



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**“ESTUDIO DE LA MICROFLORA NATIVA DE UN SUELO CONTAMINADO CON DIESEL SOMETIDO A PRUEBAS DE BIOTRATABILIDAD”**

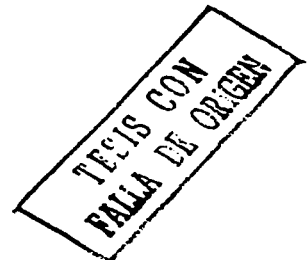
# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**B I Ó L O G O**  
P R E S E N T A  
LUIS FELIPE VILCHIS ANAYA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. SUSANA SAVAL BOHORQUEZ



MÉXICO, D.F. FACULTAD DE CIENCIAS  
DIRECCIÓN ESCOLAR



2002



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.



ESTADO LIBRE Y SOBERANO DE QUERÉTARO  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN  
CARRERA DE BIOLÓGICOS

**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: **Estudio de la microflora -  
nativa de un suelo contaminado con diesel sometido a pruebas de biotratibilidad**

realizado por **Luis Felipe Vilchis Anaya**

con número de cuenta **9022468-5**, 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. **Irma Ruiz Silva**

Propietario

Biól. **Claudia Vallejo Albarrán**

Suplente

M. en C. **Adriana Muñoz Hernández**

Suplente

Biól. **Elva Bazán Mora**

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



Dra. **Patricia Ramos Morales**

DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGÍA

## AGRADECIMIENTOS

*A mis padres y principalmente a mi mamá, ya que siempre me brindo el apoyo y la ayuda necesaria para terminar la carrera.*

*A la Dra. Susana Saval por la oportunidad y apoyo recibido a lo largo de todo este tiempo para realizar el presente trabajo.*

*A mis amigas del cubículo, Adriana, Araceli, por haberme ayudado y colaborado a terminar este trabajo*

*A Irma, Lety, Alma, por haberme aguantado todo este tiempo, y que de algún modo contribuyeron en este trabajo.*

*A mi amiguita Moni (pecas) por su apoyo brindado durante el tiempo que estuvo*

# CONTENIDO

Resumen.....	I
Lista de tablas.....	II
Lista de figuras.....	III
<b>I. Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Objetivos.....</b>	<b>3</b>
<b>III. Marco teórico.....</b>	<b>4</b>
A. Microbiología del suelo.....	4
1. Microorganismos que intervienen en la biodegradación de hidrocarburos.....	5
1.1 Bacterias.....	5
1.2 Hongos.....	6
1.3 Levaduras.....	7
B. Contaminación del medio ambiente con hidrocarburos.....	7
C. Biorremediación.....	8
1. Pruebas de biotratabilidad.....	11
D. Características fisicoquímicas del suelo que influyen en la biodegradación de HC..	13
1. Humedad.....	13
1.1 pH.....	14
1.2 Temperatura.....	14
1.3 Intercambio gaseoso.....	14
1.4 Materia orgánica.....	15
1.5 Textura.....	16
1.6 Capacidad de intercambio catiónico.....	17
1.7 Nitrógeno.....	18
1.7.1 Amonificación.....	18
1.8 Fósforo.....	20
E. Uso de materiales texturizante.....	21
1. Composta.....	21
2. Fibra de coco.....	22

<b>IV.</b>	<b>Antecedentes.....</b>	<b>23</b>
<b>V.</b>	<b>Experimentación.....</b>	<b>27</b>
A.	Descripción del sitio.....	27
B.	Obtención de la muestra.....	28
C	Técnicas Analíticas.....	28
1.	Caracterización física y química del suelo.....	28
2-	Caracterización microbiológica del suelo.....	29
D.	Pruebas de biotratabilidad en laboratorio.....	30
1.	Seguimiento de las pruebas de biotratabilidad.....	31
1.1	Variables biológicas.....	31
1.2	Variables químicas.....	31
<b>VI.</b>	<b>Resultados y Discusión.....</b>	<b>32</b>
A.	Bacterias potencialmente degradadoras.....	32
1.	Humedad.....	32
2.	pH.....	36
3.	Nitrógeno Amoniacal.....	38
4.	Nitrógeno Total.....	45
5.	Fosfatos.....	47
B.	Hongos y Levaduras.....	51
1.	Humedad.....	51
2.	pH.....	53
3.	Amonio.....	55
4.	Nitrógeno Total.....	57
5.	Fosfatos.....	60
<b>VII.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>61</b>
<b>VIII.</b>	<b>Recomendaciones.....</b>	<b>63</b>
	<b>Bibliografía.....</b>	<b>64</b>

<b>Apéndice 1.....</b>	<b>73</b>
Niveles de Nitrógeno total, Fósforo y Materia Orgánica en suelos.....	73
<b>Apéndice 2.....</b>	<b>74</b>
Datos de análisis fisicoquímicos en los distintos tratamientos durante las pruebas de biotratabilidad.....	74
Datos de análisis microbiológicos en los distintos tratamientos durante las pruebas de biotratabilidad.....	76
Datos degradación de diesel.....	79
<b>Apéndice 3.....</b>	<b>80</b>
Unidades experimentales.....	80

## RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados de pruebas de biotratabilidad a nivel mesocosmos de un suelo contaminado con diesel, en el cual se utilizaron dos materiales orgánicos texturizantes: composta y fibra de coco, además de la adición de fertilizantes.

El suelo contaminado tenía una concentración de diesel de 86,926 mg/kg. Se utilizaron como controles un suelo no contaminado adicionado de texturizantes y un suelo contaminado sin adición de texturizantes, en este último se realizó la caracterización microbiológica y fisicoquímica. Las pruebas de biotratabilidad se realizaron en recipientes de vidrio con capacidad para 3 kg de suelo, la temperatura se mantuvo constante en una incubadora. Se montaron cuatro pruebas diferentes por triplicado: Suelo contaminado + Composta; Suelo contaminado + Composta + Fertilizantes; Suelo contaminado + Fibra de coco; Suelo contaminado + Fibra de coco + Fertilizantes. La cantidad de texturizantes se agregó para tener una concentración de diesel aproximada de 30,000 mg/kg. La urea y el superfosfato triple se agregaron para tener una relación C:N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> de 10:15:0.1. La humedad se mantuvo constante.

Se realizó un muestreo inicial (T<sub>0</sub>), a los 40 (T<sub>1</sub>) y a los 80 días (T<sub>2</sub>) en cada uno se evaluaron parámetros fisicoquímicos (pH, humedad, nitrógeno amoniacal, nitrógeno total, y fosfatos) y microbiológicos (bacterias potencialmente degradadoras, bacterias amonificantes, hongos y levaduras), además del diesel residual.

La utilización de texturizantes además de su efecto como diluyente, mejoró las características físicas (estructura y aeración) y químicas del suelo, especialmente aporte de nitrógeno y fósforo disponible, lo cual se reflejó en la degradación del diesel en mayor medida en los tratamientos sin adición de fertilizantes 72.25% (Sc+C), y 60.69% (Sc+Fc). El uso de una fuente de nitrógeno como la urea, posiblemente afectó de manera negativa a los microorganismos tanto en su desarrollo como en su capacidad degradadora, principalmente por las condiciones alcalinas (pH 7.85 a 8.84) que se generaron a lo largo del experimento, lo cual se reflejó en el porcentaje de degradación del 33.55% (Sc+C+F) y 31.75% (Sc+Fc+F). El número de bacterias potencialmente degradadoras, osciló entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>7</sup> ufc/gr suelo tanto en los tratamientos con y sin fertilizantes, pero en el caso donde las condiciones resultaron más alcalinas (Sc+C+F Y Sc+Fc+F) pudo afectar tanto su capacidad degradadora, así como la disponibilidad de sustrato como lo es el diesel. Se encontró la presencia de hongos (ND a 10<sup>6</sup> UFC/g suelo) y levaduras (ND a 11<sup>11</sup> UFC/g suelo) el cual resultó muy variable, e inclusive en algunos casos no se obtuvo crecimiento, no obstante se asume que pudieron haber participado en la degradación del diesel.



---

# LISTA DE TABLAS

## Capítulo III

Tabla III C1	Desarrollo de un proyecto de biorremediación (Saval 1999).....	10
Tabla III C2	Opciones de biorremediación que se aplican en función de las características del suelo contaminado (Saval,1995).....	11
Tabla III D1.4	Propiedades benéficas impartidas por la materia orgánica al suelo (Wagner, et al. 1998).....	16

## Capítulo IV

Tabla IV.A.1	Características físicas y químicas de las muestras del suelo contaminado con diesel.....	25
--------------	--	----

# LISTA DE FIGURAS

## Capítulo V

Figura V.1	Tanque de almacenamiento de diesel.....	27
------------	---	----

## Capítulo VI

Figura VI.1	Capacidad de retención de agua en los distintos tratamientos.....	33
Figura VI.2	Porcentaje de humedad y su efecto sobre las bacterias degradadoras.....	35
Figura VI.3	pH y su efecto en las bacterias potencialmente degradadoras.....	37
Figura VI.4	Porcentaje de degradación de diesel en los distintos tratamientos.....	38
Figura VI.4.1	Concentración de diesel en los tratamientos con y sin Fertilizantes.....	39
Figura VI.5	Variación de bacterias amonificantes en los distintos tratamientos.....	39
Figura VI.6	Determinación de la presencia de bacterias potencialmente degradadoras en el Suelo contaminado.....	42
Figura VI. 6.1	Concentración de diesel en el suelo contaminado (Sc).....	43
Figura VI.7	Concentración de nitrógeno amoniacal y su efecto en las bacterias potencialmente degradadoras.....	45
Figura VI.8	Concentración de nitrógeno total y su efecto en las bacterias potencialmente degradadoras.....	47
Figura VI.9	Variación del fosfatos y su efecto sobre las bacterias potencialmente degradadoras.....	50
Figura VI.10	Determinación de UFC hongos y levaduras en el Sc.....	52
Figura VI.10.1	Porcentaje humedad y su efecto en hongos y levaduras.....	53
Figura VI.11	Determinación del pH y su efecto en hongos y levaduras.....	55
Figura VI.12	Concentración de nitrógeno amoniacal y su efecto sobre el desarrollo de hongos y levaduras.....	57
Figura VI.13	Concentración de nitrógeno total y su efecto en hongos y levaduras.....	58
Figura VI.14	Concentración de fosfatos y su efecto en hongos y levaduras.....	60

# I. INTRODUCCIÓN

El incremento en las actividades industriales a nivel mundial, a tenido como consecuencia problemas de contaminación en el medio acuático y terrestre. Además de la contaminación del aire.

En años recientes han surgido diversas tecnologías que permiten tratar los diversos tipos de contaminación, entre los que destacan los hidrocarburos del petróleo, así como los materiales peligrosos, principales contaminantes de suelos. Entre estas tecnologías disponibles, la biorremediación ha sido muy utilizada debido a que es relativamente más económica que el resto de las tecnologías, y además porque en general puede lograr una mineralización completa de los contaminantes.

La importancia de llevar a cabo pruebas de biotratibilidad a nivel de laboratorio, permite establecer la factibilidad de aplicar una biorremediación *ad hoc* al sitio y hasta donde puede llegar el nivel de biodegradación de los contaminantes. Además se pueden conocer los grupos microbianos presentes, y dar seguimiento de su evolución a lo largo del tiempo.

Las condiciones en el ambiente del suelo pueden resultar adversas para los microorganismos, ya que la concentración de un contaminante puede resultar muy alta, o bien, tóxica para los mismos. La falta de oxígeno, humedad reducida, o un pH extremo, disminuyen la diversidad de los grupos microbianos y su actividad biológica frente a los contaminantes. Otro problema es el bajo contenido de nutrientes en un suelo contaminado, principalmente en lo que se refiere a nitrógeno y fósforo.

Lo anterior lleva a la conveniencia de mejorar las condiciones físicas del suelo mediante la adición de texturizantes orgánicos, así como las condiciones químicas a través de la adición de

**fertilizantes, lo cual podrá favorecer una más eficiente biodegradación de los contaminantes, mediante el uso de la flora nativa.**

## II. OBJETIVOS

### Objetivo general

- Determinar los microorganismos nativos de un suelo contaminado con diesel y su comportamiento a largo de pruebas de biotratabilidad en el laboratorio.

### Objetivos particulares

- Determinar los grupos microbianos nativos de un suelo contaminado con diesel.
- Dar seguimiento a la respuesta de los grupos microbianos nativos, durante el desarrollo de pruebas de biotratabilidad que incluyen la adición de materiales orgánicos texturizantes y de fertilizantes.
- Observar la participación de la microflora nativa en la disminución de la concentración del diesel.

### III. MARCO TEÓRICO

#### A. Microbiología del suelo

El suelo es un ecosistema dinámico en el cual los microorganismos se encuentran entrelazados entre los componentes físicos y biológicos. La microflora de los suelos es compleja y puede incluir miembros representativos de diversos grupos microbianos. La magnitud de las poblaciones y tipos específicos están en estrecha relación con los diferentes tipos de suelos y factores microambientales, tales como: pH, humedad y la disponibilidad de nutrientes. Contrario al ambiente acuático, el suelo representa un hábitat muy variable para los microorganismos, debido a la heterogeneidad del mismo, y a sus complejas características físicas y químicas. Consecuentemente, las poblaciones microbianas en los suelos son también variables. Cada ambiente edáfico selecciona los tipos microbianos que pueden adaptarse fisiológicamente a un conjunto dado de condiciones naturales. En otras palabras, la población microbiana en el suelo cambia con facilidad en respuesta a los cambios ambientales (Edmonds, 1978).

Los microorganismos son los principales agentes responsables del reciclaje del carbono en la naturaleza. En muchos ecosistemas existen comunidades microbianas nativas hidrocarbonoclasticas capaces de la biodegradación extensiva de una gran variedad de hidrocarburos. Esto ha sido demostrado en muchos suelos, ambientes marinos y de agua dulce. (Atlas y Bartha, 1973) En ecosistemas no contaminados dichas poblaciones pueden constituir menos del 0.1%, en tanto que en presencia de hidrocarburos contaminantes, éstas pueden constituir arriba del 100% de los microorganismos viables. Estas diferencias reflejan cuantitativamente los grados o el grado de exposición de un ecosistema a los hidrocarburos. Además una amplia degradación de contaminantes del petróleo generalmente va acompañada por una mezcla de especies microbianas, más que especies microbianas individuales (Raiser, 1992).

Uno de los primeros estudios sobre la diversidad microbiana fue realizado por Zobel en 1946, en el que reconoció que muchos microorganismos tienen la habilidad para utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono y energía, y los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Atlas, 1981).

Muchas especies de bacterias, cianobacterias, hongos filamentosos y levaduras coexisten en ecosistemas naturales, y pueden actuar independientemente o en combinación para metabolizar algunos compuestos, como por ejemplo, hidrocarburos aromáticos (Gibson, 1984).

