

91



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"PRUEBAS DE BIOTRATABILIDAD DE AGUA SUBTERRANEA Y SUELO CONTAMINADOS CON MEZCLAS DE DIESEL Y GASOLINA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

ALMA GUADALUPE PROZUMAN LERMA



DIRECTOR DE TESIS: DRA. SUSANA SAVAL BOHORQUEZ





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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Pruebas de biotratibilidad de agua subterránea y suelo contaminados con mezclas de diesel y gasolina.

realizado por Guzmán Lerma Alma Guadalupe

con número de cuenta 9354885-4 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dra. Susana Saval Bohórquez

Propietario M. en C. Jorge Manuel Romero Jarero

Propietario Q.F.B. Irma Ruíz Silva

Suplente M. en C. Sergio Palacios Mayorga

Suplente Q.F.B. María Guadalupe Vélez Pratt

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología



Dra. Luisa Albarina Alba Lois
Coordinadora de la Licenciatura
Departamento de Biología

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

294302

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de la Coordinación de Bioprocesos Ambientales del Instituto de Ingeniería, bajo la dirección de la Dra. Susana Saval, fue realizado para Pemex Refinación dentro del convenio específico 9303.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres que sin su apoyo nunca hubiera llegado ha este momento, haber terminado algo tan importante.

A la Dra. Susana Saval Bohórquez por la oportunidad que me brindo para realizar este trabajo, gracias por su apoyo y dirección.

Al Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo brindado de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

A mis compañeras Mónica, Adriana y Lety que de algún modo contribuyeron para la conclusión de este trabajo.

A todos mis compañeros del Instituto por su apoyo y compañerismo.

A mis compañeros de comunidad que juntos hemos crecido tanto en lo humano como en lo espiritual y en lo intelectual, GRACIAS por su amistad.

DEDICATORIA

A mis padres

*Que fue el regalo más grande que Dios me ha dado,
por su entrega y paciencia para mi crecimiento y educación,
por su apoyo incondicional,
por su cariño y comprensión que me han dado,
por creer en mí,
De todo corazón gracias por ser los padres que son.*

A mis hermanos

*Isaías, María Isabel y María de los Ángeles por ser mis hermanos,
gracias por su ejemplo y apoyo que me han brindado para seguir adelante
ojala que siempre sigamos como hasta ahora
Unidos como una familia.*

A Dios

*Por que todo lo que tengo y soy, él me lo ha dado.
Antes de formarte en el seno de tu madre,
Ya te conocía; antes de que tú nacieras, yo te consagré,
Y te destiné a ser profeta de las naciones.*

Jer 1, 4-10

A mi abuela.... †

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO	i
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
III. MARCO TEÓRICO	4
A. DEFINICIÓN DE SUELO	4
1. Descripción del suelo	5
2. Funciones del suelo	6
B. MICROFLORA DEL SUELO	7
1. Bacterias	7
2. Influencia del medio ambiente	8
a. Temperatura	8
b. Humedad	8
c. Aireación	9
d. Acidez y alcalinidad	9
C. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES	10
1. Carbono, hidrógeno	11
2. Nitrógeno	12

3. Fósforo	13
4. Azufre	14
5. Oxígeno	14
D. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS EN EL SUELO	15
1. Población bacteriana del suelo	16
2. Degradación por acción de bacterias	17
E. LIMPIEZA DE SUELOS Y ACUÍFEROS	19
1. Biorremediación	19
2. Pruebas de biotratibilidad	19
3. Tecnologías de biorremediación	20
a. Bioestimulación	21
b. Bioaugmentación	21
c. Bioventeo	22
d. Biolabranza	22
 IV. ANTECEDENTES	 24
A. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL	24
 V. METODOLOGÍA	 29
A. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
B. DESARROLLO EXPERIMENTAL	30
1. Caracterización del suelo "A" y pruebas de biotratibilidad en charolas ...	30
2. Obtención del inóculo inicial	31
3. Tratamiento de agua subterránea	33
4. Tratamiento de suelo a nivel piloto	33
C. TÉCNICAS ANALÍTICAS	35
1. Humedad	35
2. pH	36
3. Materia Orgánica	36

4. Fósforo	36
5. Nitrógeno	36
6. Cuenta total de bacterias heterótrofas	36
7. Cuenta de bacterias degradadoras	37
8. Cuantificación de gasolina y diesel	37
9. Identificación de cepas	37
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
A. Caracterización del suelo A	38
B. Pruebas de biotratabilidad del suelo A en charolas	39
C. Características del suelo B en el sitio contaminado	41
D. Biotratamiento de agua subterránea contaminada con diesel	45
E. Biorremediación del suelo B a escala de demostración	51
CONCLUSIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXO	vi

LISTA DE TABLAS

V.1. Características de los cultivos	35
VI.1. Caracterización de la muestra de suelo A	39
VI.2. Resultados obtenidos en los diferentes lotes de agua subterránea contaminada sometida a biotratabilidad	46
VI.3. Análisis de hidrocarburos del suelo B	52

LISTA DE FIGURAS

III.1. Volúmenes relativos de los componentes del suelo (Thompson, 1982)	5
V.1. Obtención del inóculo inicial de bacterias degradadoras de diesel	32
V.2. Obtención de inóculos para biotratamiento de los diferentes lotes de agua subterránea y suelo contaminados	34
VI.1. Evolución de la degradación de diesel durante las pruebas de tratabilidad	40
VI.2. Evolución de los perfiles cromatográficos de diesel en el suelo A durante las pruebas de biotratabilidad	42
VI.3. Perfil de pH del suelo B en el sitio contaminado	43
VI.4. Perfil de la concentración de diesel en el sitio contaminado	44
VI.5. Perfiles cromatográficos de estándares de diesel y gasolina	48
VI.6. Perfil cromatográfico de muestras de agua subterránea del lote 2, (A) inicial, (B) a 5 días de tratamiento	49
VI.7. Perfiles cromatográficos de la muestra de agua subterránea del lote 3, (A) inicio del cultivo, (B) a 8 días del biotratamiento	49
VI.8. Perfil cromatográfico de las muestras de agua subterránea iniciales del lote 4 (A) y 5 (B)	50
VI.9. Vista en campo de las actividades de biorremediación del suelo B	52
VI.10. Perfiles cromatográficos del suelo B, (A) inicio del tratamiento, (B) después del tratamiento	53

LISTA DE TABLAS

V.1. Características de los cultivos	35
VI.1. Caracterización de la muestra de suelo A	39
VI.2. Resultados obtenidos en los diferentes lotes de agua subterránea contaminada sometida a biotratabilidad	46
VI.3. Análisis de hidrocarburos del suelo B	52

LISTA DE FIGURAS

III.1. Volúmenes relativos de los componentes del suelo (Thompson, 1982)	5
V.1. Obtención del inóculo inicial de bacterias degradadoras de diesel	32
V.2. Obtención de inóculos para biotratamiento de los diferentes lotes de agua subterránea y suelo contaminados	34
VI.1. Evolución de la degradación de diesel durante las pruebas de tratabilidad	40
VI.2. Evolución de los perfiles cromatográficos de diesel en el suelo A durante las pruebas de biotratabilidad	42
VI.3. Perfil de pH del suelo B en el sitio contaminado	43
VI.4. Perfil de la concentración de diesel en el sitio contaminado	44
VI.5. Perfiles cromatográficos de estándares de diesel y gasolina	48
VI.6. Perfil cromatográfico de muestras de agua subterránea del lote 2, (A) inicial, (B) a 5 días de tratamiento	49
VI.7. Perfiles cromatográficos de la muestra de agua subterránea del lote 3, (A) inicio del cultivo, (B) a 8 días del biotratamiento	49
VI.8. Perfil cromatográfico de las muestras de agua subterránea iniciales del lote 4 (A) y 5 (B)	50
VI.9. Vista en campo de las actividades de biorremediación del suelo B	52
VI.10. Perfiles cromatográficos del suelo B, (A) inicio del tratamiento, (B) después del tratamiento	53

RESUMEN

El saneamiento de suelos y acuíferos contaminados mediante el uso de microorganismos se ha perfilado, en la práctica, como una de las mejores opciones desde los puntos de vista ambiental y económico. Previa a la aplicación de la biorremediación, es conveniente llevar a cabo estudios de biotratibilidad, con la finalidad de analizar el potencial de aplicación de la biorremediación para un sitio específico y las condiciones bajo las cuales se debe realizar. Tomando como base lo anterior, el presente trabajo, se enfocó principalmente a realizar pruebas de biotratibilidad, a nivel piloto, para reducir el contenido de diesel y gasolina en agua subterránea y suelo contaminados. El estudio se realizó en una instalación de almacenamiento de combustibles localizado dentro de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. Diferentes lotes de agua subterránea conteniendo combustible en fase libre a concentraciones de 20,000 mg/l aproximadamente, se inocularon con un cultivo mixto de bacterias degradadoras de diesel. Los experimentos se realizaron en recipientes de teflón de 20 litros de volumen total, se adicionaron fuentes de nitrógeno amoniacal y de fosfatos y se suministró aire en el fondo del recipiente con ayuda de una pequeña bomba. Se dió seguimiento al pH, así como a la concentración inicial y final de hidrocarburos a través de análisis cromatográfico. Los resultados obtenidos indicaron una disminución en la concentración inicial de los hidrocarburos que, en promedio, fue de 1,141 mg/l, lo cual confirmó la presencia de la actividad biodegradadora, los cultivos obtenidos se utilizaron como inóculo para la biorremediación del suelo contaminado al cual también se le adicionaron fuentes de amonio y fosfatos en forma de fertilizantes. Después de 2 meses de constante riego y homogenización del suelo, se observó que la concentración inicial de diesel, de (6256 mg/kg) y de gasolina de (313 mg/kg), se redujo a 99.77% y 100%, respectivamente.

I. INTRODUCCIÓN

Cuando ocurre un derrame de combustibles en la superficie del suelo, una parte de los hidrocarburos se volatiliza, otra se adsorbe en el suelo o migra hacia el subsuelo y se disuelve en el agua subterránea o permanece en fase libre flotando sobre el nivel del agua.

Como una alternativa de solución para la descontaminación de suelos y acuíferos contaminados, se ha dado un gran impulso a las tecnologías de biorremediación, las cuales se basan en la utilización de microorganismos capaces de transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos, como el bióxido de carbono. En los suelos existe una importante diversidad microbiana autóctona que puede aclimatarse de manera natural a los contaminantes, dando como resultado una actividad biodegradadora que se ve estimulada cuando están presentes otros nutrimentos básicos como son nitrógeno y fósforo.

En las tecnologías de biorremediación se aprovecha la capacidad de aclimatación que los microorganismos han logrado desarrollar bajo las condiciones que imperan en un lugar contaminado. Dichas condiciones pueden llegar a ser adversas para su supervivencia, sin

embargo, las diferentes poblaciones se adaptan entre sí organizando su interacción para actuar de manera conjunta, con lo cual se logra la degradación del compuesto contaminante.

Cada caso de contaminación de suelo y agua subterránea debe tratarse de manera particular, con la finalidad de plantear las estrategias adecuadas a las condiciones específicas. Es por eso que, durante la ejecución de proyectos de contaminación de suelo y su biorremediación, la caracterización es la actividad más importante seguida de las pruebas de biotratabilidad a partir de las cuales se obtienen datos reales para plantear, en el laboratorio, las estrategias que puedan ser llevadas a cabo en escala real.

La base de las tecnologías de biorremediación es la biodegradación de los compuestos contaminantes de ahí que, en el caso de aplicar un tipo de biorremediación, las pruebas de biotratabilidad adquieran una mayor importancia, ya que es necesario comprobar previamente si las características del lugar conforman un microambiente adecuado para la actividad de las bacterias que están expuestas a los hidrocarburos contaminantes.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

Realizar pruebas de biotratibilidad a nivel piloto para el saneamiento de agua subterránea y suelo contaminados con mezclas de diesel y gasolina.

Objetivos Particulares

- Determinar la capacidad de la flora microbiana nativa del suelo para degradar los hidrocarburos presentes.
- Promover el desarrollo de bacterias degradadoras en agua subterránea conteniendo hidrocarburos en fase libre.
- Dar seguimiento a la biodegradación de los hidrocarburos presentes en agua subterránea y suelo.

III. MARCO TEÓRICO

A. DEFINICIÓN DE SUELO

Desde el punto de vista científico-tecnológico, el suelo se puede definir como el material no consolidado y superficial de la corteza terrestre, que ha sido formado mediante una dinámica natural o a partir de la corteza terrestre con la influencia de factores ambientales (Saval, 1995).

