros de la microflora y la biodisponibilidad (Müller-Markgraf, 1995)

La relación C:N:P presentó limitaciones prácticas para determinar las condiciones de aportes de nutrientes requeridas para incrementar la biodegradación. A concentraciones altas por arriba de diez mil mg/kg - primera etapa experimental - su aplicación fue directa, pero a concentraciones más bajas no se compensaron las concentraciones relativas de nutrientes y fueron más prácticas las concentraciones absolutas.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. Conclusiones

Se observó que la selección de las variables para el diseño experimental y la MSR fueron adecuadas, incrementando el porcentaje de biodegradación en 29 veces.

Se demostró la influencia y el efecto de la concentración de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos y de sus interacciones a través de una MSR en la biodegradación de diesel de un suelo contaminado.

Se encontró que para optimizar la biodegradación de diesel industrial la concentración de diesel debió ser menor a 38,000 mg/kg para observar los efectos del nitrógeno amoniacal y de los fosfatos.

El nitrógeno amoniacal presentó un óptimo en función de la concentración del diesel y de los fosfatos variando de 2,500 a 2,900 mg/kg.

Los aportes de fosfatos brindaron un efecto benéfico a la biodegradación, pero no se alcanzó un óptimo hasta 60 mg/kg.

La Metodología de Superficie de Respuesta mostró ser una herramienta útil para dirigir el proceso de optimización.

El error experimental pudo deberse a la complejidad del sistema

Los resultados indicaron que no es conveniente aplicar relaciones generales de C:N:P sin considerar las condiciones específicas de cada suelo y los valores absolutos. En algunos casos se podría estar operando en condiciones a las cuales la concentración del contaminante es tan alta que se inhibe la biodegradación por lo que la estimulación sólo por la adición de nutrientes no dará los resultados esperados.

A concentraciones de diesel menores a 19,000 mg/kg - segunda etapa experimental - la relación C:N:P fue menos adecuada que emplear los valores absolutos.

Las pruebas de respirometría demostraron ser una herramienta indicativa de la actividad del suelo dependiendo directamente de la concentración del diesel, pero no de la biodegradación. Los modelos ajustados al consumo de oxígeno molecular y la producción de dióxido de carbono no establecieron una relación adecuada entre éstas y la biodegradación que permitiera emplearlas como variables de respuesta de la biodegradación.

La completa optimización no se logró, sin embargo se obtuvo un buen conocimiento del proceso y de las condiciones necesarias para mejorar la biodegradación del diesel. Este conocimiento permitió incrementar el porcentaje de biodegradación hasta un 85% con respecto al suelo sin adición de nutrientes, ni adecuación de la concentración del diesel.

B. Recomendaciones

Las pruebas de biotratibilidad permiten determinar las condiciones bajo las cuales puede existir una biodegradación representativa de un hidrocarburo en suelo. En distintos casos éstas pueden determinar la factibilidad de estimular a la **flora nativa** de un suelo a través del aporte de nutrientes (**bioestimulación**).

Para implementar estrategias de biodegradación de un hidrocarburo se propone considerar el efecto de concentraciones elevadas del hidrocarburo y de los nutrientes con la finalidad de no alcanzar niveles tóxicos y/o de inhibición de la actividad biodegradadora o desperdiciar recursos.

El desarrollo del presente trabajo no incluyó el desarrollo de cinéticas de biodegradación las cuales podrían complementarse en un trabajo posterior.

Las observaciones descritas podrían complementarse con conteos en bacterias, hongos y levaduras para evaluar su participación en el proceso de biodegradación.

Se propone el desarrollo de pruebas de toxicidad como un avance en esta línea de investigación.

La adición de nutrientes y algunas otras propiedades como la modificación de la textura del suelo se sugieren a nivel mesocosmos.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Aelion, M. C., Kirtland, B. C., and Stone, P. A. 1997. Radiocarbon Assessment of Aerobic Petroleum Bioremediation in the Vadose Zone and Groundwater at an AS/SVE Site. **Environ. Sci. Technol.** 31 (12): 3363-337.
- Aggarwal, K. P., Fuller, M. E., Gurgas, M.M., Manning, J. F., and Michael A. Dillon, M. A. 1997 Use of Stable Oxygen and Carbon Isotope Analyses for Monitoring the Pathways and Rates of Intrinsic and Enhanced in Situ Biodegradation.
- Aguilera N.H. 1989. Tratado de Edafología de México, Tomo I, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Aiba, S., Hamphrey, A.E., and Mills, N.F. 1965. Biochemical Engineering. Academic Press. New York.
- Alef, K. 1995. Soil Respiration. En Alef, K., and Nannipieri, P. (Eds.) Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. San Diego, California.
- Alexander, M. 1994. Biodegradation and bioremediation. Academic Press. E.U.A.
- ANIQ, 1996. Asociación Nacional de la Industria Química, A.C.: Anuario Estadístico de la Industria Química Mexicana.
- Atlas, R. M. 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation-Bioremediation of Oil Spills. . **Chem. Tech. Biotechnol.** 52. 149-156.
- Atlas, R. M., and Bartha, R., 1972. Degradation and mineralization of petroleum in seawater limitation of nitrogen and phosphorus. **Biotechnol. Bioeng.** 14: 309 - 317.
- Atlas, R. M., and Bartha, R. 1973. Stimulated Biodegradation of Oil Slicks Using Oleophilic Fertilizers. **Environ. Sci. Tech.** 7: 538-541.

- Atlas, R. M., and Bartha, R. 1998. *Microbial Ecology*. 4a ed. The Benjamin/Cummings Publication. California.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol. Rev.** 45: 180-209.
- ATSDR, 1992. Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Evaluación de riesgos en salud por la exposición a residuos peligrosos. U.S. Department of Health and Human Services.
- Balba, M. T., Al-Awadhi, N, and Al-Daher, R. 1998. Bioremediation of oil-contaminated soil microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. **J. Microbiol. Methods** 32 (2): 155-164.
- Banerjee, J. K., and Gray, M. R. 1997. Analysis of Hydrocarbon-contaminated soil by thermal extraction-gas chromatography. **Environ. Sci. Technol.** 31(3) 646-650.
- Bartha, R., and Pramer, D. 1965. Feature of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science** 100(1): 68-70,
- Blackman, R. A. A., Fileman, T. W., Law, R. J., and Thain, J. E. 1988. The effects of oil-based drill-muds in sediments on the settlement and development of biota in a 200-day tank test. **Oil and Chemical Pollution.** 4: 1-19
- Block, R. N., Clark, T. P., and Bishop, M. 1989. Biological treatment of soils contaminated by petroleum products. En Kostecki, P.T. and Calabrese, E.J. (Eds.) *Hydrocarbon contaminated soils and groundwater*. Vol 2. Lewis Publishers,. Michigan.
- Bossert, I., and Bartha, R., 1984, The fate of petroleum in soil ecosystems. En Atlas, R. M. (Eds). *Petroleum microbiology*. Macmillan Publishing Company. New York.
- Bouchez, M, Blanchet, D., and Vandecasteele. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43(1): 156 - 164.

- Bouchez, M., Blanchet, D., Besnainou, B., Leveau, J-Y., and Vandecasteele, J-P. 1997. Kinetic studies of biodegradation of insoluble compounds by continuous determination of oxygen consumption. **J. Appl. Microbiol.** 82(3) : 310-316.
- Bouchez, M., Blanchet, D., and Vandecasteele. 1996. The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45(4): 556-561.
- Box, G. E. P., and Wilson, K. G. 1951. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society, B.** 13:1-45.
- Box, G. E. P., 1954. The exploration and exploitation of Response Surface: some general considerations and examples. **Biometrics.** 10 (1): 16-60.
- Braddock, J. F., Ruth, M. L., Catterall, P. H., Walworth, J. L., and McCarthy, K. A. 1997. Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon-contaminated arctic soils: implications for nutrient-amended bioremediation. **Environ. Sci. Technol.** 31 (7): 2078 - 2084.
- Bragg, J. R., Prince, R. C., Harner, E. J., and Atlas, R. M. 1994. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. **Nature.** 368 (31): 413-418.
- Britto, R., Sherrard, J. H., and Truax, D. D. 1993. 48th Purdue Industrial Waste Conference Proceedings. Lewis Publishers, Chelsea, Michigan.
- Britto, R., Sherrard, J. H., and Truax, D. D. 1996. Kinetics of pseudo-continuous flow bioreactor treatment of diesel contaminated soils. **Water, Air, Soil Pollut.** 86 (1-4): 125-136.
- Brown, K.W., Donnell, K.C., and Devel, L. E. Jr. 1983. Effects of Mineral Nutrients, Sludge Application Rate, and Application Frequency on Biodegradation of Two Oily Sludges. **Microbiol. Ecol.** 9: 363-373.