## 1. Microorganismos que intervienen en la biodegradación de hidrocarburos

### 1.1 Bacterias

Las bacterias son los organismos más numerosos en el suelo, se dice que existe hasta  $10^8$  poblaciones viables por gramo de suelo, y son asimismo los organismos que presentan mayor diversidad fisiológica (Wild, 1992).

En general, la mayoría de las poblaciones bacterianas organotróficas aerobias de una gran parte de los suelos está compuesta por géneros gram positivos. Es común encontrar que hasta un 70% de la totalidad de las bacterias aisladas del suelo sean, de los géneros: *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Micrococcus*. La población gram negativa generalmente está compuesta en su mayor parte por especies de *Pseudomonas* y *Flavobacterium*, entre otros (Grant *et al.* 1989).

Existen numerosas especies de bacterias con capacidad para degradar compuestos derivados del petróleo. Entre los principales géneros aislados de suelos y de ambiente acuáticos se encuentran principalmente: *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* y *Nocardia*. Las especies de *Pseudomonas* parecen ser las más adaptadas a los diferentes contaminantes (Balba, 1993).

## 1.2 Hongos

En la naturaleza los hongos son particularmente eficientes para degradar los principales polímeros de las plantas, celulosa y lignina, pero ellos también descomponen una enorme variedad de otras moléculas orgánicas. Aunque en la industria microbiológica regularmente se aprovecha el metabolismo de los hongos, paradójicamente el uso de los hongos en la biorremediación ha sido limitada comparado con el uso de las bacterias. Sin embargo, la habilidad de los hongos para desarrollarse sobre hidrocarburos del petróleo también es importante. (Benett y Faison, 1997)

Los atributos que distinguen a los hongos filamentosos de otras formas de vida determinan las razones por las cuales ellos son buenos degradadores. Primero, el desarrollo micelial da una ventaja competitiva en un hábitat dado sobre células individuales tales como bacterias y levaduras, especialmente con respecto a la colonización en sustratos insolubles. En adición, los hongos pueden ramificarse a través de los sustratos, ya que literalmente los digieren gracias a la secreción de enzimas degradativas extracelulares. La penetración hifal provee un mecanismo adjunto a la ruptura química efectiva por las enzimas secretadas. Además, la naturaleza extracelular de las enzimas permite a los hongos tolerar altas concentraciones de compuestos químicos tóxicos (Benett y Faison 1997).

La habilidad para utilizar hidrocarburos se da principalmente en 2 órdenes: los Mucorales y los Moniliales, *Aspergillus* y *Penicillium* asimilan hidrocarburos (Cerniglia, et al, 1992).

Los hongos filamentosos no exhiben una degradación preferencial por cadenas particulares y parecen ser más capaces de degradar o transformar hidrocarburos de estructura compleja, o largas cadenas, de ahí que jueguen un papel importante en la oxidación de hidrocarburos en el suelo (Gibson, 1984).



### 1.3 Levaduras

La habilidad de algunos microorganismos, incluyendo las levaduras, para utilizar alcanos como fuente de carbono ha sido conocida desde hace muchos años (Crow *et al.* 1980)

Por lo menos 7 géneros de levaduras (Ascomycetes) como: *Deberomyces*, *Lodderomyces*, *Metshinkowia*, *Pichia*, *Saccharomycopsis*, *Schwaniomyces* y *Wingea* tienen especies que pueden desarrollarse a expensas de hidrocarburos. Pero indudablemente las especies y géneros de levaduras estudiadas, capaces para desarrollarse sobre hidrocarburos son: *Candida*, *Rhodotorula*, *Solentila*, *Sporidiobolus*, *Sporobolomyces*, *Turolopsis* y *Trichosporon*, las cuales son capaces de utilizar n-alcanos (Rose, 1987).

En 1977 Hagihara fue el primero en reportar la utilización de alcanos de cadena ramificada (pristano) como única fuente de carbono y energía por *Candida lipolytica*. En tanto que cepas de *C. maltosa* y *C. lipolytica* mostraron ser capaces de consumir hidrocarburos aromáticos y de cadena ramificada (Crow *et al.* 1980).

En años recientes, el uso potencial de levaduras como un inóculo microbiano para el abatimiento de la contaminación de petróleo ha recibido considerable atención. La mayor parte de las levaduras que utilizan hidrocarburos se ha estudiado en ambientes marinos, en contraparte con la escasa información sobre su distribución en ambientes terrestres (Ekundayo y Obuekwe 1999).

### B. Contaminación del Ambiente con Hidrocarburos

Una amplia variedad de químicos orgánicos tóxicos son introducidos inadvertida o deliberadamente en el ambiente. Los hidrocarburos son un ejemplo común de estos compuestos, los cuales entran al ambiente en grandes volúmenes a través de numerosas rutas (Balba *et al.* 1998).

Existen tres fuentes potenciales de hidrocarburos, una de las principales se refiere a las entradas continuas en bajo nivel, por ejemplo, los provenientes de superficies carreteras, desechos domésticos y la lenta filtración de combustibles que son fugas inadvertidas de tanques subterráneos de almacenamiento muy antiguos. Otra fuente son las filtraciones de reservorios naturales por el cual el petróleo entra en contacto con el ambiente. Y finalmente, se tienen los derrames en mayor escala provenientes de tanques superficiales industriales de almacenamiento y tomas clandestinas de ductos (Morgan *et al.* 1989).

Todo esto conduce a la contaminación de los suelos, acuíferos, sedimentos, y aguas superficiales, por lo que la necesidad de remediar estos sitios ha propiciado el desarrollo de nuevas tecnologías que enfatizan la degradación de los contaminantes, más que el emprender una disposición convencional. La biorremediación está entre las nuevas tecnologías que tienen la finalidad de biodegradar contaminantes (Boopathy, 2000).

### C. Biorremediación

Una variedad de tecnologías están disponibles para tratar suelos contaminados con materiales peligrosos, incluyendo la excavación y contención de tierras rehabilitadas, extracción de vapor, estabilización y solidificación, lavado de suelos, extracción con solventes, desorción térmica, vitrificación e incineración. Muchas de estas tecnologías, sin embargo, son costosas o no resultan en una destrucción completa del contaminante o no devuelven su vocación natural al suelo. De esta manera, el tratamiento biológico parece estar entre los métodos más promisorios para ocuparse de un amplio intervalo de contaminantes orgánicos, particularmente los hidrocarburos del petróleo (Balba *et al.* 1998).

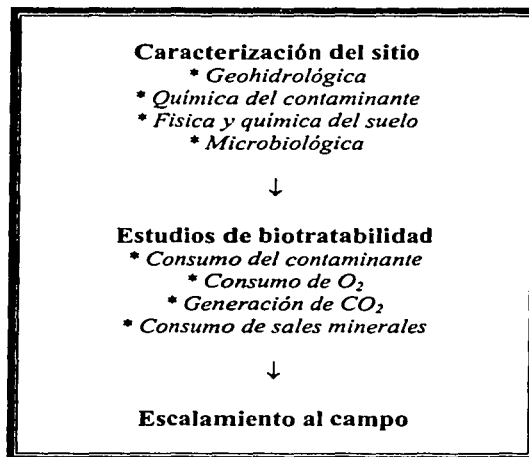
La biorremediación consiste en la oxidación biológica o biodegradación de un compuesto. El grado de biodegradación y la tasa en la cual ocurre depende de las interacciones entre el ambiente, el número y tipo de microorganismos presentes, y la estructura química de los contaminantes. Para que una biorremediación sea exitosa, muchos factores deben ser tomados en cuenta (Walter y Crawford, 1997).

La más importante característica de la biorremediación es que los contaminantes no se destruyen, sino que a través de la actividad microbiana se transforman en compuestos químicamente diferentes. Cuando la transformación llega hasta la generación de  $\text{CO}_2$ , se habla entonces de una completa mineralización. La complejidad química de los contaminantes y la limitación de nutrientes esenciales para la actividad metabólica, hace que el proceso requiera de varios años, y en algunos casos no se logra su completa degradación (Saval, 1998).

En los sitios donde ocurren derrames de hidrocarburos que no son atendidos inmediatamente, la flora microbiana presente en el suelo se somete a un proceso de selección natural, en el que los microorganismos sobrevivientes son aquellos que desarrollan capacidad degradadora. En estos es mejor usar la flora autóctona del sitio, en lugar de agregar microorganismos exógenos. Para tratar derrames recientes, probablemente será necesario recurrir a preparados microbianos (Saval, 1998).

Dado que la práctica de la biorremediación se realiza en campo, su ejecución debe ser vista como un problema ingenieril de escalamiento. Tomado como base lo anterior, se podría hacer énfasis sobre la forma deseable para desarrollar un proyecto de biorremediación, en tres etapas: caracterización del sitio, estudios de biotratibilidad y escalamiento al campo, como se indica en la **Tabla III.1** (Saval, 1999).

Tabla III.1. Desarrollo de un proyecto de bioremediación (Saval 1999).



La finalidad de la caracterización geohidrológica es conocer el tamaño y forma de la mancha de contaminación, la cual habrá de convertirse en un biorreactor, que por naturaleza será heterogéneo. Por otra parte, a través de la caracterización química de los contaminantes se podrá conocer la amplia variedad de los compuestos que servirán como sustratos y de otros que podrían inhibir la actividad metabólica. La caracterización física y química del suelo permitirá conocer el microambiente donde los microorganismos llevarán a cabo su acción metabólica dirigida a la degradación de los contaminantes (Saval, 1998).

Dentro de la caracterización microbiológica se incluye: conteo de microorganismos heterótrofos totales y degradadores específicos de los hidrocarburos de interés en el suelo contaminado. Esta caracterización proveerá información útil sobre la actividad biológica del suelo y el grado en el cual la población microbiana nativa está aclimatada a las condiciones del sitio. Los resultados indicarán si el suelo contiene una población microbiana saludable y suficiente, capaz de efectuar una biorremediación. En adición a la evaluación inicial del suelo contaminado, la necesidad de monitorear la población microbiana durante la biorremediación es una herramienta útil para

seguir los cambios e identificar los grupos microbianos activos en la degradación de hidrocarburos (Balba *et al.* 1998).

Las tecnologías de biorremediación pueden ser clasificadas como *off site* o *in situ*. Las tecnologías *off site* son aquellas en las cuales se traslada a otro sitio diferente al de su origen. Mientras que, las técnicas *in situ* se aplican en el mismo lugar donde se encuentra el material contaminado (Boopathy, 2000). Existen varias opciones para la biorremediación, su aplicación depende de varios factores como son la profundidad de la contaminación, el tipo de suelo, el tipo y concentración de los contaminantes, la presencia de actividad degradadora, la presencia de aceptores finales de electrones para la respiración microbiana y las condiciones climatológicas que imperan en el lugar (Saval, 1996). En la Tabla III.2 se resumen las diferentes opciones.

**Tabla III.2. Opciones de biorremediación que se aplican en función de las características del sitio contaminado (Saval 1995)**

1. Biolabranza. El suelo se extiende en una capa de tamaño regular y se mezcla periódicamente ( <i>in situ</i> ó <i>off site</i> )
2. Bioventeo. Suministro de aire para estimular la actividad microbiana nativa
3. Bioaumentación. Adición de bacterias previamente seleccionadas por su capacidad de degradar contaminante (usada en sistemas <i>in situ</i> ó <i>off site</i> )
4. Biocomposteo. Proceso aeróbico que es llevado a cabo por microorganismos en el cual el material contaminado es mezclado con composta después de su maduración.
5. Bioestimulación. Adición de nutrientes para estimular la actividad de las bacterias nativas.

### 1. Pruebas de Biotratabilidad

La biorremediación es un procedimiento científico intensivo, el cual puede ser hecho a la medida, de acuerdo a las condiciones de un sitio específico. Para ello, previamente pueden ser llevados a cabo estudios de biotratabilidad, ya que con estos se mide el potencial de efectividad de la biorremediación en una situación dada.

El objetivo de una prueba de biotratabilidad es identificar los factores limitantes y sugerir las vías por las que estos pueden ser superados en el campo (Skladany *et al.* 1992).

Las pruebas de biotratabilidad se llevan a cabo a cualquier nivel de operación, pueden ser estudios sencillos con duración de una semana o menos para obtener información acerca del potencial de degradación de un contaminante; estudios a escala piloto o laboratorio, que pueden llevar varios meses de operación ó estudios a gran escala que consisten en la aplicación del esquema de tratamiento propuesto a una pequeña porción del sitio. Los estudios de biotratabilidad se complementan con información del sitio y características del contaminante, de esta manera se puede hacer una comparación con otras alternativas de remediación, considerando factores como son la facilidad de llevarla al campo (Sims *et al.* 1990).

En resumen, la información que aportan los estudios de biotratabilidad es:

- Si los contaminantes del suelo son potencialmente degradables.
- Si alguno de los contaminantes es potencialmente tóxico para el proceso de degradación microbiana, y si se debe realizar un tipo de tratamiento previo a la biorremediación.
- Los niveles de limpieza que se pueden alcanzar para un sitio en particular.
- Cuáles son las características microbiológicas del sitio (microorganismos aerobios o anaerobios).
- Si el ambiente es apropiado para la bioremediación o se deben ajustar las condiciones ambientales, por ejemplo modificar pH, remoción previa de metales tóxicos o ajustes en el contenido de humedad (Gruiz *et al.* 1995).

El seguimiento de las pruebas de biotratabilidad incluye:

- Determinar el grado de reducción del contaminante en el suelo, analizando muestras periódicamente.
- Determinar el consumo de los aceptores finales de electrones y de nutrientes.
- Cuenta de microorganismos degradadores

Los estudios de biotratabilidad se realizan en una fase, o bien, divididas en 2 o más. Cuando se realizan en múltiples fases se tiene la ventaja de que se usen los resultados de la primera fase para

cambiar ó confirmar el diseño experimental apropiado para la siguiente, aunque tiene la desventaja de requerir más tiempo.

Todos los estudios de biotratibilidad requieren el uso de controles, independientemente de su simplicidad, los cuales no deben ser omitidos, ya que se usan para establecer la base de comparación de los parámetros a evaluar.

#### **D. Características físicas y químicas del suelo que influyen en la biodegradación de hidrocarburos**

##### **1. Humedad**

El contenido de humedad del suelo influye en el número y actividad de los microorganismos del suelo. La influencia de la humedad depende en gran parte de la naturaleza del suelo, y de los organismos que en él se encuentren. La cantidad óptima de agua para la mayoría de los organismos del suelo es entre el 50 y 70% de la capacidad de retención de agua en el suelo. (Foth, 1981).

Generalmente la degradación aerobia de compuestos orgánicos en suelos, como los hidrocarburos, puede estar en función de la humedad disponible del suelo (Calabrese *et al.* 1992). La humedad debe ser considerada como una variable importante, ya que el agua del suelo no solo afecta la disponibilidad del contaminante, sino también el grado de aireación del suelo, la naturaleza y cantidad de materiales solubles, presión osmótica, y el pH de la solución del suelo, el nivel de toxicidad, el movimiento y estadios de desarrollo de microorganismos así como la distribución de especies (Cookson, 1995).