Otros conceptos que se manejan son: como un medio para el crecimiento vegetal, la relación entre suelo y plantas ha sido reconocida en los medios agronómicos, aquí el concepto de suelo se maneja como un medio para el crecimiento de las plantas; el suelo como un cuerpo natural organizado, en este caso el suelo se considera un complejo renovable de materias vivas, partículas de rocas combinadas con materia orgánica, aire y agua (Palacios y Gama, 1994).

Es necesario considerar al suelo como un cuerpo tridimensional que conforma el hábitat de miles de especies microbianas y plantas superiores y que, por lo tanto, desempeña un papel trascendental en los ciclos biogeoquímicos, hidrológico, en la cadena alimenticia, así como el de constituirse como medio filtrante en el proceso de recarga de los acuíferos que constituyen la fuente de abastecimiento de agua (Deyta. 1999).

1. Descripción del suelo

El suelo está formado por cinco componentes principales: materia mineral, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos. La cantidad de estos constituyentes no es la misma en todos los suelos sino que varía con la localidad, Figura III.1.

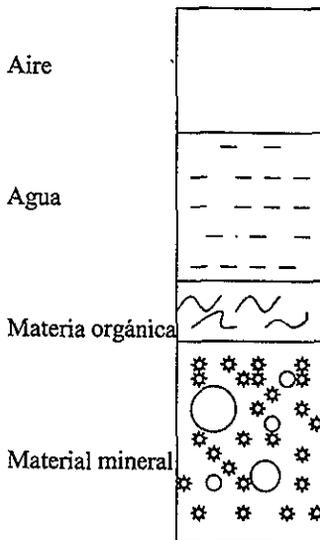


Figura. III.1. Volúmenes relativos de los componentes del suelo (Thompson, 1982).

La cantidad de materia orgánica y mineral, que forma parte de la porción inanimada es relativamente constante; sin embargo, la proporción de aire y agua varía. El aire y el agua juntos representan, aproximadamente, la mitad del volumen del suelo; dicho volumen se denomina espacio poroso. La fracción mineral que, generalmente, contribuye con poco menos de la mitad del volumen, se origina de la desintegración y descomposición de las rocas, modificándose con el transcurso del tiempo. Por lo general, la materia orgánica constituye del 3 al 6% del total. La porción viviente del suelo (incluyendo la fauna edáfica y los microorganismos) constituye menos del 1% del volumen total; aun así, esta porción es, indudablemente, esencial para la producción de cultivos y la fertilidad del suelo. La porción inorgánica del suelo tiene un notable efecto sobre los habitantes microbianos, debido a su influencia sobre la disponibilidad de nutrientes, aireación y retención de agua. (Alexander, 1980).

2. Funciones del suelo

El suelo tiene diversas funciones como son: filtro amortiguador y transformador, productor de alimentos, hábitat biológico y reserva genética, medio físico para la construcción, fuente de materias primas y herencia cultural.

Suelo y subsuelo son el filtro que limpia el agua de lluvia que recarga los acuíferos y que los protege contra la contaminación. Durante su recorrido, el agua de lluvia arrastra compuestos, los cuales son retenidos en el subsuelo, es lo que se denomina capacidad amortiguadora.

Como productor de alimentos, el suelo es la base para la vida del hombre y los animales, permite la implantación de las raíces de las plantas, les proporciona agua y elementos nutritivos. El suelo desempeña también una importante función como hábitat biológico y reserva genética. Se pueden desarrollar gran cantidad de vegetales y animales que forman parte de la cadena alimentaria y constituyen la riqueza de la biodiversidad.

Para la construcción, el suelo es el soporte de las edificaciones, viviendas, industrias, lugares de recreación, sistemas de transporte o sitios para la disposición de residuos así como, también, alberga una importante herencia cultural, representada por tesoros arqueológicos y paleontológicos (Saval, 1995).

B. MICROFLORA DEL SUELO

La vida en el suelo es asombrosamente diversa; va desde organismos microscópicos constituidos por una sola célula hasta animales que hacen madrigueras.

La microflora del suelo consiste, en su mayor parte, de bacterias, (el promedio se calcula hasta en mil millones por gramo de suelo, 10^9 bacterias/g), además de actinomicetos, hongos y algas, cada uno con funciones distintas y características específicas. La densidad de población de la microflora puede variar mucho de un lugar a otro y de una estación a otra en un año.

Entre la microflora del suelo encontramos:

- Bacterias saprófitas
- Actinomicetos
- Hongos y levaduras
- Algas

1. Bacterias

Las bacterias del suelo pueden clasificarse, en forma general, en dos grandes grupos basándose en sus requerimientos de energía: bacterias heterótrofas, que obtienen su energía y carbono de las sustancias orgánicas complejas y bacterias autótrofas, que obtienen su energía de la oxidación de elementos o compuestos inorgánicos, el carbono del dióxido de carbono y el nitrógeno y otros

minerales de los compuestos inorgánicos. La mayor parte de las bacterias del suelo son aerobias, es decir requieren oxígeno del aire presente en el suelo. Algunas de estas bacterias se pueden adaptar a vivir donde el oxígeno este limitado, estas son las aerobias facultativas. Otras bacterias son anaerobias, es decir, no pueden sobrevivir en presencia del oxígeno. Las bacterias del suelo también difieren en su nutrición y en su respuesta a las condiciones ambientales.

Consecuentemente, la biodiversidad y abundancia de las bacterias depende tanto de los nutrimentos asimilables presentes, como de las condiciones ambientales del suelo.

2. Influencia del ambiente

Las condiciones del ambiente determinan la naturaleza de la población microbiana presente en un tiempo dado en el suelo. En general, los suelos fértiles, de textura fina y ricos en materia orgánica, contienen muchos más organismos que los suelos de textura gruesa y pobres en materia orgánica.

a. Temperatura

La temperatura regula las velocidades de reacción de los cambios biológicos y bioquímicos que ocurren en el suelo. De manera general, los límites de las funciones microbianas tienen como límite máximo una temperatura de 80°C. Para la mayoría de los organismos del suelo, la temperatura óptima es de cerca de 35°C, aunque pueden crecer en una variación amplia de temperaturas y pueden adaptarse rápidamente a cambios graduales.

b. Humedad

Otro factor principal que afecta el número y las actividades de los microorganismos del suelo es la humedad del mismo. La influencia de la humedad depende, en gran parte, de la naturaleza del suelo y de la naturaleza de los organismos que en él se encuentran. La cantidad óptima de agua

para la mayoría de los organismos del suelo está entre 50 y 70% de la capacidad de retención de agua del suelo, casi la misma que para la mayoría de las plantas superiores. La mayor parte de los organismos son aerobios y tal vez sólo unas cuantas bacterias (aerobias facultativas) pueden tolerar suelos saturados con agua.

c. Aireación

La aireación del suelo está gobernada por las fluctuaciones en la humedad del suelo. La aireación aumenta cuando disminuye la humedad del suelo, mientras que un exceso de agua tiende a favorecer las condiciones anaerobias. El desarrollo y las actividades de los organismos del suelo se ven afectados por la concentración y grado de aprovisionamiento de ciertos gases del aire (en particular oxígeno, bióxido de carbono y nitrógeno).

El oxígeno se necesita para los procesos de oxidación, el bióxido de carbono como fuente de carbono para los organismos autótrofos y el nitrógeno para los organismos fijadores de nitrógeno. La abundancia de oxígeno favorece las actividades de los formadores de nitritos y nitratos, a los fijadores de nitrógeno, a los hongos, actinomicetos y otros organismos que oxidan la materia orgánica.

La aireación pobre favorece los procesos de reducción y la acumulación de materia orgánica del suelo debida a la descomposición restringida de ésta.

d. Acidez y alcalinidad

El grado de acidez y alcalinidad de los suelos es de importancia particular ya que tiene influencia en las actividades y en la abundancia relativa de los diferentes grupos de organismos del suelo. Generalmente, los organismos benéficos (degradadores de materia orgánica, fijadores de nitrógeno) funcionan mejor en un suelo que tiene un pH neutro. Como regla general, los actinomicetos prefieren una reacción de 7.0 a 7.5, las bacterias y los protozoarios de 6.0 a 8.0 y

los hongos de 4.0 a 8. Los organismos nitrificantes también son muy sensibles a condiciones de acidez elevada.

La tolerancia de los organismos del suelo a la acidez está influenciada, considerablemente, por otras condiciones como son el aprovisionamiento de nutrimentos, temperatura y contenido de humedad favorables (Foth, 1981).

C. REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES

La distribución de los microorganismos en el suelo está determinada en gran parte por la presencia de nutrimentos. Por lo general, los microorganismos requieren de un sustrato, el cual se encuentra en mayor abundancia en la materia orgánica del suelo superficial, en la rizosfera.

La mayoría de ellos necesitan una temperatura óptima en el intervalo de 25 a 30°C, pero difícilmente la temperatura del suelo la alcanza, por lo que la mayoría de las especies operan por abajo de su óptimo (Patrick, 1987).

Para su crecimiento y desarrollo, los microorganismos requieren del suministro de energía además de algunos elementos esenciales como son: carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio y azufre. Entre los organismos más importantes del suelo están los que obtienen su energía de la oxidación de sustancias inorgánicas simples y complejas. Sin embargo, para la gran mayoría de los organismos, la materia orgánica del suelo es la principal fuente de energía y nutrimentos (Foth, 1981).

Los microorganismos requieren, para sobrevivir y reproducirse:

- Una fuente de energía para las reacciones bioquímicas
- Un aceptor final de electrones
- Una fuente de carbono para síntesis del nuevo material celular

- Elementos inorgánicos como nitrógeno y fósforo para la síntesis de macromoléculas
- Azufre, potasio, calcio y magnesio como reguladores de la actividad microbiana (Saval, 1998).

1. Carbono, hidrógeno. Estos elementos frecuentemente se hacen accesibles al microorganismo en un mismo compuesto y, por consiguiente, se consideran en conjunto.

Forman la gran masa del peso seco de los microorganismos, de modo que, para que haya crecimiento, debe haber en el medio unos compuestos utilizables que contengan estos elementos en concentraciones relativamente elevadas (generalmente entre el 0.2 y el 1.0 por 100).

Solo unos cuantos microorganismos pueden utilizar o fijar el más sencillo de los compuestos de carbono, el bióxido de carbono.

Es extraordinariamente grande el número de compuestos orgánicos que pueden ser utilizados como fuente de carbono por los microorganismos heterótrofos. Esto explica el importante papel que los microorganismos desempeñan en los ciclos naturales de los elementos, y no sólo del carbono, sino también del nitrógeno, del azufre y del fósforo, de modo que estos elementos pueden ser utilizados una y otra vez para sustentar la vida de otros organismos.

Los carbohidratos son las fuentes de carbono más fácilmente degradables, un número mucho menor de microorganismos utilizan como fuentes de carbono y energía otros compuestos orgánicos, por ejemplo, los géneros *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Streptomyces*, *Corynebacterium* y *Mycobacterium*, han mostrado la capacidad de oxidar diversos hidrocarburos.

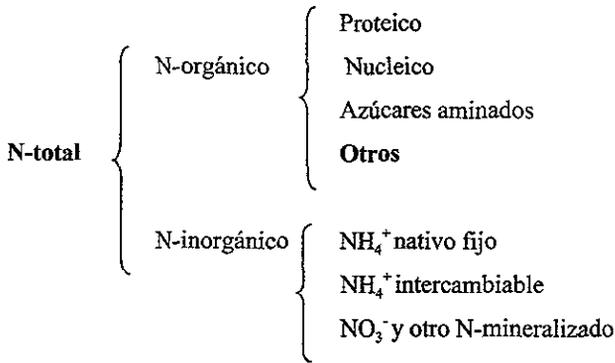
La capacidad de utilizar compuestos que poseen anillos aromáticos en su estructura esta más estudiada entre las *Pseudomonas*. En general, la degradación de los compuestos aromáticos sucede en condiciones aerobias, mientras que en los lugares en donde estos compuestos se han acumulado en condiciones anaerobias, suelen permanecer sin descomponerse, tal es el caso de la lignina.

2. **Nitrógeno.** Comúnmente, el nitrógeno orgánico representa entre el 85 y 95% del nitrógeno total y alrededor del 14 % del peso seco de la mayoría de los microorganismos. Es un constituyente de las proteínas y de los ácidos nucleicos, así como de algunos metabolitos esenciales, de manera que todos los seres vivos requieren una fuente de este elemento. La forma de nitrógeno que utilizan los microorganismos depende de su capacidad metabólica y del ambiente en que se encuentran. En general, todos los microorganismos pueden usar nitrógeno amoniacal (NH_4^+) como fuente de nitrógeno, porque esta forma es la que se incorpora en la biosíntesis. La mayoría de los microorganismos pueden obtener nitrógeno amoniacal a partir de una variedad de compuestos orgánicos, incluidos los aminoácidos, y algunos pueden utilizar formas inorgánicas, entre las que se incluye el ion nitrato (NO_3^-). Algunos organismos pueden fijar el nitrógeno atmosférico (N_2); éstos prosperan en ambientes en los que el nitrógeno es el nutrimento limitante (Ingraham, 1998).