- Buitron, G., and Capdeville, B. 1993. Uptake rate and mineralization of hexadecane and naphthalene by a mixed aerobic culture. **Water Res.** 27 (5): 847 - 853.
- Büyüksönmez, F, Hess, T. F., Crawford, R. L., and Watts, R. 1998. Toxic effects of modified Fenton Reactions on *Xanthobacter flavus* FB71. **Appl. Environ. Microbiol.** 64 (10) : 3759 - 3764.
- Cancino, M. A., Rodriguez, J. D. y Muñoz, J. M., 1998. Restauración de sitios contaminados, el papel de la autoridad. **Teorema.** 62 (18): 73 - 76.
- Carter, M. 1993. Soil Sampling and methods of analysis. Canadian Society of Soil Scienc. Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Cassidy, D. P., and Irvine, R. L. 1997. Biological treatment of a soil contaminated with diesel fuel using periodically operated slurry and solid phase reactors. **Wat. Sci. Technol.** 35(11):185-192.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation.** 3 (2-3): 351 - 368.
- CFE, 1999. Comisión Federal de Electricidad: Generación de energía eléctrica. En <http://www.cfe.gob.mx/git/generac0.html>
- Cochran, W. G. y Cox, G. M., 1965. Diseños experimentales. Trillas. México.
- Cole, G. M. 1994. Assessment and Remediation of Petroleum Contaminated Sites. Lewis Publishers London.
- Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, 1999. Reformas aplicadas el 26/02/1999 en el primer periodo Ordinario de sesiones del año II de la LVII Legislatura de la Cámara de Diputados
- Cookson, Jr. J. 1995. Bioremediation Engineering Design and Application. McGrawHill, EE.UU.

- Chang, Z. Z., and Weaver. 1997. Nitrification and utilization of ammonium and nitrate during oil bioremediation at different soil water potentials. **J. Soil. Contam.** 6(2):149 -160.
- Chang, Z. Z., Weaver, R. W., and Rhykerd, R. L. 1996. Oil Bioremediation in a High and a Low Phosphorus Soil. **J. Soil Contam.** 5 (3): 215-224.
- Cheyrier, V., Feinberg, M., Characas, C., and Decauze, C., 1983. Application of response surface methodology to evaluation of bioconversion experimental conditions. **Appl. Environ. Microbiol.** 45 (2): 634-639
- Davis, J.B. 1967. Petroleum Microbiology. Elgevier Publishing Company. Amsterdam.
- De Jonge, H., Freijer, J.I., Verstraten, J.I., Westerveld, J.M., and Van der Wielen, J. 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. **Environ. Sci. Technol.** 31(3): 771-775.
- Demque, D. E., Biggar, K. W., and Heroux, J. A. 1997. Land treatment of diesel contaminated sand. **Can. Geotech.** 34: 421-431.
- Deni, J., and Penninckx, M. J. 1999. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (9): 4008 - 4013.
- Desrochers, M. L., Jurasek, L., and Paice. M. G. 1981. Production of cellulase, α -glucosidase y xylanase by *Schizophyllum commune* grown on a cellulose-peptone medium. **Dev. Ind. Microbiol.** 22:675-684.
- Dibble, J. T., and Bartha, R. 1976. Effect of iron ont he biodegradation of petroleum in seawater. **Appl. Environ. Microbiol.** 31 (4): 544-550.
- Dibble, J.T., and Bartha, R. 1979. Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge. **Appl. Environ. Microbiol.** 37 (4) : 729-739.

Dinnen, D. Slater, J. P., Hicks. P., Holland, J., and Clendening, L. D. 1990. In situ biological remediation of petroleum hydrocarbons in unsaturated soils. En Petroleum Contaminated Soils. Paul T. KostECKI, Edward J. Calabrese (Ed.) Vol 3.

DO, 1937. Diario Oficial del 24 de junio de 1937

DO, 1968. Diario Oficial del 7 de noviembre de 1968

DOF, 7 de julio de 1999. Diario Oficial de la Federación: Convocatoria para participar en la Licitación Pública Internacional LIC-GAS-014-1999 que tendrá por objeto el otorgamiento del primer permiso de distribución de gas natural para la zona geográfica del Bajío Norte.

DOF, 1988. Diario Oficial de la Federación del 25 de noviembre de 1988

DOF, 1992. Diario Oficial de la Federación del 16 de julio de 1992.

DOF, 1996. Diario Oficial de la Federación del 13 de diciembre de 1996

DOF., 1999a. Diario Oficial de la Federación del 22 de Febrero de 1999.

DOF, 1999b. Diario Oficial de la Federación del 7 de julio de 1999.

Durant, N. D., Jankers, C. A., Wilson, L. P., and Bouwer, E. J. 1995. Enhanced Biodegradation of Naphthalene in MGP Acuífer Microcosms. En Intrinsic Bioremediation (Bioremediation, 3(1)) by Robert E. HinchEE (Editor), John T. Wilson. Portland, Or. Battelle.

Egli, T. 1991. On Multiple Nutrient Limited Growth of Microorganisms with Special Reference to Dual limitation by Carbon and Nitrogen Substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**. 60: 225-234.

Ehrlich, H. L. 1981. Geomicrobiology. Marcel Dekker, inc. New York.

Einsele, A., 1985. Biomass from higher n-alkanes. En Biotechnology. Rehm, H-J y Reed, G (Eds.) VCH, Weinheim. Vol. 3. 63

- Eletrowicz, M., and Boeva, V. Electrokinetic supply of nutrients in soil bioremediation. **Environ. Technol.** 17: 1339-1349.
- Eve, R. R. 1992. Bioremediation of petroleum contaminated sites. Smoley. Chelsea. Michigan.
- Fedorak, P. M., and Westlake, D. W. S. 1981. Microbial Degradation of Aromatics and Saturates in Prudhoe Bay Crude Oil a Determined by Glass Capillary Chromatography. **Can. J. Microbiol.** 27: 432-443.
- Fiorenza, S., and Ward, Ch. 1997. Microbial adaptation to hydrogen peroxide and biodegradation of aromatic hydrocarbons. **J. Ind. Microb. Biotech.** (18): 140-151.
- Foght, J. M., Fedorak, P. M., and Westlake, D. W. S. 1990. Mineralization of [¹⁴C]Hexadecane and [¹⁴C]Phenanthrene in Crude Oil Spcificity Among Bacterial Isolates. **Can J. Microbiol.** 36: 169-175.
- Frankenberger, Jr. W. T., 1992. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. En Hydrocarbon Contaminated soils and groundwater. Vol. 2. E. J. Calabrese and P. T. KostECKI (Eds). Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Freeze, R. A., and Cherry, J. A. 1979. Groundwater. Prentice- Hall. New Jersey. EE.UU.
- Freijer, J.I. 1996. Mineralization of hydrocarbons in soils under decreasing oxygen availability. **J. Environ. Qual.** 25: 296-304.
- Freijer, J.I., de Jonge, H., Bouten, W., and Verstraten. 1996. Assessing mineralization rates of petroleum hydrocarbons in soils in relation to environmental factors and experimental scale. **Biodegradation.** 7: 487 - 500.
- Freijer; J. I., and Leffelaar, P. A. 1996. Adapted Fick's law applied to soil respiration. **Water Resour. Res.** 32 (4): 791 - 800.