## 2. pH

La actividad biológica en el suelo es grandemente afectada por el pH, a través de la disponibilidad de nutrientes y compuestos tóxicos. El pH puede influenciar la solubilidad o disponibilidad de macronutrientes, especialmente el fósforo, así como de micronutrientes. El pH ideal para promover la biodegradación de hidrocarburos en suelos se encuentra dentro del intervalo de neutro a ligeramente alcalino (Frankenberger Jr., 1992).

## 3. Temperatura

La temperatura, al igual que la humedad y el pH, es un factor importante que controlan la actividad microbiana en el suelo, y por consiguiente la tasa de descomposición de materia orgánica. Aunque muchos microorganismos son capaces de sobrevivir a temperaturas extremas, sus actividades son reducidas para condiciones excesivas de calor o frío (Skladany *et al.* 1992).

A bajas temperaturas, la viscosidad de los hidrocarburos se incrementa, la volatilización de alcanos de cadena corta es reducido y su insolubilidad en agua se incrementa, retrasando así su biodegradación. Por el contrario, las altas temperaturas incrementan el metabolismo de hidrocarburos a un máximo, típicamente en el intervalo de 30 a 40°C, arriba del cual la toxicidad de los hidrocarburos incrementa (Leahy *et al.* 1990). Otros autores señalan un intervalo menor, entre 20 y 35°C, en el cual la mayoría de los microorganismos que utilizan hidrocarburos como fuente de carbono son más activos (Riser, 1992).

## 4. Intercambio gaseoso

La presencia o ausencia de oxígeno claramente tiene un efecto importante sobre la tasa o grado de degradación, dependiendo si el contaminante es metabolizado a través de una vía aerobia o anaerobia. La biodegradación de hidrocarburos es predominantemente aerobia. (Balba, 1993).



El contenido de oxígeno en un suelo depende de la textura, agregación, porosidad, permeabilidad y drenaje, así como de la actividad microbiana. En suelos contaminados con hidrocarburos y en experimentos a nivel de laboratorio, se ha demostrado que un bajo contenido de oxígeno limita la biodegradación, según Rhykerd et al. (1999), la mineralización de hidrocarburos disminuye cuando el contenido de oxígeno es menor al 10 %.

## 5. Materia Orgánica

La descomposición de los residuos orgánicos es una función principal de la vasta población microbiana del suelo. Cuando los microorganismos descomponen el material orgánico, la mayoría del carbono es transformado a bióxido de carbono o incorporado a biomasa. Sin embargo, sólo una pequeña porción del carbono es bioquímicamente alterado y el resto permanece en el suelo como materia orgánica.

La materia orgánica del suelo es importante porque imparte propiedades químicas, físicas y biológicas deseables. La cantidad ideal de materia orgánica en el suelo se encuentra por arriba del 5% del volumen total, suficiente para ejercer una influencia importante en las propiedades del suelo.

El mayor efecto de la materia orgánica en un suelo mineral, es que contribuye de un 20 a un 80 % de la capacidad de intercambio catiónico. La materia orgánica también influye en las propiedades físicas del suelo promoviendo su agregación. Esta propiedad es favorecida por la producción de polisacáridos producidos por las bacterias del suelo y las sustancias húmicas producidas por hongos del suelo (Wagner *et al.* 1998). La **Tabla III. 3** resume los efectos benéficos que imparte la materia orgánica al suelo.

Tabla III.3. Propiedades que proporcionan al suelo la materia orgánica (Wagner *et al* 1998)

Propiedades Biológicas	Propiedades Químicas	Propiedades físicas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Provee una fuente de carbono y una fuente de energía para soportar una grande y diversa actividad de la población metabólicamente activa.</li> <li>- Favorece el desarrollo de la cubierta vegetal, derivado de las modificaciones físicas y químicas del suelo y la existencia de elementos esenciales y agua para el desarrollo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incrementa la capacidad de intercambio catiónico.</li> <li>- Favorece la capacidad buffer</li> <li>- Provee una lenta liberación y suministro de nutrientes como: N, P y S.</li> <li>- Tiene una alta capacidad para absorber compuestos orgánicos y así reducir la biodisponibilidad de xenobionticos tóxicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contribuye a mejorar la estructura del suelo y su agregación.</li> <li>- Disminuye la densidad en masa, y de esta manera incrementa el porcentaje de espacio libre.</li> <li>- Incrementa la capacidad de campo.</li> <li>- Favorece el intercambio gaseoso, la aireación y disponibilidad de oxígeno para los microorganismos</li> </ul>

Una de las principales diferencias entre los suelos superficiales, suelos de la zona vadosa y sedimentos subterráneos es el contenido de materia orgánica. El alto contenido de materia orgánica está asociado con la gran diversidad de poblaciones y diversidad de la actividad microbiana. En tanto, los suelos subsuperficiales (o subsuelo) y sedimentos subterráneos tienen bajos niveles de materia orgánica, y por lo tanto, una menor cantidad de microorganismos y diversidad de poblaciones (Wagner *et al.* 1998).

## 6. Textura

La textura del suelo se refiere básicamente al porcentaje de arena, limo y arcilla de un suelo. (Tamhane *et al.* 1986). El área superficial de un material puede influir mucho en sus propiedades fisicoquímicas, esta superficie es fundamentalmente una función del tamaño de las partículas. Los suelos difieren, en forma marcada, en el área superficial como resultado de las diferencias de textura, tipos de material arcilloso, y cantidad de materia orgánica. Propiedades tan importantes como la retención de agua y capacidad de intercambio están íntimamente relacionadas con la superficie específica de los suelos (Gavande, 1991).

Las arenas, consisten en minerales resistentes, son de gran tamaño y exponen poca superficie, son principalmente inactivas y constituyen en realidad el armazón de la masa del suelo. Los limos muestran propiedades en cierto sentido intermedias entre las arenas y las arcillas, y se componen, fundamentalmente de fragmentos minerales originales. Las arcillas consisten principalmente, de productos secundarios del intemperismo químico, tienen tamaño ultramicroscópico, y exponen un área superficial grande. Son las fracciones del suelo más activas e influyen en la mayor parte de sus propiedades fisicoquímicas (Tamhane *et al.* 1986).

### **7. Capacidad de intercambio catiónico**

El mecanismo de intercambio catiónico, se da entre los cationes absorbidos sobre las superficies cargadas del suelo y los cationes que están en solución, es un fenómeno reversible entre las partículas y solución del suelo.

Más del 99 % de los cationes se hayan absorbidos en las superficies coloidales, y menos del 1 % se encuentra en solución. Las partículas que los retienen son minúsculas porciones de arcilla y materia orgánica cargadas negativamente, es decir, la materia coloidal del suelo (Cepeda, 1991).

En los suelos, los cationes intercambiables más comunes son:  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{NH}_4^+$ , generalmente el calcio es el ion dominante y la abundancia del resto de los cationes es muy variable. La capacidad de los suelos de absorber e intercambiar cationes y aniones varía de acuerdo a la naturaleza y contenido de arcilla y de humus (Bear, 1963).

## 8. Nitrógeno

El nitrógeno está presente en grandes cantidades en muchos suelos, como constituyente de la materia orgánica. El nitrógeno asociado a la materia orgánica puede ser convertido de formas orgánicas a inorgánicas mediante procesos de mineralización.

La materia orgánica del suelo, particularmente las sustancias húmicas, actúan como un almacén y suministro de nitrógeno, para plantas y microorganismos; casi un 95 % del nitrógeno total está asociado a ésta (Hasset *et al.* 1992).

La mineralización del N es llevada a cabo principalmente por microorganismos heterótrofos. A través de este proceso el N orgánico es liberado como  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$ . Los organismos sintetizan una amplia variedad de compuestos que contienen nitrógeno, tales como: aminoácidos, aminoazúcares y ácidos nucleicos encontrados en suelos. Si el nitrógeno es mineralizado o inmovilizado por los microorganismos depende de la relación C/N del sustrato comparado con los organismos que descomponen. Si el sustrato tiene un relación C/N baja, el N estará en exceso y el  $\text{NH}_3$  será liberado (Shulten *et al.* 1998).

La inmovilización de N puede ocurrir directamente por procesos tanto bióticos como abióticos (inmovilización por arcillas). La adición a suelos de un sustrato con un alta relación C/N provocará una rápida inmovilización microbiana de  $\text{NH}_4^+$ . La inmovilización no representa una pérdida permanente de N, ya que a la muerte de los microorganismos se produce una mineralización y retorno al suelo el nitrógeno inmovilizado (Mengel, 1996).

### 8.1. Amonificación

El amonio es el punto final de la degradación de proteínas y ácidos nucleicos, y a su vez, es utilizado por los microorganismos para la síntesis celular. La amonificación es un importante proceso microbiano, no sólo porque proporciona la materia prima para la nitrificación posterior

sino también, porque genera N fácilmente asimilable, que es de interés para muchas especies de plantas (Wild, 1992).

El amonio resultante de la amonificación puede ser: 1) absorbido por las plantas, 2) adsorbido por las arcillas o por la materia orgánica, 3) inmovilizado por microorganismos, 4) lixiviado a través del suelo, ó 5) oxidado hasta el nivel de nitratos (Fassbender, 1987).

La amonificación es catalizada por enzimas presentes en muchos microorganismos heterótrofos quedando libre el  $\text{NH}_4^+$  en la solución del suelo (Wild, 1992). Una flora diversa libera amonio de los compuestos nitrogenados orgánicos; ciertamente casi todas las bacterias, hongos y actinomicetos atacan alguna forma compleja del elemento pero la tasa de descomposición y los compuestos utilizados varía de acuerdo con los géneros y especies involucrados. En el caso de los hongos se ha reportado que liberan cantidades considerables de amonio por la descomposición de proteínas y aminoácidos, entre otros. Sin embargo, la cantidad de amonio que se acumula varía con el organismo, el tipo de sustrato, el tipo de suelo y las condiciones ambientales (Alexander, 1981).

El N en forma de  $\text{NH}_3$  puede también ser perdido por volatilización. La pérdida de  $\text{NH}_3$  en valores de pH altos sucede por el equilibrio entre los iones  $\text{NH}_4^+$  en la fase acuosa del gas  $\text{NH}_3$  que es altamente dependiente del pH. En valores de pH menor a 7.0, el equilibrio favorece fuertemente a la forma  $\text{NH}_4^+$ , mientras que a valores de pH cercanos a 9.0, el 40% de las especies nitrogenadas podría estar en forma de  $\text{NH}_3$  (Hasset, 1992).

Otra pérdida potencial de nitrógeno por volatilización, puede ocurrir con la aplicación a los suelos de urea como fertilizantes. La urea es enzimáticamente hidrolizada por las ureasas del suelo, dando como resultado la liberación de  $\text{NH}_3$ , lo que aumenta el pH (Tabatabai *et al.* 1972)

En las pruebas de biotratibilidad la cantidad de N y P necesarias para el desarrollo de los microorganismos es usualmente estimada tomando algunas medidas del C disponible en el sistema, incluyendo el contaminante y asumiendo una relación ideal de C/N/P (Skladany 1992).

## 9. Fósforo

Los fosfatos del suelo se pueden dividir en 2 grupos: inorgánicos y orgánicos. La proporción del P orgánico generalmente varía entre 25 y 75%. De acuerdo con la estructura química del suelo, en la materia orgánica, existen cinco tipos principales de compuestos fosfatados: fosfolípidos, ácidos nucleicos, fosfatos metabolizados, fosfoproteínas, y el hexafosfato de inositol (fitina), este último llega a constituir el 50% del P orgánico (Fassbender, 1987).

Por otra parte la forma inorgánica dominante en la solución del suelo son los iones fosfato tanto  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ó  $\text{HPO}_4^{2-}$  dependiendo del pH del suelo, sin embargo, se encuentran normalmente en el intervalo de pH de 4.0 a 8.5. Cuando el pH del suelo es cercano a 7.2 ambas formas están presentes en cantidades aproximadamente iguales (Hasset, 1992).

La disponibilidad del P en el suelo está controlada por la mineralización e inmovilización a través de la fracción orgánica y la solubilización y precipitación de formas inorgánicas de fosfato. Este P en los residuos orgánicos puede ser liberado y estar disponible para plantas y microorganismos. La biomasa microbiana puede afectar la disponibilidad de P a través de la inmovilización, y la incorporación de iones ortofosfato en formas orgánicas dentro del microorganismo. La relación C/P de un residuo adicionado puede determinar el grado por el cual el P inorgánico es mineralizado o inmovilizado. Si hay una insuficiencia de P disponible en el residuo para la asimilación del C adicionado, entonces el P inorgánico de la solución del suelo puede ser usado, y la inmovilización neta ocurre. Contrariamente, si más P esta presente la mineralización neta de ortofosfato ocurre (Wagner, 1998).

Generalmente, el P es adicionado en los suelos contaminados con hidrocarburos. La relación propuesta para una mezcla de biomasa microbiana en el suelo es 100:1. Varios estudios han mostrado que la adición de P puede estimular la degradación de hidrocarburos (Dibble *et al.* 1979; Mills, *et al.* 1992).

La adición de fósforo como fertilizante puede ser incluida en pruebas de biotratibilidad comúnmente en la forma de ortofosfato ó superfosfato triple (Skladany, 1992), ya que contiene entre 40 y 49% de  $P_2O_5$  que es la forma más disponible en el mercado (Yúfera, 1987).

## E. Uso de Materiales Texturizantes

Entre los materiales texturizantes de suelos más utilizados como están la composta y la fibra de coco, sus propiedades se mencionan a continuación.

### 1. Composta

Un suelo contaminado es a menudo pobre en materia orgánica y tiene una baja actividad microbiana. Usualmente la comunidad microbiana se adapta a la presencia del contaminante, pero otras condiciones ambientales tales como disponibilidad de nutrientes y concentración de  $O_2$  pueden ser desfavorables, por lo que la degradación del contaminante *in situ* es lenta.

Las tecnologías de composteo pueden ser aplicadas para sanear suelos contaminados fuera del sitio. Adicionando una matriz orgánica al suelo contaminado la actividad microbiana generalmente se aumenta y también la actividad de degradadores específicos, los cuales pueden encontrarse en el suelo contaminado o ser introducidos con el material orgánico (Jorgensen *et al* 2000).