Las cantidades de nitrógeno presentes en los suelos están controladas, especialmente, por las condiciones climáticas y la vegetación; estas últimas inciden también en las condiciones locales de la topografía, en el material parental, en las actividades del hombre y en el tiempo que estos factores han actuado sobre el suelo.

Estudios realizados sobre la distribución de nitrógeno en el perfil del suelo indican que éste disminuye con la profundidad. Las diferencias en el contenido y en la distribución de nitrógeno en el perfil del suelo se explican por los factores antes considerados como: clima, vegetación y topografía. La acumulación de nitrógeno en los primeros decímetros del suelo es el resultado de la actividad biológica. Por un lado, a través del proceso de la humificación se producen componentes nitrogenados que son incorporados al suelo por los microorganismos y, por otro lado, las raíces finas al morir, se humifican en el suelo e incorporan nitrógeno.

Las formas de nitrógeno presentes en los suelos, según Bohn (1993) podrían agruparse de la siguiente manera:



En formas inorgánicas, el nitrógeno se presenta como óxido nitroso (N₂O), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO₂) y amoníaco (NH₃), en cantidades mínimas casi no detectables; además, como amonio (NH₄⁺), nitrito (NO₂⁻) y nitrato (NO₃⁻). Por lo general, estas formas inorgánicas constituyen sólo hasta el 2% del N total del suelo (Fassbender, 1987).

Los compuestos orgánicos nitrogenados pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno por los microorganismos amonificantes que pueden degradar estos compuestos hasta amoníaco. Muchos aminoácidos pueden ser desaminados por los microorganismos y, en general, son excelentes fuentes de nitrógeno para el crecimiento microbiano.

3. Fósforo. Este elemento se halla en los organismos vivos en forma de iones fosfato, y principalmente, como pentosa fosfato en los nucleótidos y ácidos nucleicos. Ya que estos compuestos comprenden componentes celulares tan importantes como el ADN, el ARN y el ATP, es evidente que el fósforo desempeña un importante papel en el metabolismo celular. Constituye alrededor del 3% del peso seco de los microorganismos, es un constituyente indispensable de los fosfolípidos y de otros metabolitos esenciales.

El fósforo es el nutriente limitante en algunos cuerpos de agua, de manera que cuando se vierten detergentes fosfatados en estos sistemas se produce eutroficación, que es el aumento exagerado en el desarrollo de algas y de otros organismos (Ingraham, 1998).

La cantidad de fósforo disponible en los suelos depende de las propiedades edáficas (pH, textura, etc) y de las condiciones ambientales; disminuye conforme se reduce el contenido de la materia orgánica del suelo (Fassbender. 1987).

Para que un microorganismo se desarrolle, es indispensable la presencia de fósforo, preferentemente en forma inorgánica. Los medios químicamente definidos contienen, con frecuencia, fosfatos como sustancias amortiguadoras; así, los fosfatos potásicos (KH_2PO_4 y K_2HPO_4) en concentraciones adecuadas, pueden mantener el pH del medio entre 4.5 y 8.0.

4. Azufre. Es un constituyente minoritario pero esencial para la célula; constituye alrededor del 1% del peso seco de la mayoría de las células (Ingraham. 1998). La principal reserva del elemento en el suelo está en la fracción orgánica y sólo puede obtenerse mediante la descomposición biológica, en donde los microorganismos son los únicos agentes que convierten los compuestos inorgánicos a formas orgánicas útiles.

El azufre, en sus variadas formas orgánicas e inorgánicas, es metabolizado fácilmente en el suelo. El hecho de que predomine una u otra transformación está determinado, en gran parte, por las circunstancias ambientales que afectan la composición y abundancia de la microflora (Alexander, 1994).

5. Oxígeno. Todos los microorganismos requieren oxígeno elemental para fabricar sus componentes bioquímicos, pero no todos los microorganismos requieren oxígeno atmosférico. La mayoría de los microorganismos heterótrofos obtienen el oxígeno a partir de la misma molécula que les sirve como fuente de carbono.

Los autótrofos, que generan energía a partir de la luz, obtienen la mayor parte de su oxígeno a partir del CO_2 fijado durante la fotosíntesis (Ingraham, 1998).

Aunque casi todas las plantas y animales superiores dependen del suministro de oxígeno molecular, no se puede decir lo mismo de los microorganismos. Las bacterias principalmente presentan una respuesta amplia y variable al oxígeno libre, por lo que existen bacterias aerobias, que se desarrollan en presencia de oxígeno libre, bacterias anaerobias, que se desarrollan en ausencia de oxígeno libre, bacterias anaerobias facultativas, que se desarrollan en cualquier ambiente, y bacterias microaerófilas, que crecen en presencia de pequeñísimas cantidades de oxígeno (Pelczar, 1991).

A diferencia de lo que ocurre con los demás nutrimentos, el oxígeno molecular es relativamente insoluble en agua, de manera que tiene que ser suministrado de forma continua a los microorganismos aerobios para que éstos crezcan. Los microorganismos que crecen, de modo aerobio, en cultivos líquidos dependen del oxígeno disuelto en el medio suplementado por la pequeña cantidad absorbida de la atmósfera durante la incubación. Esta cantidad de oxígeno, frecuentemente, es insuficiente para satisfacer la demanda de los microorganismos los cuales, por consiguiente, van estando en condiciones progresivamente limitantes. Esta escasez de oxígeno depende en cierta medida de la temperatura de incubación, ya que la solubilidad del oxígeno en el agua crece a medida que la temperatura disminuye, por lo que los organismos que se cultivan a temperaturas bajas no tendrán tan limitada su disponibilidad a diferencia de los que se incuban a altas temperaturas.

Para incrementar la disponibilidad de oxígeno para los microorganismos que crecen en cultivos líquidos, se utilizan agitación o burbujeo de aire estéril o directamente de oxígeno (Rose, 1977).

D. IMPORTANCIA DE LAS BACTERIAS EN EL SUELO

Pocos ambientes tienen la biodiversidad de microorganismos como el suelo, es una mezcla microscópica, formada por millones de bacterias, hongos, protozoos y virus. Debido a la gran variedad de microorganismos que alberga el suelo, ningún método por sí mismo, puede revelar la población microbiana total absoluta en el suelo.

La composición de los suelos es diferente, lo que produce grandes diferencias en la densidad de la población microbiana y en la clase de microorganismos que forman esta población. Estas condiciones que pueden influir en el desarrollo de los microorganismos son: cantidad y tipo de sustancias nutritivas, humedad, grado de aireación, temperatura y pH.

Las bacterias sobresalen, en forma especial en los suelos debido a que es el grupo de microorganismos más abundante, (Alexander, 1980; Pelczar, 1991).

1. Población bacteriana del suelo

El número de bacterias presentes en el suelo es variable ya que muchas condiciones afectan profundamente su desarrollo. En general, la mayor población radica en los horizontes superficiales, según las condiciones de temperatura, humedad, aireación y alimento. La cantidad de bacterias en un suelo es muy grande, teniendo una densidad normal de 10^7 a 10^9 bacterias por gramo de suelo (Wild, 1992).

En el suelo, las bacterias aparecen como masas amorfas o filamentosas, llamadas colonias, sobre o alrededor de las partículas del suelo, donde el alimento y otras condiciones sean favorables para su desarrollo.

Muchas de las bacterias del suelo pueden producir esporas o cuerpos resistentes, representando así un estadio vegetativo y latente. Esta última capacidad es importante por permitir que los organismos sobrevivan más fácilmente bajo condiciones desfavorables (Buckman, 1991).

Las bacterias del suelo pueden colocarse en dos grupos: las especies nativas o autóctonas que son residentes verdaderos y los organismos invasores o alóctonos. Las poblaciones nativas pueden presentarse en estados resistentes y perduran por largos períodos sin tener actividad metabólica, pero, en determinado momento, estas formas nativas proliferan y participan en las funciones bioquímicas de la comunidad. Las especies alóctonas, por el contrario, no participan de manera

significativa en las actividades de la comunidad. Entran con la precipitación, en tejidos enfermos, estiércol o aguas negras y pueden permanecer por algún tiempo como formas inactivas e incluso crecer por períodos cortos, pero nunca contribuyen, en forma significativa, en las transformaciones o interacciones ecológicas. Entre las poblaciones nativas hay especies bacterianas que se desarrollan considerablemente cuando se agregan nutrimentos orgánicos fácilmente degradables. Estas bacterias de gran actividad metabólica necesitan ser provistas de nutrimentos para un crecimiento rápido, pero el abasto se consume fácilmente; por lo que responden de inmediato a la adición de sustancias y se mantienen en gran número mientras haya nutrimentos disponibles, y disminuyen una vez que se agota su fuente alimenticia (Alexander, 1994 b).

Las bacterias autótrofas obtienen su energía de la oxidación de los constituyentes minerales como NH_4 , S y Fe, y la mayor parte de su carbono, del CO_2 . En cifras son comparativamente insignificantes, pero al incluir los organismos que producen la nitrificación y oxidación del azufre son enormemente importantes para el sustento de las plantas superiores.

Muchas bacterias del suelo, son heterótrofas, toman su energía y carbono directamente de la materia orgánica del suelo. En la línea general de la descomposición, las bacterias amoniacales así como los hongos y actinomicetos, tienen un carácter heterótrofo (Buckman, 1991).

2. Degradación por acción de bacterias

Se sabe que muchos microorganismos son agentes causantes de enfermedades, sin embargo, juegan un papel muy importante en la biosfera sobre la cual viven. Están íntimamente asociados con cada uno de sus componentes e influyen significativamente, en la composición y calidad de estos ambientes. También ayudan a la biodegradación tanto de la materia orgánica como de contaminantes ambientales, en la eficiente utilización de las fuentes naturales limitantes y en las transformaciones de cada sustancia química que puede ser usada por otros organismos, aunque algunos pueden excretar productos que son perjudiciales a la biósfera (Lim, 1998).

Dentro de los contaminantes más comunes que se encuentran en el ambiente están los hidrocarburos, los cuales pueden servir como una fuente de carbono y energía a ciertos géneros de microorganismos incluyendo *Pseudomonas*, *Nocardia* y *Streptomyces*. Estos microorganismos pueden ayudar a la descontaminación de derrames de combustibles en el suelo, situación que es un serio problema ambiental (Lim, 1998).

La biodegradación del petróleo y sus derivados en el ambiente es un proceso complejo, ya que depende de la naturaleza y concentración de éstos, de las condiciones ambientales y de la composición microbiana autóctona. Se ha visto que la biodegradación ocurre, principalmente, sobre las fracciones alifáticas y aromáticas del petróleo, pero no sobre compuestos aromáticos de alto peso molecular, resinas y asfaltenos, que son considerados recalcitrantes, aunque algunos estudios han encontrado biodegradación de éstos bajo ciertas condiciones. Al igual que en otros ambientes, en el suelo la velocidad de biodegradación generalmente aumenta cuando hay un incremento de temperatura. En los ecosistemas expuestos a temperaturas extremadamente bajas, los microorganismos tienen un metabolismo muy reducido y, por lo tanto la biodegradación es muy lenta. El oxígeno, la concentración de nutrientes, humedad y pH, son los factores que determinan la velocidad de la biodegradación.

La degradación de los hidrocarburos por comunidades microbianas depende de su composición y de la respuesta adaptativa de éstas a la presencia de los hidrocarburos. Los mecanismos de adaptación incluyen tanto un enriquecimiento selectivo como cambios genéticos (Leahy and Colwell, 1990).

Una de las muchas especies de bacterias degradadoras de hidrocarburos es *Pseudomonas putida* la cual es portadora de plásmidos cuyos genes codifican para la síntesis de las enzimas degradadoras. Recientemente, la degradación de hidrocarburos está siendo ampliamente utilizada en la descontaminación de derrames, incluso se ha hecho uso de preparaciones comerciales bajo condiciones controladas, lo cual es una importante herramienta biológica para asistir el control de la contaminación.

Las bacterias del suelo no sólo son capaces de degradar hidrocarburos, ciertas especies como *Acinetobacter sp*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes sp*, *Alcaligenes eutrophus*, son capaces de degradar plaguicidas y otras sustancias que se depositan al suelo, muchas de ellas xenobióticas (Lim, 1998).

E. LIMPIEZA DE SUELOS Y ACUÍFEROS

1. Biorremediación

La biorremediación es una técnica que aprovecha la capacidad de los microorganismos para transformar sustancias dañinas a compuestos menos tóxicos. Es una de las alternativas más prometedoras para tratar derrames de contaminantes químicos y de algunos residuos peligrosos.