- Gary, C. D., 1993. Química analítica. Limusa. México.
- Gary, J., and Handwerk, G. 1980. Petroleum Refining Technology and Economics. Marcel Dekker, Inc. New York
- Gaudy, A. F., and Gaudy, E. T. 1981. Microbiology for Environmental Scientists and Engineers. McGraw Hill, Tokyo.
- Geerdink, M. J., Van Loosdrecht, M.C.M., and Luyben, K. Ch. A. M. 1996. Biodegradability of diesel oil. **Biodegradation** 7: 73-81.
- Genouw, G., De Naeyer, F., Van Meenen, P., Van deWerf, H., De Nijis, W., and Verstraete, W. 1994. Degradation of oil sludge by landfarming - a case-study at the Ghent Harbour. **Biodegradation**. 5: 37-46.
- Gibbs, C.F., and Davis, S.J. 1976. The rate of microbial degradation of oil in a beach gravel column. **Microbial Ecol.** 3: 55-64.
- Glasovskaya, M. A., and Pirkovski, Y. I. 1985. Estudio experimental complejo de los factores que realizan la autodepuración y rehabilitación de suelos contaminados con petróleo en diferentes zonas naturales. En Bobovnikova, T.I. y Nalakhov, S.G. (Eds.) Migración de sustancias contaminantes en suelos y ambientes adyacentes. 3er. Somposio Nacional de la Unión, Obninsk, Rusia, Sept. 1981, Gridrometeoizdat, Leningrado, Rusia.
- Gordon, A. H. III, DeLaune, R. D., Patrick; Jr. W. H. 1980. Effect of Estuarine Sediment pH and Oxidation-Reduction Potencial on Microbial Hydrocarbon Degradation. **Appl. Environ. Microbiol.** 40 (2): 365-369.
- Graham, D. W., Smith, V. H., and Law, K.P. 1995. Application of Variable Nutrient Supplies to Optimize Hydrocarbon Biodegradation. En Bioreclamation of Recalcitrant Organics, Hinchee, R. E., Anderson, D. B. and Hoeppel, RR., Batelle Press. Vol. 7. pp. 331-340E.

- Graham, D. W., Smith, V. H., and Law, K.P. Clealand, D. D. 1999. Effects of nitrogen and phosphorus supply on hexadecane biodegradation in soil systems. **Water, Air, Soil Pollut.** 111: 1 - 18.
- Gruiz, K., and Kriston, É. 1995. In Situ Bioremediation of Hydrocarbon in Soil. **J. Soil Contam.** 4 (2): 163-172.
- Grundmann, R., and Rehm, J. H. 1991. Biodegradation of Diesel-Fuel. **Sci. Technol.** 44 (14): 149-150.
- Hill, W. J., and Hunter, W. G., 1966. A review of Response surface Methodology: a literature survey. **Technometrics** 8 (4): 571-590
- Hinchee, R.E., and Ong, S.K. 1992. A rapid in situ respiration test for measuring aerobic biodegradation rates of hydrocarbons in soil. **J. Air Waste Manage. Assoc.** 42 (10): 1305 - 1312.
- Huddleston, R.L. 1979. Solid waste disposal: Landfarming. **Chem. Eng.** 86: 119 -124.
- Huesemann, M. H. 1994. Guidelines for Land-Treating Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soils. **J. Soil Contam.** 3(3): 299-318.
- Hughes, J.B., Beckles, D.M., Chandra, S.D., and Ward, C. H. 1997. Utilization of bioremediation processe for the treatment of PAH-contaminated sediments. **J. Ind. Microbiol and Biotechnol.** 18: 152-160.
- Hunt, P. G., Rickard, W. E., Deneke, F. J., Koutz, and Murrman, R. P. 1973. Terrestrial oil spills in Alaska: environmental effects and recovery. En Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills.. API. Washington, D.C. March 13-15
- Huntjens, J. L. M., de Potter, H., and Barendrecht, J. 1996. The degradation of oil in soil. En Assink, J.W and van der Brink, W.J. (Eds.) Contaminated soil. Dordrecht. Martinus Nijhoff Publishers. Holanda.

- Hute, A. y Lee, A. 1986. Methods of soil analysis en Agronomy, No 9. Society of Agronomy, Soil Science Society of America, USA, 545-567.
- IEA. 1999. World Energy Outlook Energy. International Energy Agency. En <http://www.iea.org/weo/division.htm>
- International Institute for Sustainable Development., 1996. Global green standards: ISO 14000 and sustainable development. En <http://www.iied.org>
- International Oil Spill Statitistic, 1999. En [http:// www.cutter.com/](http://www.cutter.com/)
- Jackson W. A.y Pardue, J. H. 1999. Potencial for enhancement of biodegradation of crude oil in Louisiana salt marshes using nutrient amendments. **Water, Air, Soil Pollut.** 109 (1-4): 343-355.
- Jackson, J. D. 1990. Bioremediation of diesel contaminated soils. Memorias del 3rd Annual Symposium of the Arizona Hydrological Society, Casa Grande, Arizona. 309-316.
- Jackson, J. D. 1992. In-situ Bioremediation of diesel contaminated soils. Memorias del 5th Annual Symposium of the Arizona Hydrological Society, Casa Grande, Arizona. 309-316.
- Jackson, M. L. 1982. Análisis químicos de suelos. Ediciones Omega, 4a edición, Barcelona, España.
- Jobson, A. M., McLaughlin, M., Cook, F. D., and Westlake, W. S., 1974. Effect of Amendments on the microbial utilization of oil applied to soil. **Appl. Microbiol.** 27 (1): 166-171
- Jorgensen, K.S., Puustinen, J., and Suortti, A.M. 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in bipiles. **Environ. Pollut.** 107: 246-254.
- Juma, N. G., 1998. The pedosphere and its dynamics: soil texture, structure and color, 3.3.3 Bulk density of mineral soils. En http://www.soils.rr.ualberta.ca/Pedosphere/content/section03/page03_03.cfm.

- Kanally, R., Bartha, R., Fogel, S., and Findlay, M. 1997. Biodegradation of [¹⁴C]Benzo[a]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 (11): 4511-4515.
- Kästner, M, Breuer-Jammali, M., and Mahro, B. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 64 (1): 359-362.
- Kim, T.H. 1994. Environmental Soil Science. M. Dekker. New York.
- Korda, A., Santas, P, Tenente, A., and Santas, A. 1997. Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 677 - 686.
- Launen, L.A., Pinto, L. J., and Moore, M. M. 1999. Optimization of pyrene oxidation by *Penicillium janthinellum* using response - surface methodology. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 51: 510 - 515.
- Laurence, G., 1995. Risks and benefits of environmental audits and assessments in the petroleum industry. En <http://www.hayboo.com>
- Leahy, J. G., and Colwell, R. R, 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. **Microbial Reviews.** 54 (3) :305 – 315.
- Lee, M. D., and Swindoll, C. M. 1993. Bioventing for in situ remediation. **Hydrol. Sci. J./J. Sci. Hydrol.** 38 (4): 273 - 282.
- Lewis R.F. 1993. Site demonstration of slurry-phase biodegradation of PAH contaminated soil. **Air and Waste.** 43: 503-508.
- Li, K. Y. 1999. Measurement of oxygen transfer rate in soil matrices. National Center for Environmental Research and U.S. Environmental Protection Agency - Office of Research and Development. APE 094LUB2382.