La composta es utilizada para mejorar las características fisicoquímicas de los suelos como: aeración, además de mejorar ciertas características como son: suministro de N y P, así como mejoramiento del pH, y retención de agua, aspectos que favorecen la actividad microbiana (Hillel, 1980; Hupe *et al.* 1998). Además la capacidad de intercambio catiónico de el suelo también se puede ver beneficiada por la adición de compostas, este efecto es principalmente debido a la disociación de  $H^+$  de acidos débiles de la materia orgánica. Los sitios de intercambio catiónico de la materia orgánica son principalmente los grupos carboxílicos y fenólicos. (Stratton *et al.* 1995)

## 2. Fibra de Coco

La fibra de coco es un subproducto de la industria del coco que se encuentra disponible en grandes cantidades en los países productores de coco. La fibra de coco consiste en partículas de lignina y celulosa con una relación C/N de 80.

Este material tiene alta capacidad de retención de agua y se utiliza para mejorar las propiedades fisicoquímicas de los suelos. Además de mejorar la retención de agua, aumenta la disponibilidad de nutrientes, y la tasa de infiltración, así como la porosidad total (Bures, 1997). Tiene elevado contenido de materia orgánica (85 al 95 %), pero bajo contenido de nutrientes. Su pH varía entre 4.0 y 7.0, La porosidad total es superior al 80 %, con aeración muy elevada. Su densidad varía entre 50 y 400 kg/m<sup>3</sup> (Bures, 1997). Su capacidad de intercambio catiónico está entre los 31.7 a 95.4 meq/ 100g suelo, las concentraciones de nitrógeno disponible, calcio, magnesio y microelementos son relativamente bajas (0.28-2.81 mol m<sup>-3</sup>), mientras que el fósforo y potasio son considerablemente altos de entre 2.97-52.66 mol m<sup>-3</sup> (Abad *et al* 2002).



## IV. ANTECEDENTES

- Saval, (1997) llevó a cabo la biorremediación de un suelo contaminado con diesel, mediante la estimulación *in situ* de la microflora autóctona. El tratamiento consistió en adicionar fertilizantes y mantener la humedad constante en el propio sitio contaminado, durante 6 meses. El pH del suelo fue alcalino, arriba de 9, por lo que se decidió agregar ácido fosfórico con la finalidad de llevar el pH a la neutralidad y a la vez suministrar fosfatos como nutriente, con esto se favoreció la actividad de los microorganismos presentes en el suelo. A los 2 meses se observó una reducción en la concentración de diesel del 80% y después de 6 meses de tratamiento, la remoción fue del 98%. Con el fin de demostrar que se había llevado a cabo una biorremediación, a partir de una muestra del suelo saneado se obtuvo un cultivo en medio líquido con diesel como único sustrato, en la muestra se identificaron *Pseudomonas aureoginosa* y *P. fluorescens P. putida* en las mayores diluciones, con un 98% de confiabilidad. En el propio sitio, se observó crecimiento y desarrollo de las especies vegetales autóctonas, además de las que fueron sembradas (). A diferencia de los resultados positivos obtenidos en el sitio de estudio, las pruebas de biotratabilidad a nivel mesocosmos que pretendieron ser realizadas a nivel de laboratorio en palanganas de plástico no tuvieron éxito, ya que no se lograron simular las condiciones reales del sitio.
  
- En otro estudio se realizaron pruebas de biotratabilidad a escala de demostración en campo, para reducir el contenido de diesel y gasolina en agua subterránea y suelos contaminados, en una instalación de almacenamiento de combustibles localizada en el Valle de México. Para ello, diferentes lotes de agua subterránea conteniendo la mezcla de combustibles en fase libre en concentraciones superiores a 20,000 mg/kg, se inocularon con cultivos de bacterias degradadoras de diesel, además se adicionaron fuentes de nitrógeno amoniacal y fósforo en forma de fosfatos, y se proporcionó una ligera corriente de aire. Los resultados obtenidos durante el saneamiento del agua subterránea, indicaron una disminución en la concentración de diesel, casi del 100%. Los cultivos obtenidos de

estas pruebas se utilizaron como inóculo para tratar el suelo contaminado excavado del mismo sitio. Después de 2 meses de iniciada la biorremediación en forma de biolabranza, con riego y homogenización del suelo constantes, se observó que la concentración inicial de diesel (6,256 mg/kg) y de gasolina (313 mg/kg), se redujo en 99.77% y 100%, respectivamente. Esta prueba resultó exitosa para el tratamiento de agua subterránea y del suelo contaminados (Guzmán, 2001).

- En otro estudio realizado a nivel de microcosmos se evaluó el efecto de la concentración de diesel, nitrógeno y fósforo, así como la relación C:N:P durante la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado, aprovechando la actividad de la flora nativa. Los resultados de la caracterización del suelo proveniente del mismo sitio del que se utilizó para el presente estudio, permitió conocer las condiciones prevaletientes en el lugar (**Tabla IV.1**). Como parte importante del estudio se empleó una técnica estadística basada en la metodología de superficie de respuesta con un diseño experimental central ortogonal compuesto, a partir del cual fue posible conocer los efectos significativos de la concentración de diesel, de nitrógeno amoniacal y de fosfatos, así como las necesidades reales de nutrimentos requeridos para la óptima actividad metabólica de la flora nativa. Además, se encontró que la concentración original del diesel en el suelo, de 86,926 mg/kg, debe ser reducida a aproximadamente a 35,000 mg/kg para favorecer la degradación y se haga evidente la necesidad de mayores concentraciones de nutrientes (Zegarra, 2000). En ese mismo suelo se demostró una importante actividad biológica nativa, ya que las bacterias presentes, pertenecientes al género *Pseudomonas*, contenían los genes específicos para la degradación del diesel (Milcic *et al.* 2000).

**Tabla IV.1. Características químicas, microbiológicas y físicas del suelo contaminado con diesel y del suelo control**

Parámetro*	Suelo control		Suelo contaminado	
Concentración de diesel (mg/kg)	ND		86,926.31	
Humedad (%)	27.29		24.74	
pH	7.77		5.47	
Materia orgánica (%)	6.27		52.06	
Carbono orgánico (%)	3.64		30.26	
Nitrógeno total (mg/kg)	357.5		140	
Nitrógeno amoniacal (mg/kg)	6.0		2.73	
Fosfatos (mg/kg)	2.10		1.82	
Metales pesados lixiviables (mg/l)				
Bario	0.56		0.400	
Cadmio	0.030		ND	
Niquel	0.080		ND	
Plata	ND		0.370	
Carbonatos (mg/kg)	ND		ND	
Bicarbonatos (mg/kg)	126.9		28.1	
Cuenta de bacterias heterótrofas (ufc/g)	9.35 E5		1.16 E7	
Cuenta de bacterias potencialmente degradadoras de diesel (ufc/g)	8.65 E5		1.74 E7	
Capacidad de retención de agua (ml/kg)	312		536	
Densidad aparente (g/ml)	1.20		0.98	
Densidad real (g/ml)	2.31		1.90	
Porosidad (%)	47.98		48.67	
Clasificación textural	Migajón arenoso		Migajón arenoso	
Proporción de componentes (%)	Arena	Limo	Arena	Limo
	55	45	62.5	37.5

\* Concentraciones expresadas en base seca. ND: No detectado

- Varias investigaciones han demostrado que la biodegradación de contaminantes en un suelo puede verse aumentada por la adición de texturizantes orgánicos como la composta.

Además algunos estudios comparativos realizados sobre la degradación de hidrocarburos poliaromáticos en suelos, muestran que la degradación fue estimulada más efectivamente por adición de composta, que por adición de bacterias degradadoras (Kastner *et al.* 1996). Esto ha sido comprobado para antraceno y hexadecano (Kastner *et al.* 1995).

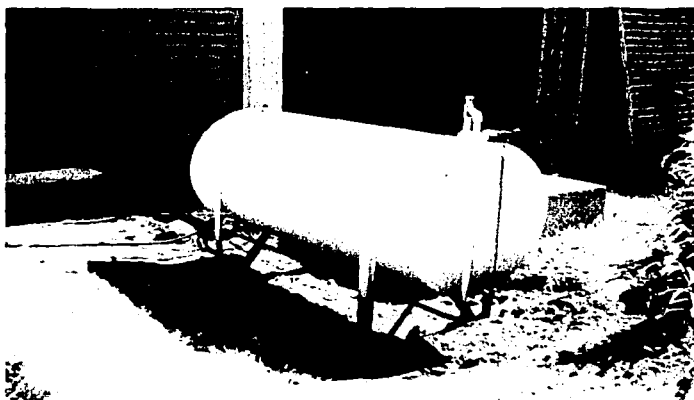
- Trabajos realizados en el Instituto de Geología por Rangel *et al* (en prensa) permitieron demostrar que la adición de fibra de coco a suelos mejora sus características físicas como: porosidad y la textura, así como la capacidad de campo, mientras que el pH y la conductividad eléctrica se mantienen constantes.
- Estudios de biotratibilidad que se realizaron en el laboratorio de manera simultánea con suelo proveniente del mismo sitio, a nivel de mesocosmos en charolas de vidrio, confirmaron que la adición de texturizantes orgánicos como composta y fibra de coco facilita la biodegradación del diesel como respuesta a la modificación de sus características físicas y al aporte de nutrientes naturales de fácil aprovechamiento (Dominguez, 2001; Pérez, 2001).

Con base en las experiencias anteriores, se realizó el presente estudio con el enfoque específico de conocer el comportamiento de la microflora natural presente en mayor proporción, así como su posible participación en la disminución de la concentración del diesel en pruebas de biotratibilidad a nivel de laboratorio.

## V. EXPERIMENTACIÓN

### A. Sitio de muestreo

El suelo contaminado se encontraba debajo de un tanque de almacenamiento de diesel, de 500 l de capacidad, que abastecía una planta de emergencia generadora de energía eléctrica, el cual, por falta de mantenimiento tuvo un goteo constante que duró aproximadamente 12 años. El suelo del lugar es un relleno artificial con un espesor de 4.60 a 6.40 m. La mancha de contaminación se localiza en la parte superficial cercana al tanque y llega aproximadamente a 5 m de profundidad (Instituto de Ingeniería y AMBSA, 1996). La **Figura V.1** muestra una vista del tanque.



**Figura. V.1. Tanque de almacenamiento de diesel**

## **B. Obtención de la muestra**

La muestra se tomó superficialmente, aproximadamente a 15 cm de profundidad, mediante excavación con ayuda de una pala de albañil. Se colectaron aproximadamente 12 kg de suelo en frascos de vidrio de 500 g de capacidad y se trasladaron al laboratorio donde se almacenaron a 4 °C hasta su procesamiento. Para llevar a cabo los análisis y las pruebas de biotratibilidad, se homogeneizó perfectamente la muestra con la finalidad de minimizar fuentes potenciales de variación durante la experimentación.

## **C. Técnicas Analíticas**

### **1. Caracterización física y química del suelo**

Para la caracterización del suelo se consideraron los siguientes parámetros físicos y químicos como son: nitrógeno total, nitrógeno amoniacal, fósforo (en forma de fosfatos), pH, humedad y capacidad de retención de agua.

- 1.1. Nitrógeno total. Se llevó a cabo por digestión ácida (Jackson, 1982; NOM DGN-AAA-24-1984), utilizando un equipo de digestión BÜCHI modelo 435 con extractor de humos y un destilador BÜCHI modelo 323.
- 1.2. Nitrógeno amoniacal. Se determinó por destilación en un equipo BÜCHI modelo 323, a partir de un extracto que se realizó con 450ml de NaCl al 10% por cada 100 g de suelo.
- 1.3. Fosfatos. Se realizó de acuerdo al método colorimétrico de Bray P-I (Jackson, 1982), empleando un espectrofotómetro Milton Roy Spectronic 20D.

- 1.4. pH. Se midió en una suspensión 1:2 de suelo - agua desionizada (Aguilera, 1986; Jackson, 1982) empleando un potenciómetro Conductronic modelo pH20 con electrodo de vidrio Corning G-p Combo W/RJ.
- 1.5 Porcentaje de humedad. Se cuantificó por gravimetría (NOM-AA-16-1984; Allison, 1985). El secado se realizó en un horno Felisa modelo 243 a 105°C.
- 1.6 Capacidad de retención de agua (CRA). Se determinó por el método de saturación del suelo con agua y drenando por gravedad (Carter, 1993).
- 1.7 Concentración de diesel. Se llevo a cabo por el método 8015 (USEPA 1966<sup>a</sup>), por extracción de hexano a reflujo y eliminación de agua con sulfato de sodio anhidro y de partículas de filtración a través de fibra de vidrio y centrifugación a 3000 rpm. Durante 15 min. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Varian mod.3350) con detector de ionización de flama (FID) a 300° C e inyector a 320° C.

## **2. Caracterización microbiológica del suelo**

Antes de llevar a cabo las pruebas de biotratibilidad se realizó una caracterización microbiológica inicial a partir de los microorganismos cultivables, tanto de bacterias heterótrofas y bacterias potencialmente degradadoras del suelo contaminado con diesel y un suelo control no contaminado cercano al punto de contaminación.

- 2.1 Conteo de bacterias potencialmente degradadoras. Se realizó conteo en placa, en un medio mineral con 100 microlitros de diesel industrial como única fuente de carbono.
- 2.2 Conteo de hongos y levaduras. Se determinaron mediante conteo en placa utilizando el medio agar-papa-dextrosa (Merck No. Catálogo 119).

2.3 Bacterias amonificantes. Se cuantificaron de acuerdo al método del Número Más Probable (NPM), según Katznelson (1946), utilizando un medio de crecimiento agar BBL-Gelatina nutritiva (Merck No. Catálogo 11481).

#### **D. Pruebas de biotratabilidad en laboratorio**

El suelo se mezcló con texturizantes orgánicos para mejorar sus características físicas, permeabilidad y estructura. Los texturizantes utilizados fueron composta y fibra de coco, los cuales se adicionaron en una proporción 1:1.3 para llevar la concentración de diesel de 86,926 mg/kg a 30,820 mg/kg (corresponde a una dilución del 34.51%), ya que en un estudio anterior (Zegarra, 2000) se encontró que la concentración de diesel debe ser reducida a 35,000 mg/kg, con lo cual se favorecerá la degradación.

Previamente, ambos texturizantes se secaron y se molieron para tener un tamaño de partícula homogéneo, posteriormente se esterilizaron 2 veces por espacio de una hora (1.5 lb a 120°C), con la finalidad de eliminar los microorganismos y esporas resistentes. Después de esterilizar, se dejaron airear de manera natural (sobre charolas de aluminio) aproximadamente un día para eliminar todos los compuestos volátiles presentes.

Las pruebas de biotratabilidad se realizaron en recipientes de vidrio con capacidad aproximada de 3 kg de suelo. (Ver apéndice 3) Se montaron cuatro pruebas diferentes por triplicado, y tres controles de la siguiente manera:

##### *Controles*

1. CC: Suelo no contaminado + composta (1 repetición)
2. Cfc: Suelo no contaminado + fibra de coco (1 repetición)
3. Sc: Suelo contaminado (triplicado)

##### *Tratamientos*

4. Sc + C: Suelo contaminado + composta (triplicado)



5. Sc + C + F: Suelo contaminado + composta + fertilizantes (triplicado)
6. Sc + Fc: Suelo contaminado + fibra de coco (triplicado)
7. Sc+Fc+F: Suelo contaminado + fibra de coco + fertilizantes (triplicado)

A los tratamientos correspondientes se les adicionaron fertilizantes previamente disueltos. La solución se preparó con urea y superfosfato triple, hasta alcanzar una relación C:  $\text{NH}_4^+:\text{PO}_4^{3-}$  de 100:15:0.1. Se mantuvieron a temperatura constante a 25°C, procurando mantener las condiciones óptimas de humedad (%) y así favorecer la actividad microbiana.