Los microorganismos para sobrevivir, descomponen los compuestos orgánicos que encuentran en la naturaleza para obtener carbono y energía (EPA, 1991).

2. Pruebas de biotratabilidad

Estas pruebas son usadas para establecer el potencial de los microorganismos para degradar los contaminantes presentes en un sitio específico, y determinar si un proceso de biorremediación es aplicable o no (Baker, 1994).

Estas pueden ser simples pruebas que duran algunos días, estudios piloto a escala o a una escala de demostración, que consiste en la aplicación del esquema de tratamiento a una pequeña porción del sitio (Cookson, 1995).

Uno de los principales objetivos de las pruebas de tratabilidad es evaluar las condiciones microbiológicas del sitio; esta caracterización podría definir el grado de actividad microbiana del subsuelo siendo ésta importante para la degradación del contaminante presente. Al mismo

tiempo, se realiza la caracterización de los factores que influyen en esta actividad, como pH, nutrientes inorgánicos y orgánicos, porcentaje de humedad y oxígeno disuelto, entre otros (Baker, 1994).

De las pruebas de tratabilidad se obtiene información que indica:

- Si los contaminantes del suelo son potencialmente biodegradables.
- Si alguno de los contaminantes es potencialmente tóxico para la actividad microbiana.
- Si en el sitio existen microorganismos nativos degradadores.
- Si el ambiente es apropiado para la biorremediación.

Con esto se reafirma la importancia de las pruebas de biotatabilidad como un estudio previo a la biorremediación, ya que de la respuesta del suelo dependerá cierto tratamiento a nivel piloto y su escalamiento al campo.

3. Tecnologías de biorremediación

La presencia prolongada de contaminantes en el suelo ha ocasionado que muchos microorganismos ahí presentes hayan desarrollado la capacidad bioquímica para degradarlos. Esta capacidad es la base de las tecnologías de biorremediación que, en los últimos años, han surgido como una alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados.

En ocasiones, las condiciones que imperan en el sitio contaminado pueden llegar a ser adversas para la sobrevivencia de los microorganismos, sin embargo, las diferentes poblaciones se adaptan entre sí, organizando su interacción para actuar de manera conjunta, logrando la degradación del compuesto contaminante (Saval, 1996).

La biorremediación puede adaptarse a las necesidades de cada sitio, según sus características, por lo que se pueden distinguir varias opciones de operación:

a. Bioestimulación. Se aplica cuando existe flora nativa autóctona con capacidad de degradación y únicamente se requiere la adición de nutrimentos para estimular la actividad metabólica. A este respecto, uno de los mayores éxitos en el área de la biorremediación y que mayor aplicación ha tenido constituye el uso de fertilizantes como fuente de nutrimentos para los microorganismos autóctonos. La biodegradación del petróleo es un fenómeno natural, pero ocurre con una velocidad muy baja y en los casos de derrames accidentales, los hidrocarburos tienen un efecto adverso en el ambiente antes de que puedan ser degradados por los microorganismos.

Cuando se derrama petróleo al suelo, éste se hace disponible como sustrato para el crecimiento de microorganismos, sin embargo, la degradación se limita por la disponibilidad de otros nutrimentos como la fuente de nitrógeno, fósforo o azufre y, en algunos casos, el oxígeno. Para que estos nutrimentos estimulen la degradación del petróleo se requiere administrarlos en una forma en que les sea accesible y que no causen un desbalance ecológico (Rivero, 1996).

b. Bioaumentación. Cuando la proporción de la flora microbiana degradadora autóctona es muy reducida o su actividad es muy baja, se hace necesaria la adición de microorganismos exógenos.

Como en el caso de la degradación de petróleo, existen en la naturaleza microorganismos que pueden degradar gran variedad de contaminantes orgánicos, sin embargo, la eficiencia con la que realizan la detoxificación es muy baja. Una estrategia que se ha seguido para aumentar la degradación, es la de aislar los organismos capaces de consumir el compuesto que se desea eliminar, cultivarlos en gran escala e inocularlos en los suelos contaminados con una proporción significativa de ellos. Esta estrategia, llamada bioaumentación, ha sido utilizada en la detoxificación de una variedad de desechos industriales.

Las características que deben tener los microorganismos empleados en la bioaumentación deben estar bien documentadas e incluyen: la habilidad para degradar la mayor parte de los contaminantes, viabilidad posterior al almacenamiento, crecimiento rápido después del almacenamiento, un alto grado de actividades enzimáticas degradadoras y su expresión en el ambiente, capacidad de competir con microorganismos nativos, no ser patógenos y no producir metabolitos secundarios tóxicos (Rivero, 1996).

c. Bioventeo. Cuando es indispensable el suministro de oxígeno que sirve como aceptor final de electrones en el metabolismo aerobio.

En suelos contaminados que están en la superficie, el bioventeo se hace solamente removiendo el material, ya sea manualmente con ayuda de palas, o mecánicamente con tractores o incluso retroexcavadora.

Un problema mayor se presenta para el bioventeo en suelos profundos, en donde se requieren pozos perforados hasta la profundidad contaminada para hacer llegar el oxígeno mediante aire comprimido que se inyecta a la máxima profundidad del pozo.

d. Biolabranza. Este procedimiento, también llamado land-farming o biocultivo, ha sido frecuentemente usado por la industria petrolera para tratar suelos contaminados con hidrocarburos y residuos aceitosos. La eficiencia del tratamiento de tierra contaminada ha sido confirmada en experimentos controlados cuidadosamente en el laboratorio y en el campo (Alexander, 1994 a).

Los lodos aceitosos generados en el fondo de los tanques de almacenamiento de crudo o derivados, así como los que resultan de las operaciones de limpieza, presentan grandes problemas en cuanto a su disposición final, la cual se efectúa almacenándolos en vertederos o incinerándolos; siendo esta segunda opción económicamente poco costeable.

Como una alternativa a los métodos de disposición anteriores, surgió el “land-farming”, que consiste en extender los lodos aceitosos sobre el suelo, en condiciones controladas para que se lleve a cabo la degradación microbiológica aeróbica de los hidrocarburos por parte de los microorganismos del suelo, quienes degradan y estabilizan los desechos hidrocarbonados. Este procedimiento debe estar perfectamente controlado para prevenir una posible contaminación por percolación del petróleo en el terreno donde se realiza el tratamiento (Ruiz, 1991).

Para el caso de aguas subterráneas, la biorremediación se aplica a través del bombeo-tratamiento, técnica que consiste en extraer el agua subterránea y promover la biodegradación de los contaminantes en reactores instalados en la superficie (Saval, 1998).

IV. ANTECEDENTES

A. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Uno de los principales problemas que ha ocasionado la actividad industrial y el incremento de la población a nivel mundial, es la contaminación de suelos y cuerpos de agua. En muchas zonas industriales se han ido deteriorando, paulatinamente, las condiciones ambientales del entorno hasta niveles que constituyen un riesgo para la salud. Así, el desarrollo industrial acelerado de México, especialmente en las últimas décadas, ha originado problemas de difícil solución, ya que dicho desarrollo avanzó durante mucho tiempo sin una previa planeación. Considerando esta situación, se ha venido poniendo mucho énfasis, en los últimos años, en el establecimiento de medidas preventivas con el fin de reducir o eliminar la descarga de materiales extraños al ambiente (Vizcaíno, 1986).

La contaminación constituye una de las causas más importantes que afectan a suelos y cuerpos de agua, la cual se define como la concentración de un elemento o compuesto químico a partir del cual se producen efectos desfavorables (Porta, 1994).

La necesidad de sanear sitios dañados por la contaminación, ha estimulado el desarrollo de diversas tecnologías, entre las cuales la biorremediación se perfila como una alternativa muy atractiva para ser llevada a la práctica, ya que la mayoría de los estudios realizados para la degradación de los contaminantes es a través de los microorganismos nativos ó autóctonos del suelo que suelen aclimatarse a sitios con daños severos de contaminación.

En el pasado se asumía que las aguas subterráneas estaban, de manera natural, protegidas contra la contaminación. Sin embargo, gracias a los avances de las técnicas analíticas a partir los años setenta, se lograron detectar por cromatografía de gases, concentraciones muy pequeñas de compuestos orgánicos contaminantes en suelos y aguas subterráneas. Con esto se iniciaron a, nivel mundial, investigaciones para evaluar el grado de contaminación de suelos y acuíferos (Mazari, 1992). Muchas de estas investigaciones se realizaron en algunos sitios estratégicos de actividades militares en las grandes potencias y en zonas altamente industrializadas encontrando, en la mayoría de los casos, concentraciones de contaminantes muy por arriba de los límites permitidos.

En el caso de países en vías de desarrollo como México, las fuentes de contaminación pueden variar dependiendo de las actividades que se desarrollan en las diferentes zonas urbanas, rurales e industriales; entre los más comunes están: tiraderos de basura, fugas de alcantarillado, uso de plaguicidas, uso excesivo de fertilizantes, canales de aguas residuales, derrames de combustibles, descarga de aguas residuales, ruptura de tanques y tuberías, así como la disposición de desechos industriales (Porta, 1994).

Una gran cantidad de contaminantes son considerados como residuos peligrosos por su efecto dañino a la salud, ya que algunos suelen ser cancerígenos, tales como: el benceno, varios

compuestos poliaromáticos, los bifenilos policlorados, algunos plaguicidas y metales pesados. El petróleo crudo y sus derivados, que son los contaminantes más comunes a nivel nacional, se localizan en las zonas de exploración y explotación, en refinерías, y en estaciones de servicio, plantas generadoras de energía eléctrica, talleres de reparación de motores, fábricas de pinturas, hules y pegamentos.

Los procesos de transporte de contaminantes a través del subsuelo dependen, en gran medida, de las características físicas y químicas de éstos como: la densidad, la viscosidad y la solubilidad. Una vez que las gasolinas son derramadas en la superficie rápidamente se expanden formando grandes plumas de contaminación, por su baja densidad flotan sobre el nivel freático, pero algunos de sus componentes presentan una parcial solubilización por lo que también es posible encontrarlos en el agua subterránea. Cuando los suelos son muy porosos, como los gravosos o arenosos, o la roca está fracturada, las gasolinas se mueven hacia abajo por acción de la gravedad. La fracción volátil se evapora ocupando la fase gaseosa del suelo y después migra por difusión y, en ocasiones, por advección. Si a estos procesos de transporte de contaminantes se añade la acción de las precipitaciones pluviales y las altas temperaturas que imperan en algunas zonas, varios de los procesos involucrados se aceleran (Saval, 1997).

Como una solución a los problemas de contaminación se ha dado el desarrollo de las tecnologías de remediación que surgieron inicialmente en los países desarrollados a fines de la década de los 80' s. El interés se dió después de haber encontrado compuestos considerados peligrosos en varios acuíferos que abastecen de agua a las poblaciones, en concentraciones que sobrepasan los límites permitidos.

Existen también otros procesos de tratamiento como pueden ser:

- Tratamientos físicos. Dentro de estas técnicas se encuentran la filtración, centrifugación, destilación, evaporación, extracción con solventes, adsorción con carbón activado, etc., este tipo

de técnicas, generalmente, no alteran la composición química de los contaminantes, sólo separan o concentran los materiales tratados aprovechando las diferencias en las características físicas como: densidad, presión de vapor, tamaño de partícula etc.

- **Tratamientos químicos.** Algunos materiales contaminados pueden ser transformados en productos menos peligrosos por medio de tratamientos químicos. Dentro de las técnicas que se pueden usar están: precipitación, neutralización, hidrólisis y óxido-reducción.
- **Tratamientos biológicos.** Consisten en el uso de microorganismos para degradar los compuestos contaminantes presentes en el suelo.
- **Tratamientos térmicos.** En este caso se emplea calor para transformar los contaminantes. La degradación térmica es aplicable a materiales contaminados que contienen concentraciones significativas de compuestos orgánicos y se puede realizar a través de diferentes tipos de incineración (Izcapa, 1998).

Dentro de todas estas técnicas, la biorremediación se ha perfilado como una de las opciones de mayor aplicación debido a que presenta importantes perspectivas para resolver muchos de los problemas de contaminación, ya que se aprovecha el potencial de los microorganismos para transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos (Saval, 1998).

Es importante mencionar que para la aplicación de la biorremediación a un sitio, es conveniente llevar a cabo, previamente, estudios de biotratabilidad, ya que tienen la finalidad de analizar el potencial de aplicación de la biorremediación para un sitio específico. Se pueden llevar a cabo estudios sencillos a nivel de laboratorio para obtener información acerca del potencial de degradación que los microorganismos tienen sobre un contaminante, ó estudios a escala para demostración en campo. De esta manera, es posible probar varias alternativas de remediación

considerando algunos factores como son: la facilidad de llevarla al campo, seguridad en la operación, aspectos ambientales, tiempo necesario para llevarlo a cabo y costos.