- Lind, E. E., Goldin, J., and Hickman, J. B. 1960. Fitting yield and cost response surfaces. **Chem. Eng. Prog.** 5, 62.
- López, R. J. y López, M. J. 1978. El diagnóstico de suelo y plantas, Métodos de campo y laboratorio. 3ª Edición. Ediciones Mundo-Prensa.
- Lyons, P. H., Keeey, J. F., Morrissey, P. A., and Buck, D. J. 1999. The influence of added whey protein/carrageenan gels and tapioca starch on the textural properties of low fat pork sausages . **Meat Science** 51 (1): 43-52.
- Maddox, I. S., and Richert, S. H., 1977. Use of response surface for the optimization of microbiological media. **J. Appl. Bacteriol.** 43: 197-204
- Madrigal M. I., 1998. Tesis de maestría: Alternativas de tratamiento para la rehabilitación de sitios contaminados con hidrocarburos en México. Facultad de Ingeniería - División de Estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Margesin, R., and Schinner, F. 1997a. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 47: 462 - 468.
- Margesin, R., and Schinner, F. 1997b. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in Alpine soils. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 (7): 2660 -2664.
- Marty, J. L., 1985. Application of response surface methodology to optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 22, 88-91
- McAllister, P.M., Chiang, C. Y., Salatino, J. P., Dortch, I. J., and Williams, P. 1995. Enhanced Aerobic Bioremediation of Residual Hydrocarbon Sources. En *Intrinsic Bioremediation (Bioremediation, 3(1))* by Hinchee, R. E, Wilson, J. T and Douney, D. (Editores),. Portland, Or. Battelle.

- McCarron, P. A., Woolson, A. D., and Keating, S. M. 1999. Response surface methodology as a predictive tool for determining the effects of preparation conditions on the physicochemical properties of poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. **Int. J. Pharm.** 193: 37-47.
- McCarty, P. L. 1988. Bioengineering issues related to in situ remediation of contaminated soils and groundwater. En *Environmental Biotechnology Reducing Risks from Environmental Chemicals through Biotechnology*. Osmenn, G. (Eds). Plenum Press. New York Rosenberg et. al. , 1992.
- McDaniel, L. E., Bailey, E. G., Ethiraj, S., and Andrews, H. P., 1976. Application of response surface optimization technique to polyene macrolide fermentation studies in shake flasks. **Dev. Indust. Microbiol.** 17: 91-98
- McGill, W. B. 1977. Soil restoration following oil spills - A review. **J. Can. Petrol. Technol.** April - June: 60 -67.
- Mead, R., and Pike, J. D., 1975. A review of Response Surface Methodology from a biometric point of view. **Biometrics.** 31, 803-851.
- Mendelssohn, I. A., Hester, M. W., Sasser, C., and Fischel, M., 1990. The effect of a Louisiana crude oil discharge from a pipeline break on the vegetation of a southeast Louisiana brackish marsh. **Oil and Chem. Pollut.** 7: 1-15.
- Milcic-Terzic, J, López-Vidal, Y, Vrvic, M.M y Saval, S. 1999. Evaluación del potencial de biodegradación de un consorcio microbiano aislado de un suelo contaminado con diesel. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias. Universidad de Belgrado. Yugoslavia (en Serbio).
- Milcic-Terzic, J, López-Vidal, Y, Vrvic, M.M, and Saval, S. 2000. Biodegradation potential assessment of microbial consortia isolated from a diesel-contaminated soil. **Wat. Sci. Technol.** 42 (5-6).
- Miller, R. 1997. Analysis of Information Contained in the Completed North American Innovative Remediation Technology Demonstration Projects. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center. Series Information Report TI-97-01.

- Mills, S. A., and Frankenberger, Jr., W. T. 1994. Evaluation of phosphorus sources promoting biorremediation of diesel fuel in soil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 53 (2):280 - 284.
- Miyoshi, M. 1895. Die Durchbohrung von Membranen durch Pilzfäden. **Jahrb f. wiss. Botanik.** 28. 269-289.
- Mohn, W. W., and Steward, G. R. 2000. Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in Artic soils. **Soil Biol. Biochem.** 32: 1161-1172.
- Montemagno, C.D., Leo, A., Craig, J. Site characterization for the in situ bioremediation of the vadose zone. **Govt Reports Announcements & Index.** 22.
- Montgomery, D.C., 1991. Diseños y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamérica. México.
- Montomery, D. C., and Peck, E. A. 1982. Introduction to linear regression analysis. John Wiley and Sons. New York.
- Morgan, P., and Watkinson, R. J. 1992. Factors limiting the supply and efficiency of nutrient and oxygen supplements for the in situ biotreatment of contaminated soil and groundwater. **Wat. Res.** 26(1): 73-78.
- Morgan, P., Watkinson, R. J., and Atlas, R. M. 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment. **Crit. Rev. Biotech.**, 8 (4): 305-333.
- MPI, 1999a. La demanda sobrepasará la producción en el 2020. Mercadeo Petrolero Internacional. Boletín No. 43, 19 de marzo de 1999.
- MPI, 1999b. Firme la posición mexicana ante la inversión extranjera en el sector petrolero. Mercadeo Petrolero Internacional. Boletín No. 47, 19 de abril de 1999.
- MPI, 1999c. Crítica el líder del Partido Republicano en Estados Unidos al Protocolo de Kyoto. Mercadeo Petrolero Internacional. Boletín No. 48, 26 de abril de 1999

- MPI, 1999d. Cambios estructurales en la industria del petróleo. Mercadeo Petrolero Internacional. Boletín No. 51, 17 de mayo de 1999.
- MPI, 1999e. Implicaciones de la instrumentación del Protocolo de Kyoto. Mercadeo Petrolero Internacional. Boletín No. 54, 7 de junio de 1999
- MPI, 1999f. Cambios tecnológicos, energías alternativas e industria mundial energética. Mercadeo Petrolero Internacional. Boletín No. 55, 14 de junio de 1999.
- MPI, 2000. Movimientos mixtos en las cotizaciones del crudo. Mercadeo Petrolero Internacional. Boletín No. 119, 24 de septiembre de 2000.
- Müller-Markgraf, W. 1995. Degradation parameters. En Alef, K. and Nannipieri, P. (Eds.). *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. pp. 530-533.
- Murray, D. A. J. , Lockhart, W. L., and Webster, C. R. B., 1984. Analysis of the water-soluble fraction of crude oils and petroleum products by gas chromatography. **Oil and Petrochem. Pollut.** 2 (1): 39-46.
- Myers, R. H., 1971. *Response Surface Methodology*. Allyn and Bacon. Boston.
- Nooman, D. C, and Curtis, J. J. 1990. *Groundwater Remediation and Petroleum*. Lewis Publishers. Michigan.
- Nuñez, F. P y Caparó, C., 1998. Familia ISO 14000 / ISO 14000 Family. Repidisca - CEPIS No. 68.
- OCDE, 1999. *Energy Balances of OECD Countries, 1995-1996*, IEA/OECD, Paris.
- Odu, C. T. I. 1972. Microbiology of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. I. Extent of contamination and some soil and microbial properties after contamination. **J. Petrol. Inst.** 58 (562): 201 - 208.

- Odu, C.T. 1978. The effect of nutrient application and aeration on oil degradation in soil. **Environ. Pollut.** 15: 235-240.
- OECD, 1998a. Energy Balances of OECD countries, 1995-1996. International Energy Agency / Organización de Cooperación y Desarrollo Económico, París.
- OECD, 1998b. Main Economic Indicators. Organización de Cooperación y Desarrollo Económico, París.
- OECD, 1998c. National Accounts Division, STD. Organización de Cooperación y Desarrollo Económico, París.
- Olson, JJ; Mills, GL; Herbert, B. E., and Morris, PJ. 1999. Biodegradation rates of separated diesel components. **Environ. Toxicol. Chem.** 18(11): 2448-2453.
- Palacio Nacional, a 2 de febrero de 1999. Iniciativa de reformas a los Artículos 27 y 28 de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos enviada por el Jefe del Ejecutivo a la H. Congreso de la Unión.
- Parker, E.F., and Burgos, W. D. 1999. Degradation patterns of fresh and aged petroleum contaminated soils. **Environ. Engin. Sci.** 16:(1) 21 - 29.
- Paul, E. A., and Clark, F. E. 1989. Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press. San Diego.
- Pelczar, M. J., Reid, R., and Chan, E. C., 1982. Microbiología. 2ª edición. McGraw-Hill. México D.F.
- PEMEX. 1996. Petróleos Mexicanos. Memoria de Labores 1995. PEMEX. México
- PEMEX. 1997. Petróleos Mexicanos. Memoria de Labores 1996. PEMEX. México
- PEMEX. 1999. Indicadores operativos. Petróleos Mexicanos. En <http://www.pemex.com/oestadistica>