### **1. Seguimiento de las pruebas de biotratatabilidad**

Se llevaron a cabo muestreos al inicio del experimento ( $T_0$ ) a los 40 ( $T_1$ ) y 80 ( $T_2$ ) días, con la finalidad de tener un seguimiento de los grupos microbianos presentes a lo largo del tiempo así como de la biodegradación del diesel.

#### **1.1 Variables biológicas**

Se cuantificaron: bacterias potencialmente degradadoras de diesel (ufc/g.suelo), bacterias amonificantes (NMP), hongos y levaduras (ufc/g suelo).

#### **1.2 Variables químicas**

Se determinaron: contenido de humedad, pH, nitrógeno amoniacal, nitrógeno total y fosfatos.

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

\* Los datos de este capítulo fueron tratados como valores promedio para cada una de las gráficas. En el apéndice 2 se muestran los datos completos obtenidos para los análisis físicoquímicos, microbiológicos y degradación de diesel

### A. Bacterias potencialmente degradadoras de diesel

#### 1. Efecto de la humedad

El contenido de humedad del suelo es uno de los factores esenciales para la actividad microbiana, ya que ésta caracteriza no sólo la disponibilidad de agua para las reacciones metabólicas, sino también la disponibilidad de O<sub>2</sub> y la disolución de los nutrientes (Filonov *et al.* 1999).

El porcentaje de humedad máximo que puede mantener un suelo es una función directa de la capacidad de retención de agua, y a su vez, ésta depende de los componentes del suelo, principalmente de la materia orgánica.

En este trabajo, el hecho de haber incorporado materiales texturizantes al suelo contaminado modificó el contenido de materia orgánica y con ello la capacidad de retención de agua. De esta forma, para los tratamientos con fibra de coco (Sc+Fc, Sc+Fc+F y CFc) la capacidad de retención de agua osciló entre 1,115 y 1,723 ml/kg, en tanto que para los tratamientos con composta (Sc+C, Sc+C+F y CC) los valores estuvieron entre 133 y 389 ml de agua/kg de suelo (**Figura VI.1**). Esto comprueba que la fibra de coco es capaz de retener una mayor cantidad de agua, en comparación con la composta, y por lo tanto los porcentajes de humedad requeridos en presencia de fibra de coco fueron mayores por tener la misma consistencia.

Con base en lo anterior, para el suelo contaminado con diesel y composta, la humedad se encontró alrededor de 23% (Sc+C+F) y 31% (Sc+C) a lo largo del experimento (**Figura VI.2**). En tanto que para los tratamientos con fibra de coco, el porcentaje de humedad fue, de 43 % (Sc+Fc) y 57 % (Sc+Fc+F). Estas diferencias en humedad estuvieron de acuerdo a los resultados obtenidos en cuanto a la capacidad de retención de agua se refiere.

El porcentaje de humedad en el control de composta (CC) fue parecido a los tratamientos con adición de ésta (Sc+C y Sc+C+F). De la misma forma se observó en el control de fibra de coco (CFc) y los tratamientos con ésta (Sc+Fc y Sc+Fc+F). En todos los casos, al tiempo T1 se observaron porcentajes de humedad ligeramente mayores (en cierta medida por las condiciones de incubación) que en los otros tiempos de muestreo, T0 y T2, aunque conviene recordar que este parámetro se controló constantemente a lo largo de todo el experimento (Figura VI.2).

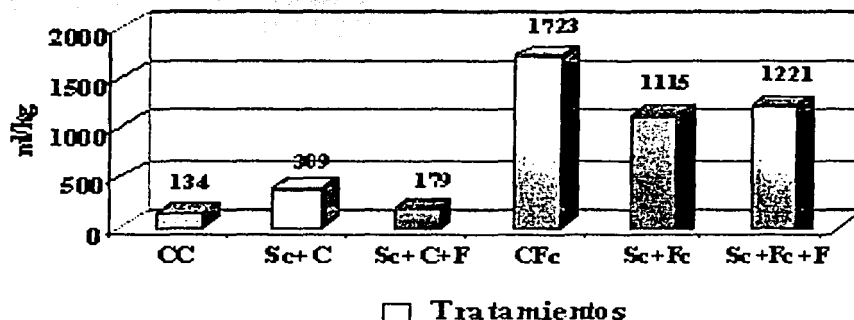


Figura. VI.1. Capacidad de retención de agua en los distintos tratamientos

Nota: en todas las figuras se utilizará la siguiente nomenclatura para distinguir entre las diferentes condiciones de tratamiento, tal como se mencionó en el capítulo de Experimentación.

#### Controles

- CC: Suelo no contaminado + composta
- CFc: Suelo no contaminado + fibra de coco
- Sc: Suelo contaminado (ver **Tabla IV.1**)

#### Tratamientos

- Sc + C: Suelo contaminado + composta
- Sc + C + F: Suelo contaminado + composta + fertilizantes
- Sc + Fc: Suelo contaminado + fibra de coco
- Sc + Fc + F: Suelo contaminado + fibra de coco + fertilizantes

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

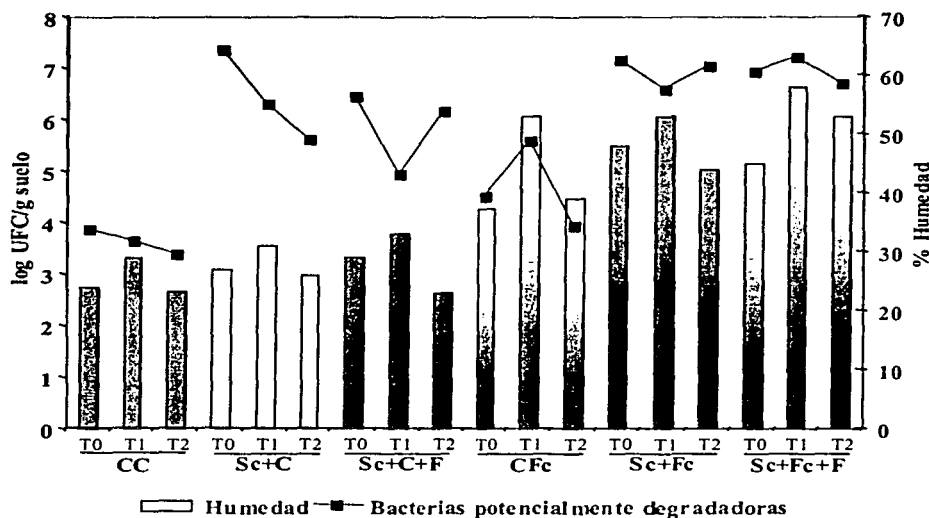
Algunos reportes señalan que un contenido de humedad superior al 15 %, puede ser óptimo para la biorremediación de un suelo, aunque otros señalan que una humedad menor al 40 % reduce la

tasa de biorremediación (Cookson Jr., 1995) . Lo importante es enfatizar que el porcentaje de humedad óptimo no puede ser una cifra o intervalo fijos, todo depende de las características del material que se va a tratar.

En el caso de la fibra de coco aunque el porcentaje de humedad fue mayor, la posibilidad de que los nutrientes quedaran absorbidos es baja, debido a su menor capacidad de intercambio catiónico de entre 31.7 a 95.4 meq/ 100g suelo (Abad *et al* 2002).

En los tratamientos Sc+Fc y Sc+Fc+F, el porcentaje de humedad estuvo sobre el 50 %, aunque en estos casos el porcentaje final de degradación de diesel fue mas bajo de 60.69 % (11,898,98 mg/kg) y 31.75 % (20,649.03 mg/kg) respectivamente comparado con los tratamientos a los cuales se les adicionó composta, como se puede apreciar en las Figuras VI.4 y VI.4.1.

Respecto a las bacterias potencialmente degradadoras (UFC/g suelo), el contenido en cada uno de los tratamientos parece no haber sido influenciado por la humedad del suelo, a pesar de que existieron variaciones entre los diferentes tratamientos y aún en uno mismo, como se puede apreciar en la Figura VI.2.



% Humedad	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
	24.0	28.9	23.2	27.4	31.0	25.7	28.6	32.5	23.2	37.0	53.1	39.0
	47.5	53.3	43.6	45.1	57.6	53.0						

Figura. VI.2. Porcentaje de humedad y su efecto sobre las bacterias potencialmente degradadoras

En el tratamiento Sc+C se obtuvieron cuentas de bacterias potencialmente degradadoras que fluctuaron entre  $10^5$  y  $10^7$  UFC/g de suelo, en tanto que en el Sc+Fc el número permaneció en  $10^7$  UFC/g suelo (Figura VI.2). Estas cifras son semejantes a lo encontrado por Watkinson y Morgan (1989), quienes señalan que el número de bacterias degradadoras de hidrocarburos presentes en suelos con historia de contaminación es típicamente entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/g de suelo.

Podría parecer extraño haber encontrado bacterias degradadoras en los controles de ambos tratamientos, los cuales fueron preparados con suelo no-contaminado, sin embargo, el suelo del lugar de estudio es suelo biológicamente activo y además, el hecho de haber adicionado composta o fibra de coco incrementa de manera importante el contenido microbiano, (no obstante que

ambos fueron esterilizados) no solo de bacterias heterótrofas típicas, sino de aquellas que son capaces de sobrevivir en ambientes extremos y degradar contaminantes orgánicos. Es posible que una proporción de las bacterias cuantificadas como degradadoras realmente no lo sean, pero sí demostraron tolerancia al diesel y capacidad para crecer en presencia de éste como único sustrato, por ello se decidió llamarlas bacterias potencialmente degradadoras.

Por otro lado, la diferencia de la población de bacterias potencialmente degradadoras cuantificada en los dos controles, CC y CF<sub>c</sub>, ( $10^3$  a  $10^5$  UFC/g suelo) es una medida de la población microbiana que aporta la composta y la fibra de coco. Esta población al igual que la del suelo no-contaminado, por estar presente en un sustrato rico en nutrientes se considera muy activa y puede tolerar e incluso degradar el diesel.

## 2. pH

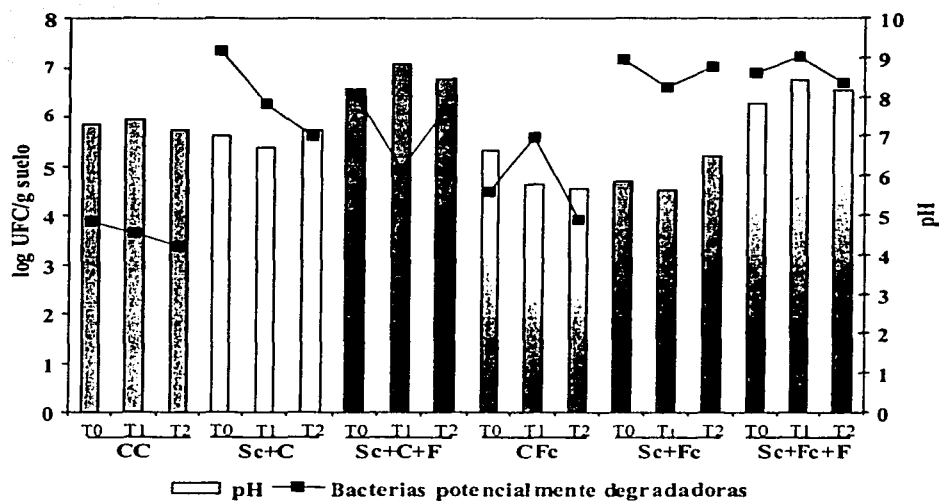
El intervalo de pH sugerido para el desarrollo de bacterias se encuentra entre la neutralidad a una ligera alcalinidad, esto es, entre 6 y 8 (Meeting Jr., 1992).

En general, los tratamientos con adición de fertilizantes presentaron los valores más altos de pH, alcanzando cifras superiores a 8 (Figura VI.3). Una explicación es que al suministrar la fuente de nitrógeno en forma de urea, su hidrólisis en el suelo lleva a la formación de amoníaco, el cual puede reaccionar con el agua y producir condiciones alcalinas al formarse hidróxido de amonio, además de promover aún más la volatilización del nitrógeno en forma de amoníaco (Mobley, 1992).

Por otra parte el resto de la urea que no se hidroliza, por sí misma también puede haber elevado el pH y mantenerlo a lo largo del tratamiento, ya que se menciona que alrededor de las partículas de urea, se pueden alcanzar valores de 8 y hasta 9 (Alexander, 1980).

Aun así el número de bacterias fluctuó entre  $10^6$  y  $10^7$  (UFC/g de suelo) sólo en el caso del tratamiento Sc+C+F T<sub>1</sub>, se observó una disminución a  $10^5$  UFC/g (Figura.VI.3), aunque algunos

datos sugieren que un pH arriba de 8.5, la actividad de bacterias potencialmente degradadoras de hidrocarburos podría ser limitada (Cookson Jr. *et al.* 1995).



pH	T0	7.3	5.8	8.2	6.6	5.8	7.8
	T1	7.4	6.7	8.8	5.8	5.6	8.4
	T2	7.1	7.1	8.5	5.7	6.5	8.2

Fig. VI. 3. pH y su efecto en las bacterias potencialmente degradadoras

### 3. Nitrógeno amoniacal

La concentración de nitrógeno amoniacal en los tratamientos sin fertilizantes fluctuaron entre 12.6 y 76.7 mg/kg, mientras que en los tratamientos con fertilizantes fueron muy altos, entre 2,894 a 5,620 mg/kg (Figura. VI. 7). Posiblemente estas diferencias se debieron a un exceso en la concentración de nitrógeno, del cual solo se utilizó lo necesario por parte de las bacterias, y el resto quedo en solución o en los sitios de intercambio del suelo.

Sólo se observó una disminución de nitrógeno amoniacal en el tratamiento Sc+Fc (T<sub>1</sub>) de 76.7 mg/kg a 43.3 mg/kg (T<sub>2</sub>), situación que se vio reflejada en el porcentaje total de degradación de diesel, ya que hubo una disminución de 19.91% a 60.69%. (24,000 mg/kg a 11,892 mg/kg) En cambio en el tratamiento Sc+C la concentración de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fue en aumento, el porcentaje final de degradación resultó ser de 72.25% de 30,820 a 8,553.21 mg/kg (Figura. VI.4 y VI.4.1). Una explicación a esto es la presencia de bacterias amonificantes las cuales incrementaron en numero (10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> UFC g/suelo) del T<sub>1</sub> al T<sub>2</sub>. Con esto se podría suponer que las bacterias potencialmente degradotas solo utilizaron el necesario para su metabolismo, y el resto se quedó en los sitios de intercambio y en la solución del suelo.