El uso de microorganismos, tales como las bacterias, no es un nuevo concepto en el tratamiento de suelos contaminados, en diferentes estudios se ha podido observar que la población nativa es efectiva para remover hidrocarburos, esto se ha dado a través de su grado de adaptación y su capacidad para degradarlos, al mismo tiempo que se han detectado un número considerable de generos comunes como son: *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Alcaligenes* y la especie *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia*, capaces de degradar Hidrocarburos Poli aromáticos (HPAs) (Mahmood, Rama, 1993; Jackson, 1992; Morgan, 1989; Juhasz, 1996,).

Así también, en varios estudios llevados a cabo dentro del mismo grupo de investigación, se ha estudiado la capacidad de algunos microorganismos nativos para degradar tolueno en medios líquidos y en suelo. Se ha encontrado que, a partir de una concentración inicial de tolueno de 867 mg/l, se ha podido reducir a 119.29 mg/l en la primera hora de incubación y alcanzando 9 mg/l de tolueno a los 4 días, lo que corresponden a un 98.07 % de la degradación (Deyta, 1999). En el mismo estudio, la concentración de BTX (benceno, tolueno, xilenos) en suelo, alcanzó un 50 % de la degradación durante los primeros 5 días, llegando a un máximo de 97.7 % en 29 días.

En otro estudio similar, en donde fué necesario enriquecer los cultivos para aumentar la biomasa degradadora, se alcanzaron porcentajes de degradación de tolueno de alrededor de 80 % en un periodo de una a dos semanas, en medio liquido conteniendo tolueno a una concentración de 2600 mg/l (Pérez, 1999).

En otras experiencias a nivel de campo, se ha logrado sanear un suelo contaminado con gasolina y diesel, por adición de fertilizantes y con el control de la humedad. Después de 6 meses se disminuyó en 98 % el contenido de combustibles y aparecieron plantas nativas de la región (Saval, 1997).

V. METODOLOGIA

A. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Este trabajo se inició utilizando un suelo contaminado con diesel proveniente de una zona industrial localizada en el Distrito Federal al cual se le denominó “suelo A”. En este suelo se evaluaron algunos parámetros y se realizaron pruebas de biotratabilidad en charolas y debido a que demostró actividad degradadora, a partir de él se obtuvo el inóculo inicial para los estudios que se realizaron con el agua subterránea y con el “suelo B”.

El agua subterránea y el “suelo B”, que estaban contaminados con mezclas de gasolina y diesel, fueron obtenidos de una instalación de almacenamiento de combustibles localizada en el Valle de México.

El "suelo B" fue parcialmente caracterizado, utilizando muestras extraídas de diferentes profundidades, después de las excavaciones realizadas por el personal de campo, todo el suelo se mezcló y trató por técnicas de bioaumentación y biocultivo debido a que, prácticamente, no contenía actividad biodegradadora nativa. El inóculo utilizado para el "suelo B", que provenía originalmente del "suelo A", fue enriquecido mediante transferencias en cultivos realizados con el agua subterránea contaminada.

Las actividades realizadas dentro de este trabajo estuvieron enfocadas, básicamente, al seguimiento en el laboratorio de la biodegradación de los combustibles contaminantes de los suelos A y B, así como del agua subterránea.

B. DESARROLLO EXPERIMENTAL

1. Caracterización del suelo "A" y pruebas de biotratabilidad en charolas

El suelo a partir del cual se obtuvo el inóculo para las pruebas de biotratabilidad del agua subterránea, se caracterizó mediante la determinación de las siguientes variables: pH, humedad, materia orgánica, concentración de nutrimentos, fósforo y nitrógeno, así como la cuenta de bacterias degradadoras y la concentración de hidrocarburos presentes en él.

El cultivo obtenido durante la cuantificación de bacterias degradadoras, sirvió como punto de partida para la obtención del inóculo inicial. Con el mismo suelo "A" se realizaron pruebas de biotratabilidad en charola, con el fin de establecer un procedimiento para dar seguimiento a la biodegradación. Para ello, se tomó una muestra de suelo contaminado de, aproximadamente, 6 kg, una parte se usó para la caracterización y el resto se repartió en 3 charolas de vidrio, cada una con 2 kg, aproximadamente, y se adicionaron sales inorgánicas (sulfato de amonio y fosfato tricálcico). La humedad se mantuvo constante a 25 % durante todo el experimento, con adiciones de agua según fuera necesario, las charolas se mantuvieron a temperatura ambiente durante un período de 5 meses.

Las sales inorgánicas se agregaron en forma de fertilizantes, (sulfato de amonio y fosfato tricálcico), en cantidad suficiente para dar una concentración equivalente a un suelo rico en nutrimentos, y que fue de 2,000 mg/kg nitrógeno y 12 mg/kg fósforo, tomando como referencia trabajos realizados con anterioridad (Autry y Ellis, 1992). Las sales se agregaron disueltas en agua únicamente a dos charolas, ya que la tercera sirvió como control.

Aproximadamente, cada mes se tomó una muestra de suelo de aproximadamente, 250 g, para determinar: pH, humedad, nitrógeno, fósforo, cuenta total de bacterias heterótrofas, cuenta de bacterias degradadoras y concentración de hidrocarburos.

2. Obtención del inóculo inicial

Se obtuvo a partir del suelo "A" contaminado con diesel. Para ello, a 1 g de suelo se le adicionó agua estéril, se agitó vigorosamente y se dejó sedimentar; a partir del sobrenadante se prepararon diluciones que fueron inoculadas en medio sólido con diesel como único substrato. De los cultivos obtenidos se recuperaron, aproximadamente, 22.5 ml de biomasa, que se agregó a 500 ml de medio mineral con diesel. A partir de aquí, se hicieron transferencias con volúmenes crecientes de diesel iniciando con una relación de 40 μ l/100 ml de medio, hasta llegar a 200 μ l/100 ml de medio. Cada vez, se confirmó la presencia de bacterias degradadoras de diesel en medio sólido. La Figura V.1 muestra, en forma de diagrama, las actividades realizadas para la obtención del inóculo.

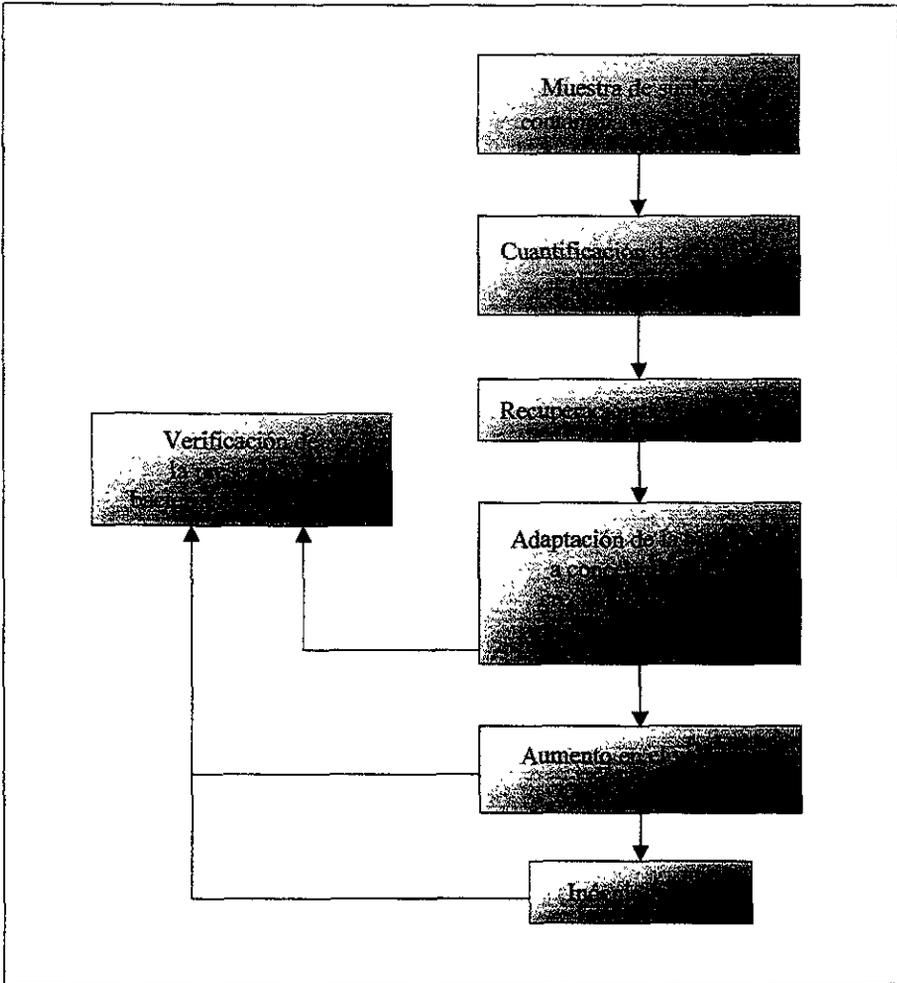


Figura V.1. Obtención del inóculo inicial de bacterias degradadoras de diesel

3. Tratamiento de agua subterránea

Después de obtener el inóculo, se realizó un cultivo de prueba con un litro de agua subterránea contaminada extraída de pozos al que se le agregó sales grado reactivo (KH_2PO_4 y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) como fertilizantes y se suministró aire con ayuda de una bomba de pecera (Maxima). Se midió el pH antes y después del tratamiento.

Este cultivo prueba, además de utilizarse para confirmar la degradación de diesel, sirvió para inocular un siguiente cultivo. En la Figura V.2 se esquematiza el procedimiento que se siguió, el cual se describe a continuación.

Para desarrollar el cultivo 1 se utilizó como inóculo una alícuota de 1 litro del cultivo prueba. Del cultivo 1 se tomó 1 litro para inocular el cultivo 2 y, al término de éste, se procedió de manera similar para inocular el cultivo 3 y, así sucesivamente, para los cultivos 4 y 5.

Los cultivos se realizaron en garrafones de 20 litros con 18 litros de agua subterránea contaminada extraída de pozos. Para estos cultivos se utilizaron sales en forma de fertilizantes, fosfato tricálcico y sulfato de amonio, ya que resulta más económico para el escalamiento al campo. Se midió el pH al inicio y al final del cultivo.

Un resumen de las características de cada cultivo se presenta en la Tabla V.1.

4. Tratamiento de suelo a nivel piloto

De los cultivos descritos anteriormente, los identificados como 3 y 4 sirvieron para inocular el suelo contaminado proveniente de las excavaciones.

Para ello, el suelo contaminado se dispuso sobre un plástico grueso sobre el pavimento y se distribuyó de manera homogénea. Se agregaron los fertilizantes (fosfato tricálcico y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)

disueltos en agua, con ayuda de una pequeña regadera de jardín. De la misma forma, se agregaron los cultivos de bacterias degradadoras distribuyéndolos por todo el suelo. Periódicamente, el suelo fue removido, con ayuda de una pala, para favorecer el recambio de gases. Se agregó agua diariamente para mantener la humedad constante entre 25 y 30 %.

Tabla V.1. Características de los cultivos

Cultivos	Inóculo		Volumen total (litros)	Sales adicionadas		Tiempo de incubación (días)
	origen	alícuota		sulfato de amonio (g)	fosfato tricálcico (g)	
prueba	inóculo inicial	22.5 ml	1	2.38	1	4
1	cultivo prueba	1 litro	18	45	15.48	12
2	cultivo 1	1 litro	18	22.5	7.74	5
3	cultivo 2	1 litro	18	45	15.48	8
4	cultivo 3	1 litro	18	22.5	7.74	8
5	cultivo 4	1 litro	18	45	7.74	8

Nota: todos los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente con aireación

C. TÉCNICAS ANALITICAS

Para la caracterización del suelo y el seguimiento de las pruebas de biotratabilidad se aplicaron los siguientes análisis:

1. Humedad. Se utilizó la técnica de gravimetría, la cual se basa en la pérdida de peso que sufre la muestra tras la evaporación del agua. La técnica NOM-AA-16-1984 fue modificada para adaptarla a los estudios con suelo, como sigue:

- Para la determinación, se llevaron a peso constante los crisoles de porcelana, colocándolos en una mufla (Lindberg), a una temperatura de 550°C por 1 o 2 h. Transcurrido ese tiempo, se

transfirieron inmediatamente a una estufa (Horno Felisa) por 1 h y después a un desecador hasta que se enfriaran a temperatura ambiente.

- Una vez fríos los crisoles, se pesaron y se adicionó aproximadamente, 5 g de la muestra de suelo y se anotó el peso. Después, se introdujeron los crisoles con muestra a la estufa (Horno Felisa) a 105°C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo, se sacaron, se dejaron enfriar en un desecador (Nalgene) y se pesaron nuevamente anotando el resultado (balanza OHAUS). Todo lo anterior se realizó por duplicado en cada muestra (Allison, *et al* 1985).