- PEMEX. 2000. Petróleos Mexicanos. Indicadores Petroleros: Elaboración de Productos Petrolíferos. En <http://www.pemex.com/eprocscrudo.html>
- Piotrowski, M.R., Anserude, R.G., and Schmidt, F.J. 1992. Bioremediation of diesel contaminated soil and tundra in an Artic environment. En Kostecky, P.T. and Calabrese, E.J. (Eds.) Contaminated soils: diesel fuel contamination. Lewis publishers, Michigan.
- Pope, D. 1996. Natural Attenuation of Soils. En Seminar Series on Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implementation. EPA 1625/R-96/001.
- Porta, C. J., López-Acevedo, R. M. y Roquero de Laburu, C. 1994. Edafología para agricultura y el medio ambiente. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Pritchard, P. H., Mueller, J.G., Rogers, J. C., Kremer, F.V., and Glaser, J. A. 1992. Oil Spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska. Biodegradation. 3: 315-335.
- Profepa, 1999a. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Auditorias. En <http://www.profepa.gob.mx/saa/audita05.htm#Logros de la auditoría>
- Profepa, 1999b. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Instalaciones de Petróleos Mexicanos Incorporadas al Programa Nacional de Auditoría Ambiental En <http://www.profepa.gob.mx/saa/audita36.htm>
- Profepa, 1999c. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. Investigación de Accidentes. En <http://www.profepa.gob.mx/saa/audita08.htm>
- Protocolo de Kyoto, 1997. Protocolo de Kyoto de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. Kyoto
- Quintanilla, J. y Bauer, M., 1995. Los grandes retos de PEMEX en materia ambiental en PEMEX: ambiente y energía. Los retos del futuro. Instituto de Investigaciones jurídicas. Serie E: Varios, núm. 69.

- Rainwater, K., Mayfield, M. P., Heintz, C., and Claborn, B. J. 1993. Enhanced in situ biodegradation of diesel fuel by cyclic vertical water table movement: preliminary studies. **Water Environ. Res.** 65(6): 717-725.
- Rasiah, V., Varoney, R.P., and Kachanoski, R.G. 1991. Effect of N amendment on C mineralization of an oily waste. **Water, Air and Soil Pollut.** 59, 249 -259.
- Raymond, C. L. 1992. Bioremediation of PAH Compounds in Contaminated Soil. En Hydrocarbon Contaminated soils and groundwater. Vol. 2. E. J. Calabrese and P. T. Kostecki (Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Raymond, R. L., Hudson, J. O., and Jamison, V. W. 1976. Oil degradation in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 31: 522-533.
- Raymond, R. L., Hudson, J. O., and Jamison, V. W., 1976a. Oil degradation in soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 31: 522-535.
- Read, D. R., 1954. The design of chemical experiments. **Biometrics.** 10 (1):1-15
- Reed, M., and French, D., 1989. Overview of a natural resource damage assessment model system for coastal and marine environments. **Oil and Chem. Pollut.** 5: 85-97.
- Remmers, E. G., and Dunn, C. G., 1961. Process improvement of a fermentation product. **Ind. Eng. Chem.** 53 (9):743-745.
- Rhykerd, R.L., Weaver, R.W., and McInnes, K.J. 1995. Influence of salinity on bioremediation of oil in soil. **Environ. Pollut.** 90 (1): 127-130.
- Rogers, J. A., Tedaldi, J. D., and Kavanaugh, M. C. 1993. A screening protocol for bioremediation of contaminated soil. **Environ. Prog.** 12 (2): 146-156.

- Rogers, J. A., Tedaldi, J. D., and Kavanaugh, M. C., 1993. A screening protocol for bioremediation of contaminated soil. **Environ. progr.** 12 (2): 146-156.
- Rosenberg, E., Legmann, R., Kushmaro, A., Taube, R. Adler, E., and Ron, E. Z. 1992. Petroleum bioremediation - a multiple problem. **Biodegradation.** 3: 337-350.
- Salanitro, J. P., Dorn, P. B., Huesemann, M. H., Moore, K. O., Rhodes, I. A., Rive, L. M., Vipond, T. E. Western, M.M., and Wisniewski, H. L. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. **Environ. Sci. Technol.** 31, 1764-1776.
- Saval, S. 1992. Desarrollo de un proceso fermentativo para la producción de estreptomicina. Tesis Doctorado (Doctorado en Biotecnología), Colegio de Ciencias y Humanidades, Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Saval, S. 1995. Remediación y Restauración. En PEMEX: Ambiente y Energía. Instituto de Investigaciones Jurídicas - Universidad Nacional Autónoma de México / Petróleos Mexicanos.
- Saval, S. 1997. Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. **Ingeniería y Ciencias Ambientales** Num. 33, julio-septiembre: 24-30.
- Saval, S. 1997. Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. **Ingeniería y Ciencias Ambientales** No.33 (julio-septiembre).
- Saval, S. 1998a. Biorremediación: Alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos de suelos contaminados con hidrocarburos. **Ingeniería y Ciencias ambientales.** No. 34.
- Saval, S. 1998b. Sitios contaminados con hidrocarburos. **Teorema** , 62 (19): 14 - 17.
- Saval, S. 1998c. Situación actual y perspectivas de la biorremediación de suelos y acuíferos en México. **Biotecnología.** 3: 71 - 76.

- Saval, S., Pablos, L. y Sánchez, S., 1993. Optimization of a Culture Medium for Strptomycin production using response-surface methodology. **Biores. Technol.** 43: 19-25
- Secretaria de Energía. 1999. Indicadores Financieros y Presupuestales. En <http://www.energia.gob.mx/estadisti/indicadores.html>
- Sharabi, E. S., and Bartha, R. 1993. Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. **Appl. Environ. Microbiol.** 59 (4): 1201 - 1205.
- Shou, W. y Bobra, M., Bobra, A. M., Maijasen, A. Suntio, L. y Markay, D., 1990. The water solubility of crude oils and petroleum product. **Oil and Chem. Pollut.** 7:57-84.
- Sims, J. L., Sims, R. C., and Matthews, J. E., 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. **Hazardous Waste and Hazardous Materials.** 7 (2): 117-149.
- Smith, V. H., Graham, D. W., and Clealand, D. D. 1998. Application of Resource-Ratio theory to hydrocarbon biodegradation. **Environ. Sci. Technol.** 32 (21): 3386 - 3395.
- Song, H.-G., and Bartha, R. 1990. Bioremediation Potencial of Terrestrial Fuel Spills. **Appl. Environ. Microbiol.** 56 (3): 646-651.
- Song, H-G, Wang, X., and Bartha, R., 1990. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. **Appl. Environ. Microbiol.** 56 (3): 652-656.
- Swindoll, C.M., Aelion, C.M., and Pfaender, F. K. 1988. Influence and Organic Nutrients on Aerobic Biodegradation and on the Adaptation Reponse of Subsurface Microbial Comunities. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 212-217.
- Tan, C. K., Gómez, G., Rios, Y, Guentzel, M.N, and Hudson, J. 1990. Case Study: Degradation of Diesel Fuel With In Situ Microorganisms. En Memorias de Superfund '90. Proceedings of the 11th National Conference, Noviembre 26-28, pp 776-779.