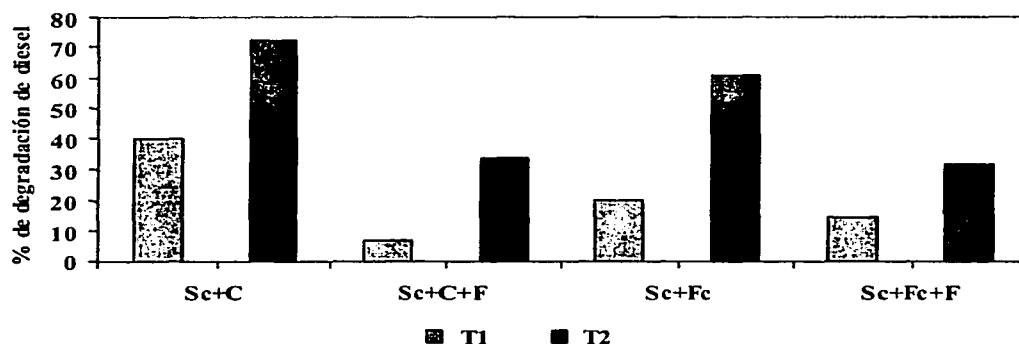


Figura VI.4 Porcentaje de degradación en los distintos tratamientos



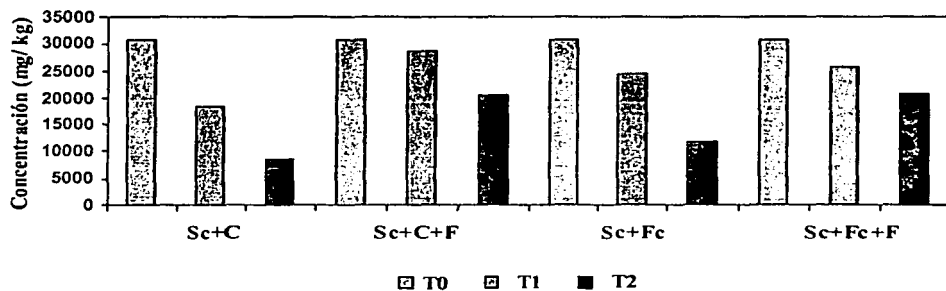


Figura VI. 4.1 Concentración de diesel en los tratamientos con y sin fertilizantes

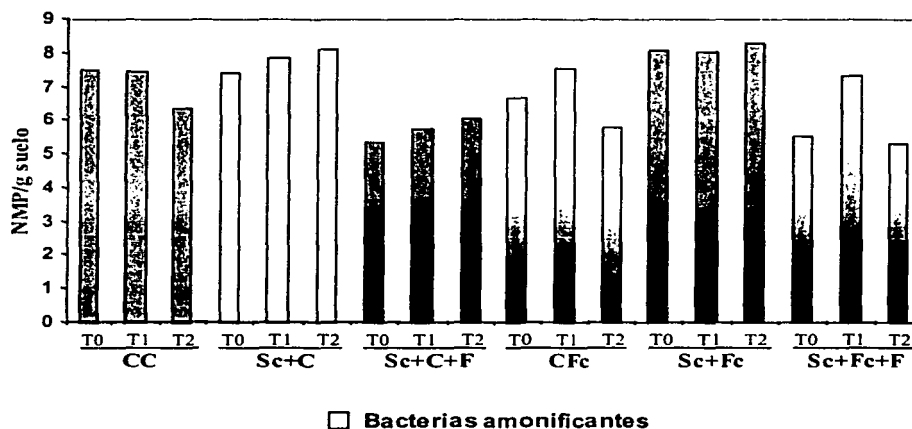


Figura VI. 5 Variación de bacterias amonificantes en los distintos tratamientos

La mineralización del nitrógeno orgánico a su forma inorgánica disponible como es el amonio, posiblemente se llevó a cabo por bacterias amonificantes, las cuales tuvieron valores de entre  $10^5$  y  $10^8$  NMP/g de suelo, durante casi todo el período de tiempo en el cual se realizaron las pruebas (Figura. VI. 5). De acuerdo con la literatura, entre las bacterias aerobias que participan en este proceso están: *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Escherichia*, y *Streptococcus* (Fassbender, 1987).

Sin embargo, Waksman (1931) señaló que los hongos pueden ser más activos que muchas bacterias, pero esto dependerá del suelo, la naturaleza del material orgánico, la aeración del suelo, y la presencia de nutrientes minerales. En conjunto, todos favorecerán el desarrollo de la flora activa, y por lo tanto, la naturaleza de la descomposición llevada por esta microflora.

Además, la cantidad de nutrientes disponibles como el amonio retenidos por el suelo puede estar determinado por varios factores como la textura, estructura, pero más particularmente por la capacidad de intercambio catiónico del suelo contenida por humus y arcillas (Tivy, 1990).

Para favorecer aún más el crecimiento de las bacterias potencialmente degradadoras, se adicionó una fuente extra de nitrógeno. Esto debido a que algunos reportes señalan que un suelo contaminado por un largo periodo de tiempo y en ausencia de un programa de biorremediación, será pobre en nitrógeno (Deni *et al.* 1999). Esto es porque comúnmente los combustibles derivados del petróleo son extremadamente deficientes en nitrógeno y la entrada de una gran diversidad de fuentes de carbono tiende a resultar en una rápida disminución del nitrógeno natural disponible (Morgan *et al.* 1989).

Además, generalmente en los ambientes naturales la biodegradación de compuestos orgánicos es a menudo lenta porque uno o más nutrientes necesarios para el desarrollo microbiano están en bajas concentraciones (Steffensen *et al.* 1995). Lo cual se hizo evidente en la caracterización inicial del suelo contaminado en el cual tuvo un contenido de nitrógeno total de 140 mg/kg y de 1.82 mg/kg de fósforo lo cual es considerado como un suelo pobre (ver Apéndice 1)

La incorporación de urea y su posterior hidrólisis a amonio posiblemente afectó la capacidad degradativa en los microorganismos, no solo por el aumento del pH, sino además por las altas

concentraciones de amonio, el cual es más evidente arriba de 300 mg/kg ( Dennis *et al.* 1993), además el amoníaco puede afectar la disponibilidad de sustratos carbonados como es el caso del diesel (Miller, 1992).

Aunque en nuestro caso no se cuantificó amoníaco, cuando se homogenizaba el suelo y se le adicionaba agua para mantener una humedad se percibió su olor característico que fue un indicador de que el nitrógeno estaba en exceso. Otro factor importante fue el pH, ya que el  $\text{NH}_4^+$  (ion amonio en forma acuosa) y  $\text{NH}_3$  (amoníaco gaseoso) están en un equilibrio y en pHs mayores de 8 se favorece más en la forma gaseosa ([www.cfe.cornell.edu/compost/cic.html](http://www.cfe.cornell.edu/compost/cic.html)).

Aunado al proceso de amonificación, se tiene la evidencia de que la actividad ureasa en el suelo puede incrementarse con el contenido de hidrocarburos debido al aumento en la biomasa microbiana la cual contribuye en la transformación de la fuente nitrogenada ( Xu *et al.* 1997).

Por otra parte aunque en cierta medida el proceso de amonificación, fue menor a los tratamientos a los cuales se adicionó nitrógeno, el número de bacterias amonificantes fluctuó ente  $10^5$  y  $10^7$  NMP/g de suelo, para los tratamientos con composta (Sc+C+F) y con fibra de coco (Sc+Fc+F) (Figura. VI. 5).

Con ambos procesos tanto la amonificación y en cierta medida la actividad ureasa una gran cantidad de amonio estaría presente en el suelo, del cual se utilizó sólo lo necesario para el desarrollo microbiano. El resto del amonio pudo haber permanecido en los sitios de intercambio, principalmente en el caso de la composta, ya que en ella se encuentran una gran cantidad de cargas negativas debido a la disociación de  $\text{H}^+$  de los grupos funcionales, como es el caso de los grupos carboxilo y fenol del humus de la materia orgánica ( Bohn *et al.* 1985).

Además, existen datos en los cuales se señala que el aumento en el contenido de materia orgánica, incrementa la capacidad de intercambio catiónico de entre un 20 y 80% en muchos suelos ( Wagner *et al.* 1998).

En general, tomando como base los tratamientos a los cuales no se les adicionó fuente de nitrógeno, la incorporación de ésta no tuvo un efecto benéfico sobre la degradación de diesel, aunque existieron bacterias potencialmente degradadoras en ambos tratamientos (entre  $10^5$  y  $10^7$  UFC/g de suelo) la disminución en la concentración de diesel fue de alrededor del 33.55% Sc+C+F y 31.75% Sc+Fc+F respectivamente, la cual representa casi la mitad, comparada con los tratamientos sin nutrientes (Figura VI.4 y VI.4.1).

De igual manera, en el suelo contaminado (Sc) fluctuó entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/g, ( Figura 6 ) sin embargo, debido a las condiciones fisicoquímicas predominantes en el suelo (Tabla IV.A .1.), la biodegradación se llevó a cabo, pero más lentamente. Figura VI. 6.1

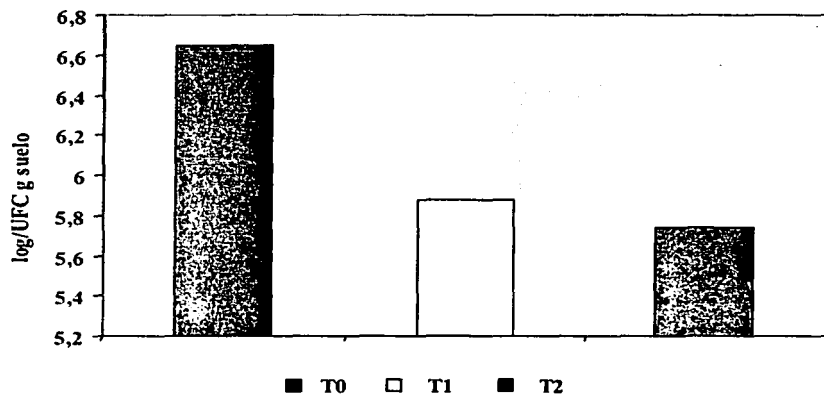


Figura VI.6 Determinación de la presencia de bacterias potencialmente degradadoras en el Suelo contaminado

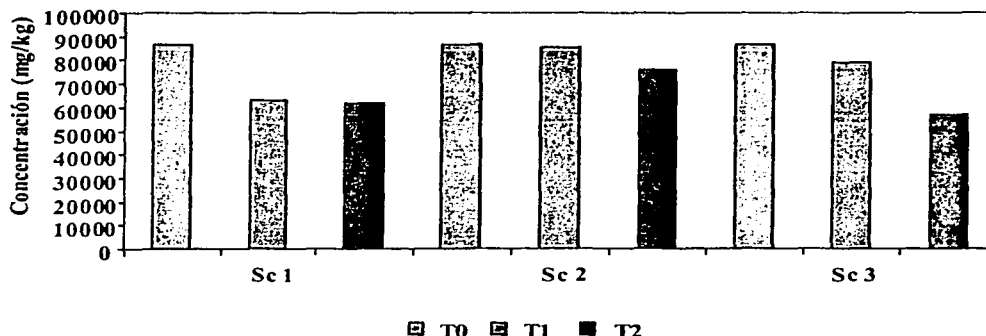


Figura VI. 6.1 Concentración de diesel en el suelo contaminado (Sc)

En algunos casos una concentración excesiva de nutrientes puede no tener un efecto inhibitorio en la biodegradación de hidrocarburos, sin embargo, la inhibición ha sido reportada en una tasa de aplicación de superior a 4,000 mg/kg de nitrógeno en el suelo ( Braddock *et al.* 1997).

En otro caso un suelo experimentalmente contaminado con diesel, la presencia o ausencia de nutrientes no influyó significativamente los conteos de organismos degradadores (Margesin *et al.* 2000).

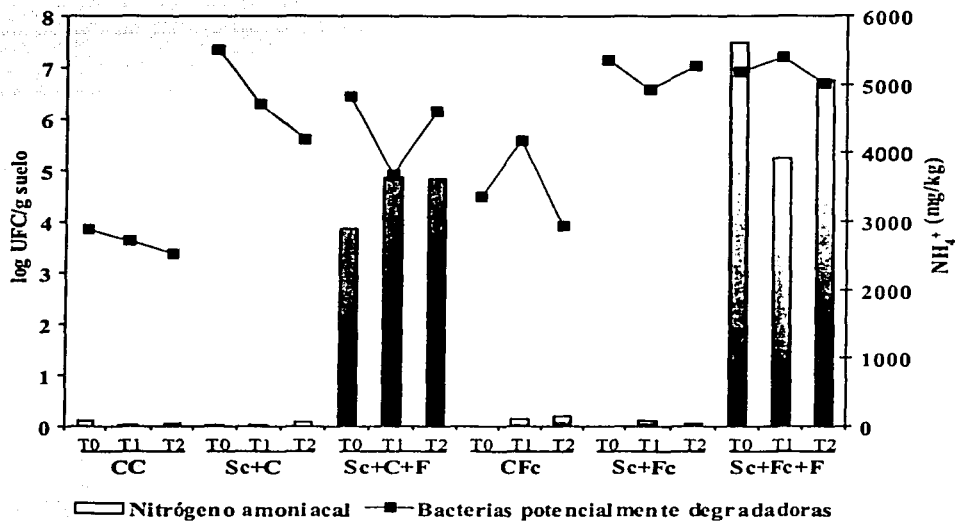
El mismo resultado fue obtenido por Van der Waarde *et al.* (1995), quienes asumieron que aunque el aumento en el número de bacterias es un indicativo de una estimulación en el proceso de biodegradación, esto puede no representar una franca medida de la biodegradación real, (Margesin *et al.* 2000) por lo que es indispensable determinar la disminución de la concentración del contaminante **Figura VI.4.1.**

Generalmente los niveles de N y P adicionados para estimular la biodegradación en sitios contaminados son a menudo estimados a partir de la relación C:N.

Los resultados observados en los tratamientos adicionados con nutrientes con base en una relación C:N:P 100:15:0.1 que fue evaluada en trabajos previos (Zegarra *et al.* 1998), parece no haber sido la más idónea para la biodegradación del diesel. Varios autores señalan relaciones consideradas óptimas para la biodegradación que varían mucho de caso a caso. Por ejemplo, una relación 120:10:1 es recomendada por Aislabe *et al.* (1998), otros autores incluyen solamente la relación C:N del orden de 100:1 (Frankenberger Jr., 1988), o bien, 9:1 ó 200:1. De aquí que no existe una relación universal que pueda ser aplicada a todos los suelos contaminados (Walworth *et al.* 1997). En nuestro caso particular, ésta parece no haber sido la ideal.