2. pH. Se pesaron 5 g de suelo en un vaso de precipitados de 100 ml, se agregaron 10 ml de agua destilada, (relación 1:2). Se agitó y se dejó reposar durante 30 min., enseguida se midió el pH con un potenciómetro (Conductronic pH 20) previamente calibrado. En el caso de las muestras de agua únicamente se colocó el electrodo dentro de la muestra y se tomó la lectura (Jackson, 1982).

3. Materia Orgánica. La materia orgánica fue determinada por el método de Walkley y Black (Jackson, 1982).

4. Fósforo. Se determinó mediante el método de Bray P-1, el cual ha sido extensamente empleado como un índice de fósforo disponible en los suelos siguiendo la técnica de Jackson, (1982).

5. Nitrógeno. La mayor parte del nitrógeno en los suelos se encuentra en forma orgánica, por lo que la cuantificación de nitrógeno total se llevó a cabo de acuerdo a la técnica de Kjeldahl modificada (Jackson, 1982), en donde se utilizó un equipo BÜCHI 323.

6. Cuenta total de bacterias heterótrofas. La cuenta total de bacterias heterótrofas se obtuvo en placas de agar, con medio PYG peptona de caseína-glucosa-extracto de levadura, (MERCK).

El medio se disolvió en agua destilada, según la cantidad a utilizar, se esterilizó a 120°C a una presión de 15 libras durante 20 minutos, una vez estéril se vació en cajas petri estériles y se dejó solidificar. Para inocular las cajas, previamente se realizaron diluciones en solución isotónica de NaCl. Al primer tubo se le agregó 1g de muestra y, de ahí, se realizaron diluciones en serie, 1:10 cada vez, hasta llegar a una dilución 10⁶. Una vez inoculadas las cajas, se incubaron en una estufa microbiológica (Felisa), a una temperatura constante de 25°C durante 48 hr., para después llevar a cabo el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC). Las concentraciones se indicaron como ufc/g.

7. Cuenta de bacterias degradadoras. La cuantificación de bacterias degradadoras se hizo de manera similar a las heterótrofas, pero utilizando un medio mineral y diesel, sólo ó en mezcla con gasolina como único sustrato. La incubación se realizó también a 25°C durante 5 días y se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonias.

8. Cuantificación de gasolina y diesel. La cuantificación de gasolina y diesel se realizó por cromatografía de gases de acuerdo al método (EPA 8015). Estos análisis los realizó un laboratorio privado que cumple con las disposiciones oficiales bajo las cuales se realizó este trabajo.

9. Identificación de cepas. En el cultivo prueba, obtenido con el agua subterránea contaminada se realizó la identificación de bacterias. Inicialmente, se hizo una tinción de Gram con los reactivos específicos para dicha técnica (Sigma de México) y, posteriormente, se aplicó la técnica API 20 E para bacterias Gram negativas (No. de catálogo 20120). Se siguieron las instrucciones indicadas por el proveedor.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. Caracterización del suelo A

Las características del suelo A se presentan en la Tabla VI.1. Se observó un pH alcalino, de 8.38, lo que permite preferencialmente el crecimiento de bacterias. El porcentaje de humedad fue bajo, 3.63%, debido, principalmente, a la intemperización, es posible que la reducida humedad haya limitado la viabilidad de la flora microbiana nativa.

El contenido de materia orgánica fue de 18.54%, este valor es alto debido a la presencia de los hidrocarburos contaminantes. La concentración de nutrimentos, (fosfatos y nitrógeno) fue muy baja, ya que corresponde a un suelo pobre pero, a pesar de ello, el contenido de bacterias degradadoras fue de 3.49×10^4 ufc/g de suelo, no obstante, es una proporción baja, considerando que lo deseable para una biorremediación debe ser, por lo menos, de 10^6 ufc/g pero, a pesar de ello, fue una cantidad aceptable ya que estos fueron capaces de adaptarse a las condiciones del

sitio. Este resultado sugiere que los hidrocarburos ahí presentes están sirviendo como sustratos para soportar su crecimiento. La concentración de hidrocarburos presentes en este suelo, principalmente el diesel, fue de 4 991.65 mg/kg (en base seca).

Tabla VI.1. Caracterización de la muestra de suelo A

Parámetro	Concentración
pH	8.38
Humedad (%)	3.63
Materia orgánica (%)	18.54
Fosfatos (mg/kg)	0.33
Nitrógeno total (mg/kg)	457.71
Nitrógeno amoniacal (mg/kg)	372.06
Bacterias degradadoras de diesel industrial (ufc/g de suelo)	3.49×10^4

Tomando en cuenta que el contenido de bacterias degradadoras fue adecuado, se tomó la decisión de generar, a partir de este suelo A, un inóculo para ser utilizado en una escala mayor.

Es importante mencionar que la presencia de hidrocarburos en el suelo A, permitió que las bacterias se adaptaran a éstos, utilizándolos como sustrato. Lo anterior confirma que la flora microbiana nativa, en presencia de contaminantes, se sometió a un proceso de selección natural, en el que los microorganismos sobrevivientes fueron aquellos que desarrollaron una capacidad degradadora (Saval, 1998).

B. Pruebas de biotratabilidad del suelo "A" en charolas

Se realizó por duplicado, además de tener un control al que no se le adicionaron nutrientes. La concentración inicial de diesel fue de 4 991.65 mg/kg. En la charola 1, la concentración de diesel

se redujo en un 99.35%, quedando 32.13 mg/kg del diesel residual (0.65%) en cuatro meses de tratamiento. Al quinto mes, ya no se detectó presencia de hidrocarburos.

De igual forma, en la charola 2 la concentración de diesel se redujo, en cuatro meses de tratamiento, en un 96.29 %, quedando 184.73 mg/kg de diesel residual, equivalentes a 3.71 %.

En la charola control, la concentración de diesel se redujo en un 90.34 %, quedando 37.33 mg/kg de diesel residual, esto es un 9.66 % en cuatro meses de tratamiento. Al quinto mes ya no se detectó presencia de hidrocarburos.

En la Figura VI.1, se presenta la evolución de la concentración de diesel residual con respecto al tiempo. Como se puede observar, en ambas charolas, el porcentaje de diesel fue bajando progresivamente, esto confirma que los microorganismos se encontraban adaptados a la presencia del diesel y que la adición de nutrientes y el control de humedad dieron condiciones favorables para la eliminación de los hidrocarburos. Al final de los 5 meses de tratamiento, el pH fue de 7.3. En la charola control, también se dio una reducción del diesel pero de una manera más lenta comparado con las charolas 1 y 2, esto debido a la falta de nutrientes externos.

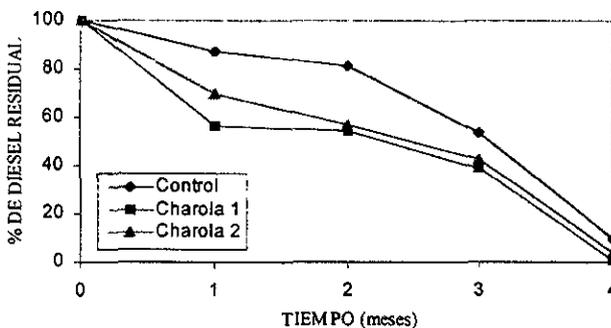


Figura. VI.1. Evolución de la degradación de diesel durante las pruebas de tratabilidad

En los perfiles cromatográficos de diesel, obtenidos durante las pruebas de biotratabilidad que se presentan en la Figura VI.2, se observa que, conforme va avanzando el tratamiento, hay una reducción en el tamaño de los picos y una modificación del perfil como consecuencia de la biodegradación; incluso hay una desaparición de éstos hacia el cuarto y quinto mes, donde ya no se detectó la presencia de hidrocarburos.

C. Características del suelo "B" en el sitio contaminado

El suelo B presentó una consistencia arcillo-limosa, que ocasiona una baja permeabilidad. Mostró partículas con diámetros entre 0.002 y 0.05 mm y aún menores. Esta determinación fue importante, ya que es necesario conocer la facilidad con la que un suelo puede ser tratado, específicamente, si permitiría la aireación y si podrá mantener la humedad, lo cual hace que la actividad biológica del suelo esté determinada, en gran medida, por su textura.

La porosidad es de gran importancia también, ya que el espacio poroso depende de la estructura, del contenido de materia orgánica y de la textura. En suelos arcillosos, como el que se analizó, los poros son generalmente pequeños, a diferencia de los suelos arenosos donde los poros son grandes, aunque el espacio poroso es menor. El tamaño de los poros y el espacio poroso total afectan el movimiento y retención de agua; en suelos arenosos, el agua se mueve rápidamente a través de los poros grandes, pero se retiene poco. En cambio, en suelos arcillosos, los numerosos microporos contribuyen a una mayor retención de agua (Alexander, 1994), por ello en este caso fue posible mantener la humedad constante entre 25 y 30 %.

En el suelo "B", se encontró que la cuenta total de bacterias heterótrofas de 5.4×10^4 ufc/g de suelo, resultó muy baja respecto a la de un suelo normal, que es de 10^7 a 10^9 ufc/g de suelo (Wild, 1992).

Al realizar la cuantificación de bacterias degradadoras de diesel, éstas no se detectaron, esto puede ser consecuencia de la presencia de los hidrocarburos, en fase libre, que puede estar ocasionando una inhibición del crecimiento bacteriano.

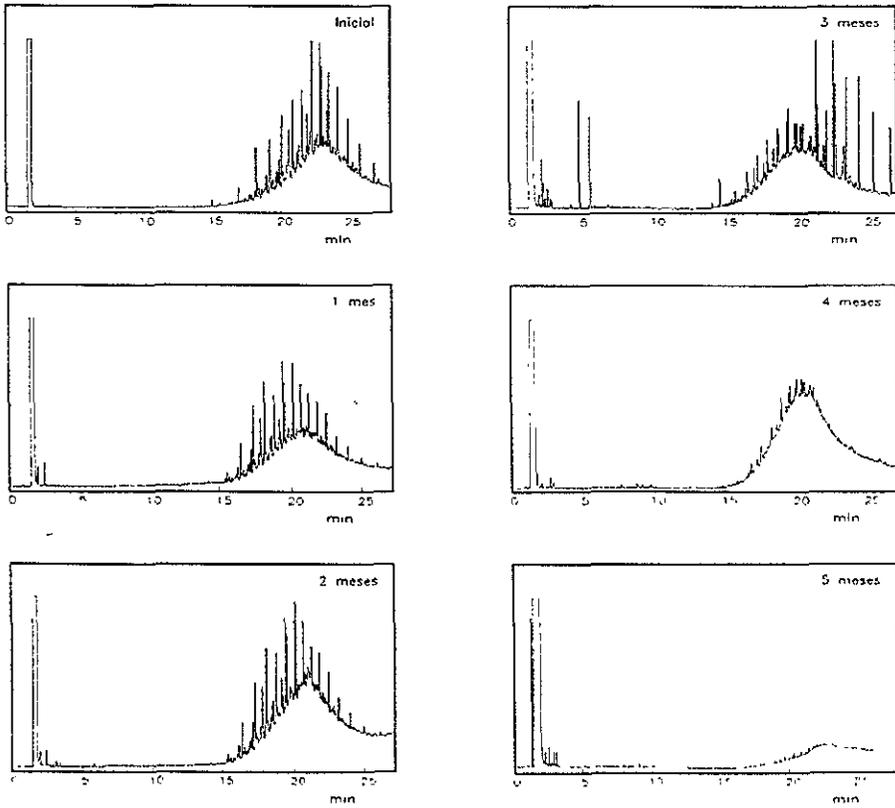


Figura. VI.2. Evolución de los perfiles cromatográficos de diesel en el suelo A durante las pruebas de biotratabilidad

La concentración de hidrocarburos puede afectar la biodegradabilidad debido a la toxicidad de éstos sobre los organismos degradadores. Altas concentraciones de hidrocarburos pueden ser inhibitorias para ciertos microorganismos, y la concentración a la cual ocurre inhibición varía con el compuesto y con la especie bacteriana, además de otros factores que también son importantes.

El pH del suelo "B", en el sitio, se incrementó conforme se avanzó en la profundidad. Fue de 8.5 en la superficie y de 9.55 a 2.58 m, como se observa en la Figura VI.3. Estos valores altos de pH también, pueden estar limitando la actividad microbiana, muy probablemente este sea otro elemento por el que la cuenta total de bacterias heterótrofas sea baja.

Aunque no se ha encontrado en la literatura información sobre el efecto de los hidrocarburos sobre el pH del suelo, en otro trabajo que se realizó, simultáneamente a éste, se pudo confirmar que la presencia de diesel aumenta el pH de un suelo; probablemente un efecto de superficie "bloquea" los sitios ionizables en la estructura del suelo (Romero Arce, 2000).