- Tavera S.G., 1985. Criterios para la interpretación y aprovechamiento de los reportes de laboratorio para las áreas de asistencia técnica. Serie: Temas didácticos. Publicación No. 3. Sociedad de la Ciencia del Suelo.
- Taylor, C., and Viraraghavan, T. 1999. A benchscale investigation of land treatment of soil contaminated with diesel fuel. *Chemosphere*. 39(10):1583-1593.
- Torres, J. 1997. Notas sobre Proceso del Crudo del 1 de Octubre de 1997 en los laboratorios de la Ex-refinería 18 de marzo, Azcapotzalco
- Troy, M. A., McGrinn, S. R., Greenwald, B. P, Jerger, D. E., and Allen, L. B. 1992. Bioremediation of Diesel Fuel Contaminated Soil at a Former Railroad Fueling Yard. En Kosteckí, P. T. and Calabrese, E. J. (Eds.) Contaminated Soils: Diesel Contamination. Lewis Publishers, Michigan.
- USEPA. Environmental Protection Agency . 1999. Landfarming Office of Underground Storage Tanks. EPA/542/R/96/601.
- USEPA. Environmental Protection Agency. 1996a. Environmental Protection Agency. Seminars series on bioremediation of hazardous waste sites: practical approaches to implementation. EPA/625/k-96/001.
- USEPA. Environmental Protection Agency. 1996b. SW- 846 Test Methods for Evaluating Soil Waste Physical/Chemical Methods. Tercera Revisión. Washington.
- USEPA. Environmental Protection Agency. 1997. United States Environmental Protection Agency: Federal Remediation Technologies Roundtable Data Base. En <http://www.frtr.gov/>
- Vázquez A.A. y Bautista A.N., 1993. Guía para la interpretación de análisis químico de suelo y agua, Depto. Suelos, Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Velázquez, A. y León, R. 1974. Comparación de métodos en la determinación de textura. VI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, Chapingo, México.

- Villegas, M. 1966. Física del suelo. Serie de apuntes No. 9, Colegio de Postgraduados, Escuela Nacional de Agricultura. Chapingo, México.
- Walker, J. D., and Colwell, R.R. 1976. Enumeration of petroleum-degrading microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.** 31 (2): 198 - 207.
- Walker, J.D., Colwell, R.R., and Petrakis, L. 1976. Biodegradation rates of componenets of petroleum. **Can J. Microbiol.** 22:1209-1213.
- Walworth, J. L. 1997. Bioremediation, water quality. United States Department of Agriculture. En <http://www.reusda.gov/impact/us97/arcv/AK-4d>.
- Walworth, J. L., Woolard, C. R., Braddock, J. F., and Reynolds, C.M. 1997a. The Role of soil nitrogen concentration in biorremediation. En In situ and On-Site Bioremediation: Memorias del Fourth International in situ and on-site bioremediation Symposium. New Orleans.
- Walworth, J. L., Woolard, C. R., Braddock, J. F., and Reynolds, C. M. 1997b. Enhancement and inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of fertilizer nitrogen: an approach to determining optimum levels. **J. Soil Contam.** 6 (5): 465-480.
- Walworth, J.L., and Reynolds, C. M. 1995. Bioremediation of a petroleum-contaminated crycic soil: effects of phosphorus, nitrogen , and temperature. **J Soil. Contam.** 4(3): 299-310.
- White, D.M., and Luong, H. 1997. Predicting diauxy during biorremediation in organic soil. En Memorias de International Symposium on Physics, Chemistry, and Ecology of Seasonally Frozen Soils, Fairbanks, Alaska. Junio 10 - 12.
- Wilson, J.J. 1999. Treatability testing of intrinsic bioremediation, biostimulation, and bioaugmentation of Diesel-oil contaminated soil at 5 °C. **J. Can. Pet. Technol.** 38 (13) Spec. Iss. 48.
- Wirdrig, D. L., and Manning, J. F. Jr. 1995. Biodegradation of No. 2 diesel fuel in the vadose zone: a soil column study. **Environ. Toxicol. and Chem.** 14 (11): 1813 - 1822.

- Wodzinski, R.S., and Johnson, M.J. 1968. Yields of bacterial cells from hydrocarbons. **Appl. Microbiol.** 16: 1886-1891.
- World Bank 1999. The World Bank and climate change. Executive Summary. Página de internet. <http://www.worldbank.org/html/extdr/climchnng/>
- Wright, A. L., Weaver, R. W., and Webb, J.W. 1996. Oil bioremediation in salt marsh mesocosms as influenced by N and P fertilization, flooding, and season. **Water, air, soil pollut.** 95 (1-4): 179-191.
- Ying, A. C., Balba, M. T., Shepsher, G., and Wright, D. 1992. Enhanced biodegradation of heavy oil in soil from railroad maintenance yard: phase II field demonstration. En Kostecki, P. T. and Calabrese, E. J. (Eds.) *Contaminated Soils: Diesel Contamination*. Lewis Publishers, Michigan.
- Zegarra, H., Rangel, A., Vilchis, J. Salgado, L, Vásquez, S. y Vilchis, J. 1994. Estudio de prefactibilidad para el establecimiento de una empresa de biorremediación de suelos contaminados por crudos. Proyecto Terminal - UAM-I.
- Zhou, E., and Crawford, R. L. 1995. Effects of oxygen, nitrogen, and temperature on gasoline biodegradation in soil. **Biodegradation.** 6: 127-140.

ANEXOS

Anexo 1. Idoneidad de los modelos

Etap. I

En la Figura 1. se observa que los residuos se ajustaron a la recta de la gráfica normal sin desviaciones graves que pusieran en riesgo al supuesto de **normalidad**. Los valores se encontraron centrados en el cero presentando valores tanto positivos como negativos.

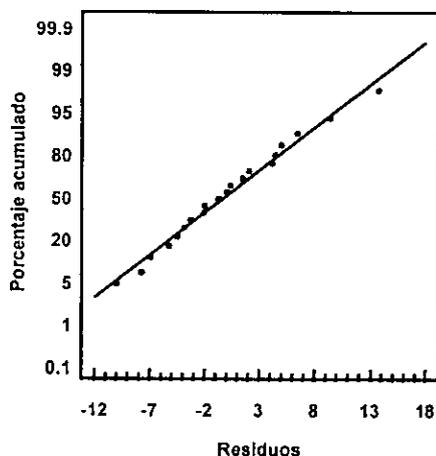


Figura 1. Gráfica de la probabilidad normal de los residuos para la Etapa I.

El supuesto de **independencia**, se observa en la Figura 2 que representa a la distribución de los residuos en función del orden en que se realizaron los análisis. Esta figura no muestra correlación entre los residuos. El orden de experimentación graficado se planteó de manera aleatoria desde el diseño del experimento.

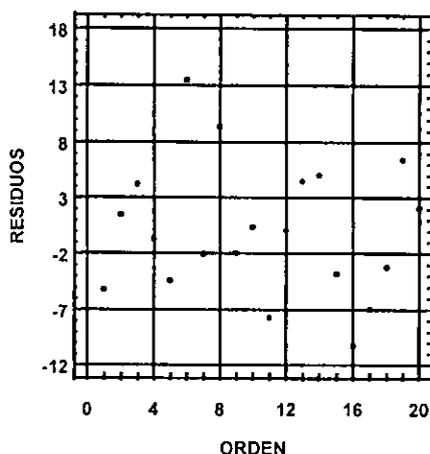


Figura 2. Gráfica de los residuos contra el orden temporal de análisis para la Etapa I.

La gráfica anterior no presentó patrón alguno, observándose una distribución tipo "mancha" de los residuales. Esto demostró que no existió una tendencia de los resultados por desgaste del equipo,

descalibración, falta en la preservación de la muestra y en general por cualquier decremento de la capacidad analítica (Montgomery, 1991). Tampoco se observó un una residuos más erráticos a través del periodo de cuantificación del porcentaje de biodegradación, observándose una variancia no variable.

En la gráfica de los residuos contra los valores predecidos (Figura 3) no se evidenció algún patrón que pusiera en peligro al supuesto de **homoscedasticidad** o de igualdad de variancia de los valores (Montgomery, 1991).