En general, se tienen datos en los cuales el suministrar nutrientes externos puede o no beneficiar el crecimiento microbiano, y por consiguiente la biodegradación del contaminante. Por ejemplo, algunos autores señalan que la degradación de contaminantes en el suelo puede no ser afectada por la adición de nutrientes, o bien, que la estimulación de la degradación del contaminante aparece días o semanas después de haber adicionado los nutrientes. Al respecto Johnson *et al.* (1999) proponen que la degradación en suelos contaminados se incrementará solo después de que las propias reservas de nitrógeno se vean disminuidas.

Así, en los tratamientos con adición de urea parece que la cantidad adicionada fue en exceso, lo cual se reflejó en una respuesta más lenta por parte de las bacterias potencialmente degradadoras, debido a las condiciones hostiles en el micro ambiente tanto por el pH alcalino, y un posible efecto inhibitorio por el nitrógeno amoniacal, aún cuando no se observó una gran diferencia entre las poblaciones potencialmente degradadoras, en los tratamientos con y sin adición de fertilizantes. **Figura VI.7**



Nitrógeno Amoniacal (mg /kg)	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2			
	95.9	16.7	35.9	12.6	20.9	57.2	2,894.0	3,632.4	3,618.2	3.1	105.0	158.2	7.4	76.7	43.3	5,620.9	3,913.4	5,064.9

Fig.VI . 7 Concentración de nitrógeno amoniacal y su efecto sobre las bacterias potencialmente degradadoras

#### 4. Nitrógeno total

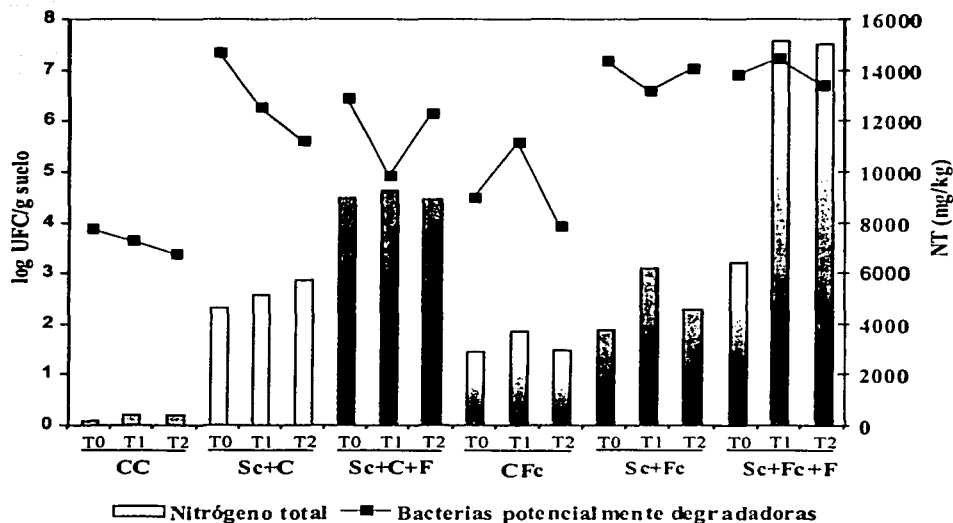
Los tratamientos a los cuales no se les adicionaron nutrientes, el nitrógeno que se encontraba en la materia orgánica del suelo, y la misma biomasa microbiana aportó nitrógeno total al suelo. Las mayores concentraciones fueron de 5,792 mg/kg (Sc+C) en el T<sub>2</sub> y 6,163 mg/kg (Sc+Fc) para el T<sub>1</sub> (Figura VI.8) lo cual es considerado como un contenido de nitrógeno extremadamente rico según, Aguilera, 1989; Vázquez, 1993; Tavera, 1985 (ver Apéndice 1) .

Algunos estudios señalan que los residuos orgánicos (como los texturizantes empleados en este estudio) pueden representar un aporte de fuentes de nutrientes fácilmente aprovechables, aunque el nitrógeno representa una pequeña fracción del total de la materia orgánica del suelo (Lunquist *et al.* 1999). El adicionar materia orgánica al suelo, también puede favorecer la actividad microbiana en general, así como el número de degradadores específicos de diesel entre  $10^7$  a  $10^8$  UFC/g debido a la disponibilidad de nutrientes como el nitrógeno, principalmente en el caso de la composta (Jorgensen *et al.* 2000), ya que el contenido de nitrógeno en la fibra de coco es más bajo.

Cabe destacar que otras formas orgánicas de nitrógeno como nitritos y nitratos que forman parte del nitrógeno total del suelo pudieron estar presentes, pero éstos no fueron cuantificados en este estudio.

Finalmente, en los tratamientos con adición de fertilizantes, se observaron los valores de nitrógeno total más altos, como era de esperarse. Éstos oscilaron entre 6,494 mg/kg a 15,132 mg/kg, en parte por la urea misma, que no se hidrolizó y se acumuló en el suelo, así como el nitrógeno contenido en la materia orgánica, los microorganismos y el amonio mismo (Figura VI.8.). Estos valores se encuentran muy por arriba de las concentraciones consideradas en un suelo típico extremadamente rico en nitrógeno (ver Apéndice 1), por lo que en este caso la degradación se vio afectada por el pH alcalino del suelo prevaleciente a lo largo del tratamiento, como ya se discutió anteriormente.





Nitrógeno Total (mg/kg)	T0	T1	T2
CC	184.2	407.8	419.2
Sc+C	4,620.0	5,126.0	5,792.0
Sc+C+F	8,693.0	9,251.0	8,880.0
CFe	2,900.3	3,710.0	2,962.3
Sc+Fe	3,737.9	6,193.0	4,579.0
Sc+Fe+F	6,494.0	15,132.0	15,045.0

Fig. VI. 8. Concentración de nitrógeno total y su efecto sobre las bacterias potencialmente degradadoras

## 5. Fosfatos

El fósforo existe en el medio casi en su totalidad en forma de fosfatos, por lo general como ortofosfatos, aunque muy poco puede estar disponible, ya que se puede presentar como fosfato inorgánico insoluble, particularmente de calcio o hierro (Campbell, 1987). La concentración de fósforo en solución comúnmente va de 0.1 a 1mg/l en el suelo, de éste más de la mitad puede estar en la forma de compuestos orgánicos solubles liberados por la muerte de células o en los componentes orgánicos coloidales (Mullen, 1998).

Estas formas orgánicas generalmente constituyen de un 50 a un 75% del fósforo total del suelo, en mayor medida como inositol hexafosfato conocidos como fitatos (Richardson *et al.* 1997).

Al adicionar los texturizantes, composta y fibra de coco, éstos pudieron contribuir con fósforo orgánico que posteriormente se mineralizó para formar ortofosfatos en solución, principalmente en la composta y con ello su utilización por parte de las bacterias y demás microorganismos, en la biodegradación del diesel. Sin embargo, se dice que los requerimientos de fósforo de la biomasa microbiana del suelo no es aún bien conocida (Lukito *et al.* 1998).

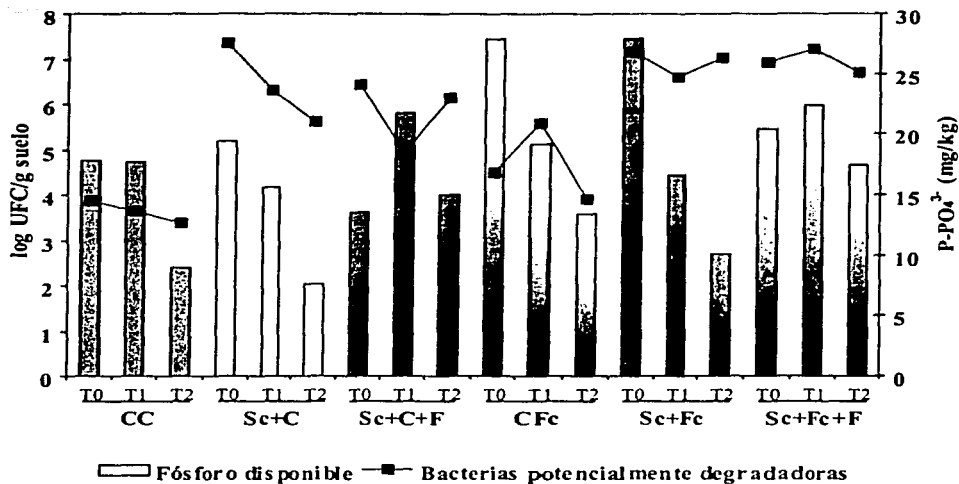
En el caso de los tratamientos sin fertilizantes, la cantidad de ortofosfatos disminuyó de 19.43 a 8 mg/kg (Sc+C), y de 28 a 10 mg/kg (Sc+Fc) al T<sub>2</sub> (Figura VI.9). Esto sugeriría una utilización de los mismos fosfatos en la formación de biomoléculas, ATP y ácidos nucleicos, requeridos para la degradación del diesel. Esto fue más evidente en el caso del tratamiento Sc+C del T<sub>0</sub> al T<sub>1</sub>, que presentó un 40.17% de biodegradación (Figura VI.4 y VI.4.1). Con esto se puede decir que existió suficiente fósforo disponible, y la posibilidad de quedar adsorbidos es mínima ya que la carga neta de la materia orgánica de la composta (principalmente humus) es negativa.

Con base en lo anterior, se esperaba que al adicionar un sustrato orgánico, además del fosfato triple se observaría un efecto positivo en el desarrollo microbiano, ya que el suelo contaminado original contenía niveles muy bajos de fósforo (Tabla IV.A.1). Sin embargo, algunos estudios señalan que el adicionar fósforo a suelos contaminados con hidrocarburos, puede no tener efecto alguno en un aumento de bacterias potencialmente degradadoras, que normalmente se esperaría después de la incorporación del mismo (Riser, 1992). En contraparte algunos otros autores señalan un aumento en el desarrollo microbiano y consecuentemente la biodegradación de ciertos compuestos orgánicos (Manilal *et al.* 1991).

De acuerdo con Mullen, (1998) la utilización neta de ortofosfato ocurre si la relación C:P es menor a 200:1, mientras que una relación C:P mayor a 300:1 resultará en inmovilización del mismo, por lo que relaciones intermedias resultarían en un pequeño cambio en las concentraciones de fósforo en solución.

Tomando como base que una de las relaciones C:P más recomendada es de 100:1 (Frankenberger, 1988), por lo que la relación C:P 100:0.1 podría haber resultado en una inmovilización del mismo, y como consecuencia no habría una biodegradación eficiente del diesel, o bien, el proceso se haría más lento debido al exceso en la fuente de carbono (Alexander, 1981).

Sin embargo, aunque el número de bacterias potencialmente degradadoras permanecieron entre  $10^5$  a  $10^7$  UFC/g de suelo en los tratamientos a los cuales se les adicionó fertilizante parece ser que su utilización de fosfatos en efecto fue más lenta, ya que en el T<sub>1</sub> se observó un aumento a 22 mg/kg en ambos tratamientos, posiblemente producto de la mineralización del mismo, aunque la biodegradación no fue evidente en esta primera parte, para Sc+C+F y Sc+Fc+F. Solo una ligera disminución de 15 y 17 mg/kg, respectivamente, se observó al final de los tratamientos, (Figura VI.9) lo cual se podría deber a una utilización asociada a la degradación del diesel en este lapso de tiempo (Figura VI.4 y VI.4.1).



Fósforo disponible (mg/kg)	T0	17.8	19.4	14.0	27.9	28.0	20.0
	T1	17.6	15.9	22.0	19.2	17.0	22.0
	T2	9.0	8.0	15.0	13.5	10.0	17.0

Fig. VI. 9. Concentración de fosfatos y su efecto sobre las bacterias potencialmente degradadoras

## B. Hongos y Levaduras

### 1. Humedad

La ventaja competitiva entre bacterias y hongos en suelos cambia marcadamente con los niveles de humedad (Griffin *et al.* 1980), la cual es considerada el factor primario que determina la actividad fúngica (Winterhoff *et al.* 1992).

En los tratamientos a los cuales se les adicionó fibra de coco donde el contenido de humedad fue de entre 43 y 57% en promedio (**Figura VI.10.1**) el desarrollo de hongos varió entre  $10^5$  y  $10^6$  UFC/g de suelo para el tratamiento Sc+Fc, de manera similar al CFc. En tanto que, para el Sc+Fc+F solo se limitó al T<sub>0</sub> y T<sub>1</sub> a  $10^6$  UFC/g de suelo, respectivamente, no obstante las condiciones alcalinas del suelo.

En lo que respecta a los tratamientos adicionados con composta, el crecimiento solo se observó en el tratamiento Sc+C, en donde el porcentaje de humedad fue menor, se tuvo una variación entre  $10^4$  y  $10^6$  UFC/g de suelo, lo cual fue semejante a lo encontrado a el CC y el suelo contaminado con diesel (Sc) (**Figura VI.10**). Cabe destacar que en el tratamiento Sc+C+F, no se obtuvo crecimiento, principalmente debido a las condiciones hostiles en cuanto al pH del suelo.



**Figura VI.10** Determinación de UFC para hongos y levaduras en el Sc

Por otra parte, aunque existen estudios sobre los requerimientos de agua para el desarrollo de las levaduras, estos son principalmente enfocados a la industria alimentaria, en donde se maneja como actividad de agua, la cual describe la concentración de agua libre en un ambiente específico (Rose, 1987).

Así se tuvo que en los tratamientos en los que el porcentaje de humedad fue mayor (Sc+Fc, Sc+Fc+F y CFe) la cuenta de levaduras osciló entre  $10^5$  y  $10^{11}$  (UFC/g de suelo), al igual que en los tratamientos restantes (Sc+C, Sc+C+F, CC y Sc) donde la variación fué entre  $10^4$  y  $10^8$  UFC/g de suelo (Figuras VI.10.1 y VI.10). En ambos casos los valores resultaron ser relativamente más altos a lo encontrado en suelos de zonas templadas que son de aproximadamente de  $10^3$  UFC/g, aunque con un intervalo de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/g de suelo (Vishniac, 1995).