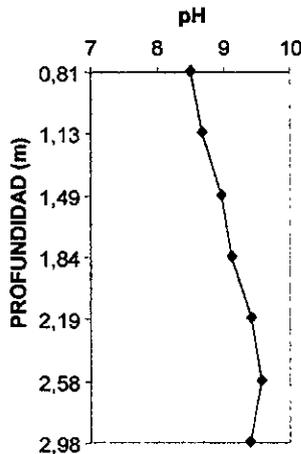


Figura VI.3. Perfil de pH del suelo B en el sitio contaminado

De manera similar al pH, el contenido de diesel en el sitio, presentó concentraciones crecientes a medida que se avanzó en profundidad hasta 3 m, después tendió a disminuir. En el caso de la gasolina, se detectó presencia de trazas sólo en algunas profundidades, (Figura VI.4). En este caso, la mayor concentración corresponde a la profundidad a la que se encuentra el nivel de las aguas freáticas, por lo que debido a que el diesel, por su baja densidad respecto al agua, tiende a flotar sobre ella. A esta profundidad es donde ocurre la adsorción de los hidrocarburos al suelo, más aún, debido a que las arcillas tienen alto contenido de materia orgánica y esto ocasiona una mayor afinidad por los hidrocarburos.

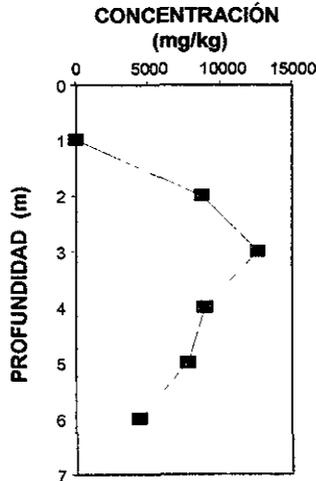


Figura. VI.4. Perfil de la concentración de diesel en el sitio contaminado

Debido a las condiciones poco favorables para realizar la biorremediación del suelo B, en el propio sitio, se decidió excavarlo para darle tratamiento externo (ex situ).

Por otro lado, la ausencia de bacterias nativas degradadoras de diesel no podía garantizar una biodegradación en esas condiciones, por lo que se hizo necesaria la adición de inóculos de bacterias activas y de nutrimentos.

Con la finalidad de que el estudio pudiera ejemplificar la solución a un problema real, los inóculos para la biorremediación del suelo B se produjeron en un medio preparado con el agua subterránea contaminada con diesel, proveniente del mismo sitio. Así, al mismo tiempo que se sanó el agua subterránea, se produjo un inóculo necesario para sanear el suelo. En las secciones siguientes se dan mayores detalles.

D. Biotratamiento de agua subterránea contaminada con diesel

Se dió tratamiento a 6 lotes de agua subterránea contaminada, al primero, se le llamó cultivo prueba y tuvo la particularidad de tener los hidrocarburos disueltos en la fase acuosa debido a la presencia de agentes tensoactivos. En los 5 lotes restantes, numerados del 1 al 5, se observó un sistema de 2 fases, la fase orgánica flotando sobre la fase acuosa y una interfase emulsionada. Los resultados de todas las pruebas, se integraron en la Tabla VI.2.

En el lote prueba, se observó un cambio en el pH como consecuencia de la actividad metabólica, el valor inicial fue de 5.8 y el final de 8.8. A los 4 días se observó la desaparición de los hidrocarburos y un aumento en la biomasa, que se pudo apreciar por la turbidez del medio. Debido a la urgencia de realizar estas pruebas para dar solución al problema en campo, no hubo posibilidad de cuantificar el crecimiento, únicamente se estimó el diesel residual al inicio y término de cada cultivo.

Al comprobar la presencia de bacterias degradadoras de hidrocarburos en el lote prueba, con un orden de magnitud de 1.43×10^6 ufc/ml, se aseguraron condiciones adecuadas para que pudiera llevarse a cabo la biorremediación del suelo "B". En este cultivo prueba se encontró que las bacterias que estuvieron presentes en mayor proporción, correspondían a *Pseudomonas cepacia*.

Tabla VI.2. Resultados obtenidos en los diferentes lotes de agua subterránea contaminada sometida a biotratabilidad

Lote	Presencia de hidrocarburos	Tiempo del cultivo (días)	pH		Concentración de hidrocarburos (mg/l)				% Aproximado de la biodegradación
			inicio	final	inicio		final		
Prueba *	disueltos	4	5.8	8.8	diesel gasolina	15,181.20 1,263.60	diesel gasolina	5.8 ND	99.97 100
1	en fase libre y emulsionado	12	-	8.16	diesel + gasolina > 25,500		diesel gasolina	5 179 ND	79.69 100
2	en fase libre y emulsionado	5	8.14	-	diesel + gasolina > 17,000		diesel gasolina	18.80 ND	99.89 100
3	en fase libre y emulsionado	8	7.84	8.30	diesel + gasolina > 17,000		diesel gasolina	318.36 ND	98.13 100
4	en fase libre y emulsionado	8	7.57	8.45	diesel + gasolina > 20,000		diesel gasolina	155.70 ND	99.23 100
5	en fase libre y emulsionado	8	7.21	8.73	diesel + gasolina > 20,000		diesel gasolina	37.30 ND	99.82 100

*Hidrocarburos disueltos por la presencia de agentes tensoactivos

Lo anterior coincide con los estudios realizados por Juhasz *et al.* (1996, 1997), en los que se aislaron y caracterizaron tres variedades de *Pseudomonas cepacia* a partir de suelos contaminados con hidrocarburos poliaromáticos. Las cepas fueron capaces de utilizar a éstos hidrocarburos como única fuente de carbono y energía.

En cuanto a la presencia de hidrocarburos en el agua subterránea del cultivo prueba, la concentración de diesel disminuyó de 15,181.20 mg/l a 5.8 mg/l, mientras que la gasolina se redujo de 1,263.60 mg/l a concentraciones no detectables, Tabla VI.2. En este caso particular, se

puede afirmar que la reducción en la concentración de gasolina se debió a la degradación y no a una volatilización debida a la aireación que se aplicó al cultivo, ya que se trataba de los hidrocarburos de mayor peso molecular y poco volátiles.

Es muy probable, que el tiempo que tomó la degradación haya sido corto, de 4 días, ya que los hidrocarburos estaban solubilizados en la fase acuosa debido a la presencia de agentes tensoactivos que se habían introducido al subsuelo durante el saneamiento en campo.

En el cultivo 1, la concentración de la mezcla de diesel y gasolina fue mayor a 25,500 mg/l. Este dato se estimó a partir del volumen de hidrocarburos que flotaban sobre el agua en el recipiente. Después de 12 días de cultivo, la concentración bajó a 5,179 mg/l, para diesel, Tabla VI.2, mientras que la gasolina ya fue no detectable. Esto indica que la biodegradación fue aproximadamente de 79.69 %.

En el cultivo 2, la biodegradación se observó en un tiempo de 5 días, donde la concentración de hidrocarburos se redujo de más de 17,000 mg/l a 18.80 mg/l en el caso de diesel, mientras que la gasolina no fue detectable. Se debe aclarar, que los cultivos se dieron por terminados cuando ya no se observó la capa "flotante" de hidrocarburos ya que, como se dijo anteriormente, la urgencia por realizar las pruebas no permitió realizar determinaciones complementarias.

El perfil cromatográfico de estándares de gasolina y diesel, se presenta en la Figura VI.5. Los hidrocarburos contenidos en la gasolina son más ligeros y volátiles, por lo que presentan tiempos de retención cortos. En cambio, los hidrocarburos del diesel tienen mayor peso molecular, por lo que presentan mayor tiempo de retención comparado con la gasolina. Para el diesel, estos tiempos de retención son muy cercanos entre sí, por ello la línea base presenta una forma de campana (Saval, 1997).

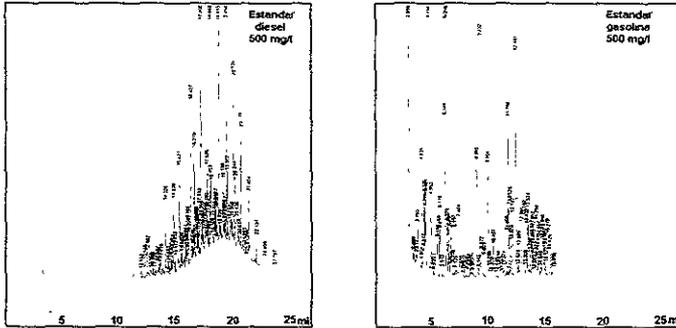


Figura. VI.5. Perfiles cromatográficos de estándares de diesel y gasolina

La Figura VI.6 corresponde al perfil cromatográfico obtenido para la muestra del lote 2 al inicio del cultivo, en él se observa la presencia de una mínima cantidad de hidrocarburos de la gasolina, en comparación con el alto contenido de hidrocarburos del diesel. Después de 5 días de tratamiento, se observó una disminución en la respuesta del cromatógrafo, Figura VI.6 los picos de la gasolina fueron no detectables y, en el caso del diesel, hubo una notable reducción en el tamaño de los picos, así como un ligero cambio en el perfil típico. La concentración final de diesel fue de 18.80 mg/l, que corresponde a un 99.89 % de biodegradación.

En el cultivo 3, la concentración de hidrocarburos se redujo de más de 17,000 mg/l a 318.36 mg/l, para el caso del diesel, mientras que la gasolina ya no fue detectable. En la Figura VI.7 se observa el perfil cromatográfico obtenido para este lote, en el que la proporción de gasolina fue mínima respecto al diesel. Después de 8 días de tratamiento se observó, también, una disminución en los picos del diesel, mientras que los de la gasolina fueron no detectables.

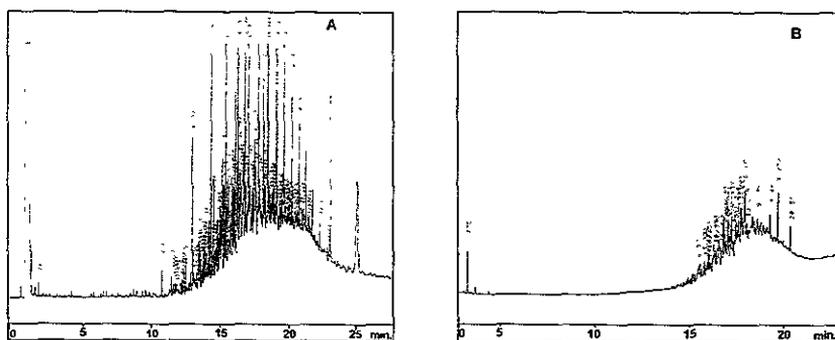


Figura. VI.6. Perfil cromatográfico de muestras de agua subterránea del lote 2, (A) inicial, (B) a 5 días de tratamiento

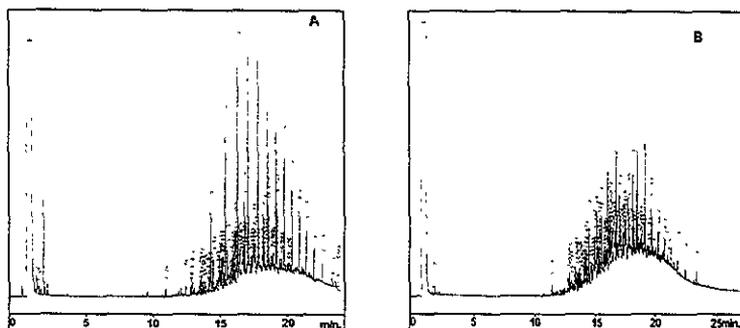


Figura. VI.7. Perfiles cromatográficos de la muestra de agua subterránea del lote 3, (A) inicio del cultivo (B) 8 días del biotratamiento

En los cultivos 4 y 5, la concentración de hidrocarburos se redujo de más de 20,000 mg/l a 155.70 mg/l y 37.30 mg/l, respectivamente, para el diesel, mientras que la gasolina ya no fue detectable (Tabla VI.2). La Figura VI.8 corresponde a los perfiles cromatográficos obtenidos para las muestras de los lotes 4 y 5 al inicio del cultivo, se observa un alto contenido de hidrocarburos del diesel y prácticamente ausencia de gasolina.