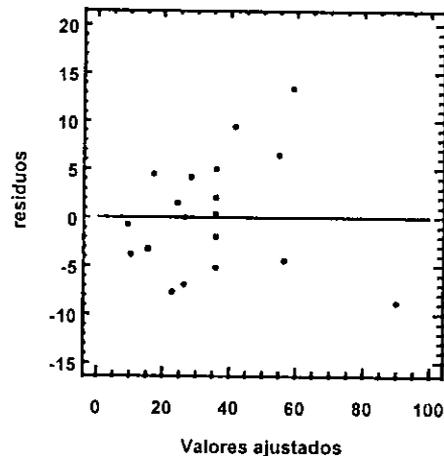


Figura 3. Gráfica de los residuos contra los valores ajustados (\hat{y}) para la Etapa I.

La Figura 3 no presentó curvaturas por lo que se evidenció que el modelo no requirió de más términos para los efectos considerados (Montgomery y Peck, 1982; y Freund y Wilson, 1996). Esta misma gráfica no reveló la presencia de una variancia variable, es decir un incremento de la distribución de los residuales por un mayor o menor porcentaje de biodegradación (Montgomery, 1991).

Las gráficas de los residuales contra los niveles de las variables de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos se muestran en la Figura 4. Estas corroboraron que no existió una desviación grave en el supuesto de igualdad de variancia.

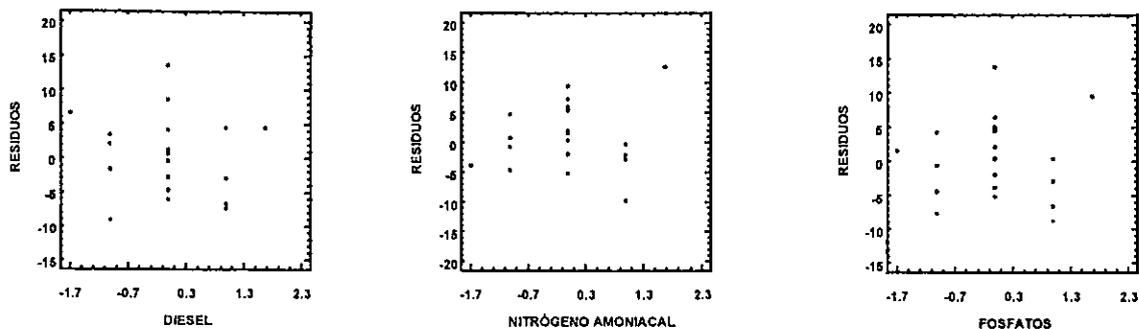


Figura 4. Gráficas de los residuos contra las variables para la Etapa I

Etapa 2

La gráfica de diagnóstico de los valores observados contra los predcidos permite visualizar la desviación del modelo con respecto a los valores reales del porcentaje de biodegradación. Si todos los datos se encontraran sobre la línea el ajuste sería del 100% con un coeficiente de determinación igual a uno, pero esto no es aplicable debido al término aleatorio inherente en los diseños experimentales (Montgomery y Peck, 1982).

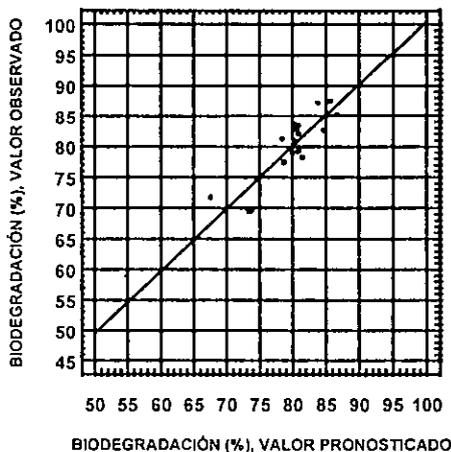


Figura 5. Respuesta observada y valores pronosticados por el modelo cuadrático obtenido para el Experimento IV.

El análisis de residuos mostró una adecuada **distribución normal**, con igual número de valores de residuos positivos como negativos y con un valor central cercano a cero (Figura 6).

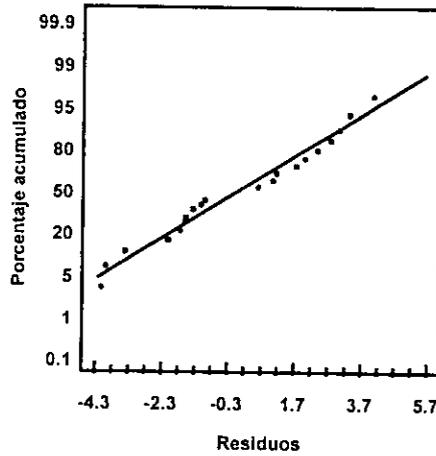


Figura 6. Gráfica de la probabilidad normal de los residuos para la Etapa II

En la Figura 7 se muestra la gráfica de los residuos contra los valores predcidos. Los residuos se ubicaron tanto con valores positivos como negativos sin una marcada tendencia que ponga en peligro a la **independencia** o una falta en la introducción de términos en el modelo.

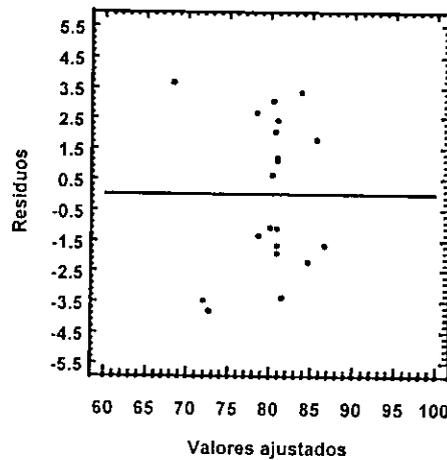


Figura 7. Gráfica de los residuos contra los valores ajustados (\hat{y}) para la Etapa II

Los residuos graficados contra el orden temporal de la realización del experimento demuestran que no existe razón alguna para suponer que no se cumple la suposición de **independencia** o de **variancia constante**, debido a que no existe patrón de disminución o de aumento de los residuos a través del tiempo.

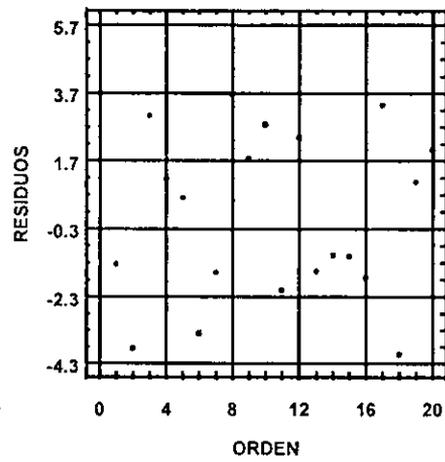


Figura 8. Gráfica de los residuos contra el orden temporal de análisis para la Etapa II

Los residuos graficados contra los niveles de las variables de diesel, nitrógeno amoniacal y fosfatos se muestran en la Figura 9. Ninguna de las tres gráficas revela algún problema con el supuesto de igualdad de variancia o **homoscedasticidad**.

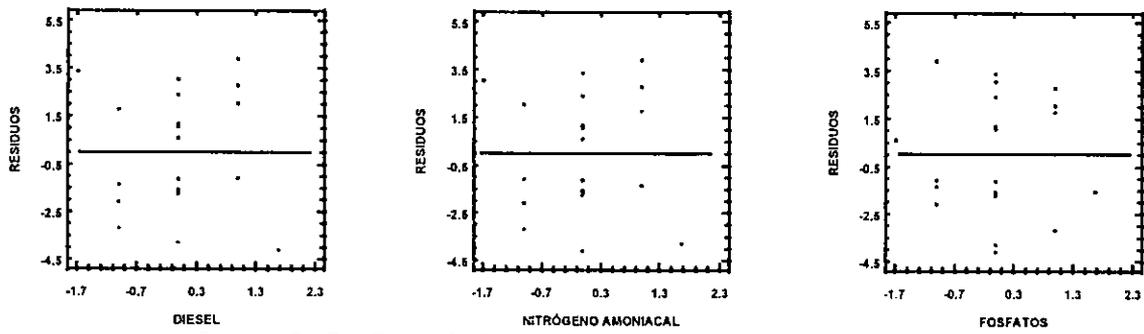


Figura 9. Gráficas de los residuos contra las variables para la Etapa II

ANEXO 2
ANÁLISIS DE VARIANCI A PARA LOS MODELOS DE REGRESIÓN

I. ETAPA I

I.1. Primer modelo

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \epsilon$$

I.1.1. Producción de CO₂

Tabla 1. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión (β_1, β_2 y β_3)	5196336.54	3	1732112.18	1.389
Residuo	13716966.21	11	1246996.929	
Total	18913302.75	14		

$F_{crítica} = 3.59$

Tabla 2. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	7759.758	288.328	26.913	2.17E-11
β_1	594.031	302.159	1.966	0.075
β_2	-164.306	302.159	-0.544	0.597
β_3	24.185	302.159	0.080	0.938

Coefficiente de determinación (R^2) = 0,275

I.1.2. Tasa de producción de CO₂

Tabla 3. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión (β_1, β_2 y β_3)	32796,773	3	10932,258	6.286
Residuo	19131,086	11	1739,190	
Total	51927,859	14		

$F_{crítica} = 3.59$

Tabla 4. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	304,859	10,768	28,312	1,25E-11
β_1	48,796	11,284	4,324	0,001
β_2	-1,668	11,284	-0,148	0,885
β_3	4,178	11,284	0,370	0,718

Coefficiente de determinación (R^2) = 0.632

I.1.3. Consumo de CO₂

Tabla 5. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión (β_1, β_2 y β_3)	14568692,21	3	4856230,737	1,407
Residuo	37963433,96	11	3451221,269	
Total	52532126,17	14		

F_{crítica} = 3.59

Tabla 6. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	9115,147	479,668	19,003	9,243E-10
β_1	1021,996	502,677	2,033	0,067
β_2	73,374	502,677	0,146	0,887
β_3	129,611	502,677	0,258	0,801

Coefficiente de determinación (R²) = 0,277

I.1.4. Tasa Consumo de CO₂

Tabla 7. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión (β_1, β_2 y β_3)	41173,621	3	13724,540	2,070
Residuo	72922,182	11	6629,289	
Total	114095,803	14		

F_{crítica} = 3.59

Tabla 8. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	414,969	21,023	19,739	6,152E-10
β_1	54,349	22,031	2,467	0,031
β_2	4,852	22,031	0,220	0,830
β_3	6,103	22,031	0,277	0,787

Coefficiente de determinación (R²) = 0,361

I.2. Segundo modelo

$$y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \epsilon$$

I.2.1. Producción de CO₂

Tabla 9. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión	15217693,51	9	1690854,835	2,288
Residuo	3695609,24	5	739121,848	
Total	18913302,75	14		

F_{crítica} = 4.77

Tabla 10. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	8311,873	854,746	9,724	1,954E-04
β_1	594,031	232,627	2,554	0,051
β_2	-164,306	232,627	-0,706	0,512
β_3	24,185	232,627	0,104	0,921
β_4	-303,245	303,958	-0,998	0,364
β_5	-224,068	303,958	-0,737	0,494
β_6	-208,173	303,958	-0,685	0,524
β_7	-786,715	349,410	-2,252	0,074
β_8	94,300	349,410	0,270	0,798
β_9	86,061	349,410	0,246	0,815

Coefficiente de determinación (R²) = 0,805

I.2.2. Tasa de producción de CO₂

Tabla 11. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión	48151,874	9	5350,208	7,085
Residuo	3775,985	5	755,197	
Total	51927,859	14		

F_{crítica} = 4.77

Tabla 12. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	301,985	27,322	11,053	1,056E-04
β_1	48,796	7,436	6,562	0,001
β_2	-1,668	7,436	-0,224	0,831
β_3	4,178	7,436	0,562	0,598
β_4	-11,740	9,716	-1,208	0,281
β_5	-9,025	9,716	-0,929	0,396
β_6	-9,195	9,716	-0,946	0,387
β_7	-22,140	11,169	-1,982	0,104
β_8	12,728	11,169	1,140	0,306
β_9	12,569	11,169	1,125	0,312

Coefficiente de determinación (R^2) = 0,927

I.2.3. Consumo O_2

Tabla 13. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Medio de cuadrados	Fo
Regresión	43070985,24	9	4785665,027	2,529
Residuo	9461140,93	5	1892228,186	
Total	52532126,17	14		

$F_{critica} = 4.77$

Tabla 14. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	10614,148	1367,621	7,761	5,681E-04
β_1	1021,996	372,211	2,746	0,041
β_2	73,374	372,211	0,197	0,851
β_3	129,611	372,211	0,348	0,742
β_4	-275,725	486,342	-0,567	0,595
β_5	-414,938	486,342	-0,853	0,433
β_6	-402,170	486,342	-0,827	0,446
β_7	-1522,037	559,067	-2,722	0,042
β_8	-97,086	559,067	-0,174	0,869
β_9	-27,136	559,067	-0,049	0,963

Coefficiente de determinación (R^2) = 0,820

I.2.4. Tasa de consumo O₂

Tabla 15. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _o
Regresión	96269,1417	9	10696,571	3,000
Residuo	17826,66167	5	3565,332	
Total	114095,8034	14		

F_{crítica} = 4.77

Tabla 16. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β ₀	479,574	59,365	8,078	4,709E-04
β ₁	54,349	16,157	3,364	0,020
β ₂	4,852	16,157	0,300	0,776
β ₃	6,103	16,157	0,378	0,721
β ₄	-12,125	21,111	-0,574	0,591
β ₅	-18,673	21,111	-0,884	0,417
β ₆	-17,935	21,111	-0,850	0,434
β ₇	-66,431	24,268	-2,737	0,041
β ₈	-3,881	24,268	-0,160	0,879
β ₉	-0,640	24,268	-0,026	0,980

Coefficiente de determinación (R²) = 0,844

I.3. Tercer modelo

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_1^2 + \epsilon$$

I.3.1. Producción de CO₂

Tabla 17. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _o
Regresión	13295234,326	2	6647617,163	14,199
Residuo	5618095,988	12	468174,666	
Total	18913330,314	14		

F_{crítica} = 3.89

Tabla 18. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β ₀	8539,163	254,491	33,554	3,118E-13
β ₁	594,041	185,152	3,208	7,515E-03
β ₂	-856,059	201,193	-4,255	1,118E-03

Coefficiente de determinación (R²) = 0,703

I.3.2. Tasa de producción de CO₂

Tabla 19. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión	44251,031	2	22125,516	34,573
Residuo	7679,534	12	639,961	
Total	51930,566	14		

$F_{\text{crítica}} = 3.89$

Tabla 20. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	333,852	9,409	35,482	1,605E-13
β_1	48,799	6,845	7,129	1,199E-05
β_2	-31,845	7,439	-4,281	1,067E-03

Coefficiente de determinación (R^2) = 0,852

I.3.3. Consumo de O₂

Tabla 21. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo
Regresión	39418744,654	2	19709372,327	18,036
Residuo	13113337,347	12	1092778,112	
Total	52532082,001	14		

$F_{\text{crítica}} = 3.89$

Tabla 22. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	10457,830	388,807	26,897	4,287E-12
β_1	1022,007	282,873	3,613	3,560E-03
β_2	-1474,737	307,380	-4,798	4,352E-04

Coefficiente de determinación (R^2) = 0,750

1.3.4. Tasa de consumo de CO₂

Tabla 23. Análisis de variancia para toda la regresión (ajuste del modelo)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	F _o
Regresión	88774,347	2	44387,174	21,036
Residuo	25320,134	12	2110,011	
Total	114094,481	14		

F_{crítica} = 3.89

Tabla 24. Análisis de variancia para el modelo ajustado

	Coefficientes	Error estándar	Estadístico t	Probabilidad
β_0	473,886	17,085	27,737	2,980E-12
β_1	54,350	12,430	4,373	9,082E-04
β_2	-64,712	13,507	-4,791	4,402E-04

Coefficiente de determinación (R²) = 0,778