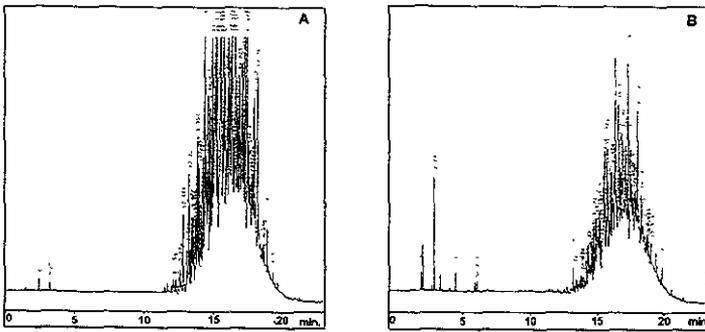


Figura. VI.8. Perfil cromatográfico de las muestras de agua subterránea iniciales del lote 4 (A) y 5 (B)

En los cultivos 3, 4 y 5 (Tabla VI.2) sí se pudo observar la modificación del pH inicial que, en todos los casos, tendió a aumentar por arriba de 8 al final del cultivo.

Con excepción del cultivo 1, donde la concentración de hidrocarburos al inicio fue muy alta, en los lotes 2 a 5 se alcanzaron muy altos porcentajes de biodegradación, casi del 100 %.

E. Biorremediación del suelo "B" a escala de demostración

La distribución de gasolina y diesel adsorbidos al suelo en el sitio contaminado fue muy irregular. Se encontraron puntos en donde las concentraciones fueron muy altas, de 20,000 mg/kg, mientras que en otros puntos fue de alrededor de 1000 mg/kg.

Para dar tratamiento al suelo fue necesario hacer una excavación; una vez que se tuvo el suelo en la superficie se homogeneizó sobre un plástico grueso que evitara el contacto con el pavimento. El suelo se revolvió con ayuda de una pala. La concentración de diesel en el suelo homogéneo fue ligeramente superior a 6000 mg/kg.

Se puso especial cuidado para mantener constante la humedad, entre 25 y 30 %. En un estudio, realizado por Jackson (1990), se indica que para la biorremediación de suelos contaminados se requiere un contenido de humedad mínimo de 20 %. La humedad proporcionada fue satisfactoria para la actividad microbiana.

Las sales en forma de fertilizantes fueron adicionadas una sola vez al inicio, ya que también se estaban adicionando las cantidades remanentes de los cultivos provenientes de los lotes 3 y 4 del agua subterránea sometida a biotratabilidad. En la Figura VI.9 se presenta una vista en campo de la manera en que se llevó a cabo la inoculación del suelo y su homogeneización.

Después de un mes de tratamiento la concentración de gasolina fue de 4.54 mg/kg y la de diesel de 43.23 mg/kg; al mes y medio, la concentración de diesel fue de 14.52 mg/kg mientras que la gasolina ya no fue detectable, (Tabla VI.3).

Tabla VI.3. Análisis de hidrocarburos del suelo "B"

Análisis	Suelo contaminado				
	Antes del tratamiento	Después de un mes de tratamiento		Después de un mes y medio de tratamiento	
	mg/kg	mg/kg	% Eliminación	mg/kg	% Eliminación
Diesel	6256	43.23	99.31	14.52	99.77
Gasolina	313	4.54	98.54	ND	100

En la Figura VI.10 se observa el perfil cromatográfico del suelo B, donde se observa que al inicio es una mezcla de diesel y gasolina. Después del tratamiento, se observó la desaparición de la gasolina y que los picos del diesel disminuyeron casi en su totalidad. Es posible que los hidrocarburos más pesados o difíciles de degradar por los microorganismos sean los que hayan quedado presentes en una mínima concentración.



Figura. VI.9. Vista en campo de las actividades de biorremediación del suelo B

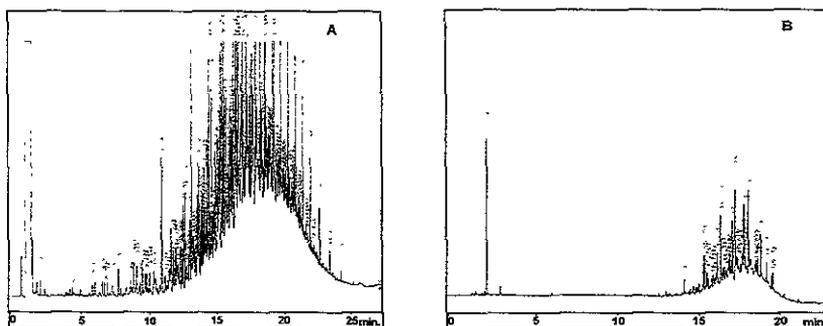


Figura. VI.10. Perfiles cromatográficos del suelo B, (A) inicio del tratamiento, (B) después del tratamiento

CONCLUSIONES

- Los tratamientos aplicados al suelo y agua subterránea resultaron satisfactorios para la degradación de los hidrocarburos presentes en los mismos.
- Se comprobó la biodegradación de los hidrocarburos a través del seguimiento analítico del diesel por cromatografía de gases.
- La biodegradación de los hidrocarburos presentes en el suelo se favoreció con la adición de nutrimentos (bioestimulación).
- La obtención de un inóculo inicial a partir de un suelo rico en bacterias degradadoras fue adecuado, ya que se redujeron los tiempos de adaptación para el tratamiento del suelo.

- El cultivo de bacterias degradadoras de diesel, obtenido del suelo A, fue capaz de aclimatarse a las condiciones que imperaron en el suelo B, ya que se trataba del mismo combustible contaminante.
- El tratamiento de agua subterránea a través del cultivo con bacterias degradadoras resultó favorable para su saneamiento.
- El cambio en la pureza de las sales de grado reactivo, a fertilizante durante el tratamiento del agua subterránea no influyó en el proceso de biodegradación.
- A través de los perfiles de pH y concentración de hidrocarburos del suelo B en el sitio contaminado, se pudo observar la influencia de éstos parámetros sobre la actividad microbiana.
- La experimentación hecha resalta la importancia de realizar pruebas de biotratabilidad antes de la aplicación de una estrategia de biorremediación en el propio sitio contaminado.
- La aplicación de una estrategia de biorremediación de acuerdo a las necesidades del sitio favoreció la biodegradación de los hidrocarburos presentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander M, 1980. Introducción a la microbiología del suelo; Ed. AGT, México D.F.
- Alexander M, 1994 a. Biodegradation and Bioremediation; Ed. Academic, Press, San Diego, California.
- Alexander M, 1994 b. Introducción a la microbiología del suelo; Ed. AGT, México D.F.
- Allison L. E y Richards L. A, 1985. Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos sódicos; Ed. Limusa, México. Editado por Richards L. A. 6a edición.
- Autry A. R and Ellis G. M, 1992. Bioremediation;; an effective remedial alternative for petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Environ. Progress*, Vol. 11(4): 318-323.

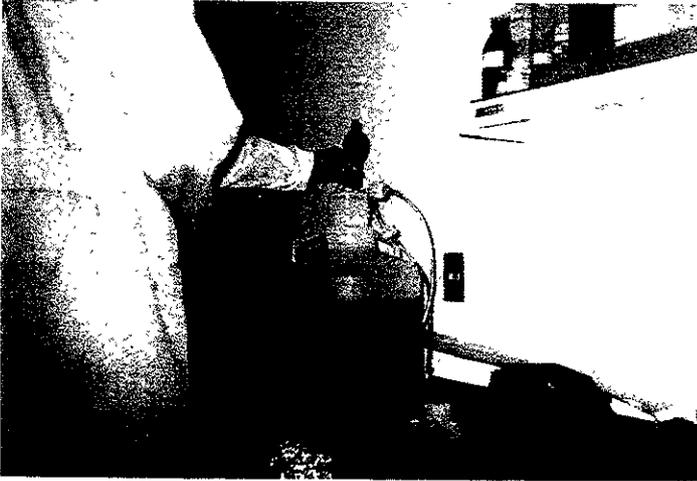
-
- Baker H. K; Herson, S. D, 1994. Bioremediation; McGraw-Hill, Inc, United States of America.
 - Bohn L. H, Mcneal B. L, O'Connor G. A, 1993. Química del suelo; Ed. Limusa, México D.F.
 - Buckman 1991. Naturaleza y propiedades de los suelos; Ed. Limusa, México D.F.
 - Cookson J. Jr, 1995. Bioremediation Engineering. Design and Application, Ed. McGraw-Hill, Inc. Houston, Texas.
 - Deyta A. L, 1999. Caracterización de dos suelos contaminados con gasolina y evaluación de su capacidad degradadora de hidrocarburos monoaromáticos. Tesis de Maestría en Biotecnología Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado. UNAM.
 - EPA /540/2-91/002. 1991. Understanding biorremediation: A guidebook for citizens. United States Environmental Protection Agency.
 - Fassbender W. H, 1987. Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica.
 - Foth D. H, 1981. Fundamentos de la Ciencia del Suelo; Ed. Continental, México D.F.
 - Ingraham J. L, 1998. Introducción a la microbiología; Ed. Reverté.
 - Izcapa T. C, 1998. Lineamientos generales para la evaluación de sitios contaminados y propuestas de acciones para su restauración. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental, Facultad de Ingeniería UNAM.

- Jackson J. D, 1990. Bioremediation of Diesel Contaminated Soils; presented at the 3rd Annual Symposium of the Arizona Hydrological Society, September 20-21.
- Jackson J. D, 1992. In-Situ Bioremediation of Diesel Contaminated Soils; *Environmental Management Conference and Exhibition*, November 10-12, 309-316 p.
- Jackson M. L, 1982. Análisis químico de suelos; Cuarta edición. Ed. Omega, Barcelona, España.
- Juhasz A. L; Britz M. L; Stanley G. A, 1996. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hidrocarbons by *Pseudomonas cepacia*; *Biotechnology Letters*, Vol. 18, Núm. 5, 577-582 p.
- Juhasz A. L; Britz M. L; Stanley G. A, 1997. Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*; *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 83, Núm. 2, 189-198 p.
- Leahy G. J; Colwell R, 1990. Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment; *Microbiological Reviews*, Vol. 54, No. 3, 305-315.
- Lim D, 1998. Microbiology; Ed. McGraw-Hill, USA.
- Mahmood S. K; Rao P. R, 1993. Microbial Abundance and Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil; *Bull. Environmental Contamination Toxicology*, 50: 486-491p.

- Mazari, M, 1992. Potential Groundwater Contamination by Organic Compounds in the Mexico City Metropolitan Area. Tesis de Doctorado en Ciencias Ambientales e Ingeniería. Universidad de California. USA.
- Morgan P; Watkinson J. R, 1989. Hydrocarbon Degradation in Soils and Methods for Soil Biotreatment; *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol. 8, Núm. 4, 305-318 p.
- Palacios M. S y Gama C, J, 1994. Suelos: Génesis, Dinámica y Degradación. Ciencias de la Tierra hoy. Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo de Cultura Económica, México.
- Patrick F, 1987. Suelos, su formación, clasificación y distribución; Ed. CECSA, México D.F.
- Pelczar M, 1991. Microbiología; Cuarta edición, Ed. McGraw-Hill, México D.F.
- Pérez H. N, 1999. Caracterización microbiológica del subsuelo subyacente a canales de aguas residuales en la zona de Chalco, Estado de México. Tesis Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Porta J; Lopez-Acevedo M. y Roquero C, 1994. Edafología para la agricultura y el medio ambiente, Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España.
- Rivero Serrano, Octavio; Ponciano R. G, 1996. La situación ambiental en México; Programa Universitario del Medio Ambiente, UNAM, México D.F.
- Romero A. H. M, 2000. Estudios de biodegradación de diesel en columnas experimentales empacadas con suelo. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas.

- Rose A. H, 1977. Microbiología química; Ed. Alhambra, España.
- Ruiz J; Olvera, B, 1991. Causas y consecuencias de la contaminación del suelo; Universidad Autónoma Chapingo, México D.F.
- Saval S, Remediación y restauración, en PEMEX: Ambiente y Energía. Los Retos del Futuro, coedición UNAM-Petróleos Mexicanos, México, 1995: 151-189.
- Saval S, 1996. Biorremediación de suelos contaminados; Biodegradación de Compuestos Orgánicos Industriales, Vol. 1, 84-94 p.
- Saval S, 1997. Biorremediación de un suelo contaminado con diesel; *Ingeniería y Ciencias Ambientales*, Núm. 33, 24-30 p.
- Saval S, 1997. La Biorremediación como alternativa para la limpieza de sitios contaminados con hidrocarburos; Memorias. Seminario Internacional sobre restauración de sitios contaminados, 141-147.
- Saval S, 1998. Biorremediación: Alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados con hidrocarburos; *Ingeniería y Ciencias Ambientales*, Núm. 34, 6-9 p.
- Thompson, 1982. Los suelos y su fertilidad; Ed. Reverté.
- Vizcaino F, 1986. La contaminación en México; Fondo de Cultura Económica. México.
- Wild A, 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell; Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

ANEXO



Biotratamiento de agua subterránea contaminada



Vista en campo de las actividades de biorremediación del suelo B