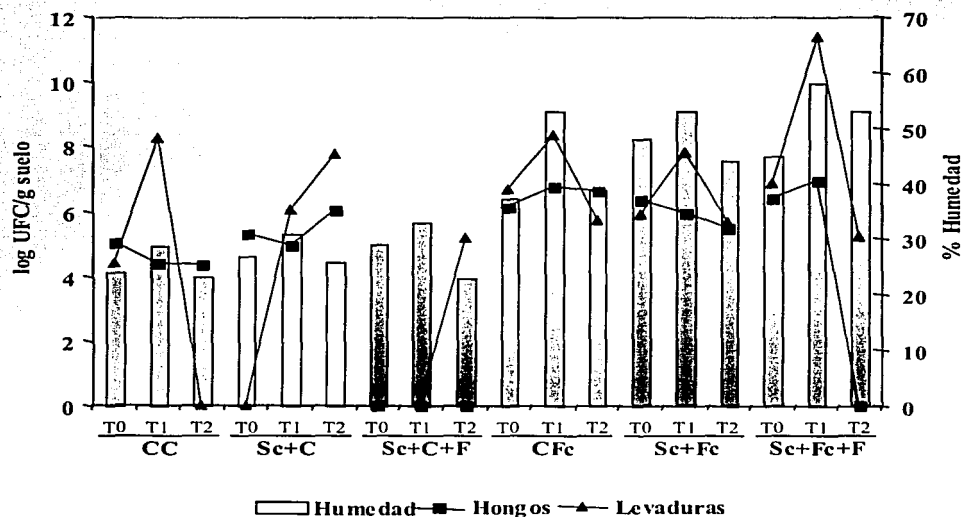


Fig. VI. 10.1. Porcentaje de humedad y su efecto sobre el desarrollo de hongos y levaduras

## 2. pH

La influencia del pH sobre el desarrollo y metabolismo fúngico es complejo. Los hongos característicamente toleran valores de pH bajos y muchos tienen un pH óptimo entre 5 y 7 para desarrollarse (Barry, 1984).

De esta manera, los tratamientos sin fertilizantes en donde predominó un pH de ligeramente ácido a neutro, se encontró el mayor crecimiento, de entre  $10^4$  y  $10^8$  UFC/g de suelo. Por el contrario en los tratamientos a los que se les adicionaron fertilizantes se vio limitado su desarrollo por el pH arriba de 8, y sólo en el tratamiento Sc+Fc+F se obtuvo cierto crecimiento (**Figura VI. 11**).

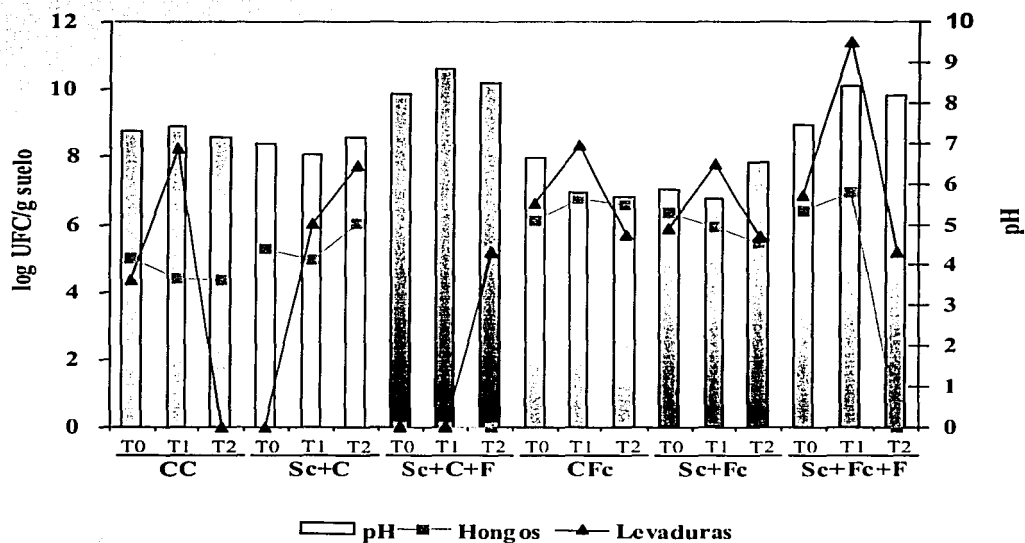
Aunque no es considerado un pH óptimo para su crecimiento, algunas especies como *Aspergillus niger* puede desarrollarse sobre un intervalo de pH entre 1.5 y 9.8 (Smith, 1994). Sin embargo, Boulter (2000) señala que gran parte de los hongos generalmente toleran intervalos de pH entre 5.5 y 8.0, y que el límite superior de pH en el cual pueden subsistir los hongos estará determinado por la precipitación de los nutrientes esenciales de el medio en donde se encuentran, mas que por el pH mismo.

Por otra parte, en lo que se refiere a las levaduras, se ha encontrado que prefieren intervalos de pH de 3.0 a 6.5, y en menor grado condiciones más ácidas ó más alcalinas, pH arriba de 8. (Walker, 1998; Schmitz, 2000). La presencia de levaduras en donde el pH se mantuvo arriba de 8 (Sc+C+F, Sc+Fc+F) pudo deberse en cierta medida a la heterogeneidad del suelo, ya que pueden existir micrositios en donde el pH puede variar en dos o mas unidades en distancias considerablemente pequeñas (Meeting Jr., 1992). Algunos estudios también han señalado la posibilidad de que en el suelo parte de la población se pueda encontrar encapsulada cuando las condiciones resultan adversas para su crecimiento (Vishniac, 1995). De esta manera, se podría explicar en cierta manera su presencia, en los tratamientos con adición de fertilizantes.

Lo anterior podría ir de acuerdo con la concentración final de diesel registrada en los tratamientos Sc+C+F y Sc+Fc+F, en los cuales la disminución fué alrededor de un 30% de la concentración inicial (**Figura VI.4**). Contrario a esto en los tratamientos en donde el pH fluctuó entre ligeramente ácido a neutro, (Sc+C, Sc+Fc) y aunque su crecimiento fue variable de entre  $10^4$  a

$10^{10}$  UFC/g suelo, se podría sugerir cierta participación de las levaduras en la degradación del diesel presente en el suelo.

Aunque generalmente se cree que los hongos y levaduras están sólo marginalmente involucrados en la degradación de hidrocarburos existen reportes, en los cuales se señala el aislamiento de levaduras que degradan componentes del crudo en suelos contaminados (Margesin *et al.* 2000; Palittapongarpim *et al.* 1998). En estos se observó una habilidad de degradación de *Candida tropicalis* superior a la de las bacterias, y la selección de levaduras en los sitios contaminados reportados, sugieren que las levaduras pueden ser miembros establecidos de comunidades degradadoras (Schmitz *et al.* 2000).



pH	T0	7.3	5.8	8.2	6.6	5.8	7.8
	T1	7.4	6.7	8.8	5.8	5.6	8.4
	T2	7.1	7.1	8.5	5.7	6.5	8.2

Fig. VI. 11. Determinación del pH y su efecto sobre el desarrollo de hongos y levaduras



### 3. Amonio

La mayoría de los hongos pueden usar amonio como la única fuente de nitrógeno en su metabolismo (Garraway *et al.* 1991), como es el caso de especies de *Alternaria*, *Aspergillus* y *Penicillium* entre otras (Pateman *et al.* 1984).

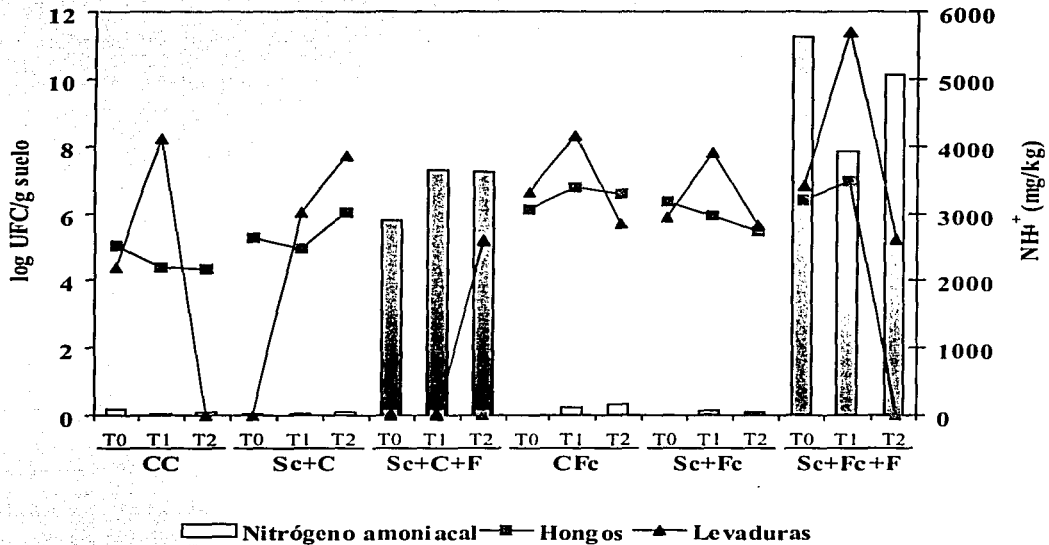
Así, aunque las concentraciones de amonio en los tratamientos sin adición de fertilizantes, son consideradas bajas (ver Apéndice 1), los hongos pudieron utilizar fuentes alternas como nitratos y nitritos, aunque este último puede ser tóxico para algunos hongos y bacterias (Pateman *et al.* 1984).

El número de hongos en dichos tratamientos además de los controles (CFc, CC y Sc) fluctuó entre  $10^4$  y  $10^6$  UFC/g de suelo (Figuras VI.12 y VI.10) lo cual es semejante al número encontrado en muchos suelos con valores a menudo de entre  $10^4$  y  $10^6$  UFC/g de suelo (Thorn, 1997). Debido a esto es de suponer que los hongos pudieron haber contribuido en la biodegradación del diesel. Por ejemplo, Garraway (1991) señaló que algunos hongos como *Cladosporium* se desarrollan sobre sustratos como diesel, kerosina y parafinas. Algunos otros como *Aspergillus terreus*, *A. Flavus* y *Penicillium* degrada hidrocarburos poliaromáticos como antraceno y fluorantreno. (Mahmood *et al.* 1993).

Por otra parte, los hongos también se pudieron beneficiar con la actividad microbiológica por la liberación de amonio en el suelo, ya que el número de bacterias amonificantes fue alto ( $10^8$  UFC/g), a lo largo del experimento (Figura VI.5). Aunque también se tienen reportes de muchos hongos filamentosos que pueden romper proteínas y péptidos para utilizar el nitrógeno que se encuentra en sus moléculas (Dunn, 1985).

Lo anterior confirma como la abundancia y actividad de los hongos, puede variar considerablemente, siendo un factor importante las variaciones en la concentración de nutrientes como el  $\text{NH}_4^+$  en la biodegradación de hidrocarburos. Finalmente, en los tratamientos con adición de fertilizantes, aunque existía suficiente amonio la actividad de hongos se vió inhibida, salvo un ligero crecimiento en  $T_0$  y  $T_1$  del Sc+Fc+F (Figura VI.12).

Por lo que respecta a las levaduras, algunos reportes señalan que generalmente utilizan iones amonio como fuente de nitrógeno (Rose, 1987), sin embargo la urea también es usada ampliamente (Walker, 1998). De acuerdo con esto en los tratamientos sin fertilizantes el mayor número de levaduras (Figura VI.12) coincidió en donde la concentración de amonio fue mayor, tanto para el tratamiento Sc+C (T<sub>2</sub>) y Sc+Fc (T<sub>1</sub>), el cual podrían haber utilizado como fuente de nitrógeno en la degradación del diesel.

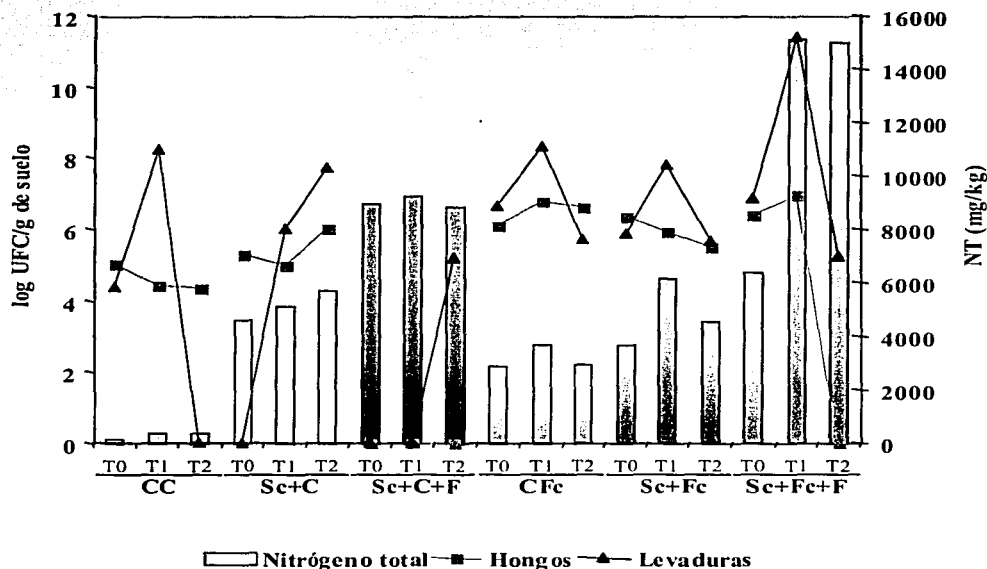


Nitrógeno Amoniacal (mg/kg)	T0	95.9	12.6	2,894.0	3.1	7.4	5,620.9
	T1	16.7	20.9	3,632.4	105.0	76.7	3,913.4
	T2	35.9	57.2	3,618.2	158.2	43.3	5,064.9

Fig. VI. 12. Concentración de nitrógeno amoniacal y su efecto sobre el desarrollo de hongos y levaduras

#### 4. Nitrógeno total

Existieron grandes diferencias entre el nitrógeno amoniacal y el nitrógeno total del suelo (Figura VI. 12 y13). Con lo anterior se puede decir que la presencia de hongos en el suelo, contribuyó de manera significativa a la reducción de la concentración del diesel, en los tratamientos Sc+C y Sc+Fc, ya que existió un suministro adecuado de nitrógeno. En el caso de los tratamientos Sc+C+F y Sc+Fc+F aunque la concentración de nitrógeno total fue mucho mayor (Figura VI.13), la presencia de los hongos pudo haber estado limitada tanto por el pH, como se mencionó anteriormente como por el exceso de nitrógeno acumulado en la solución del suelo, que pudo resultar tóxico para su desarrollo.



Nitrógeno Total (mg/kg)	T0	T1	T2
CC	184.2	407.8	419.2
Sc+C	4,620.0	5,126.0	5,792.0
Sc+C+F	8,693.0	9,251.0	8,880.0
CFe	2,900.3	3,710.6	2,962.3
Sc+Fe	3,737.9	6,193.0	4,579.0
Sc+Fe+F	6,494.0	15,132.0	15,045.0

Fig. VI. 13. Concentración de nitrógeno total y su efecto en hongos y levaduras

## 5. Fosfatos

Los hongos se encuentran altamente adaptados para la obtención de fósforo del suelo, en varias formas, liberando enzimas fosfatasa al medio (que rompen las formas orgánicas de fosfato), o bien, solubilizando los fosfatos inorgánicos por liberación de ácidos orgánicos al suelo (Deacon, 1997).

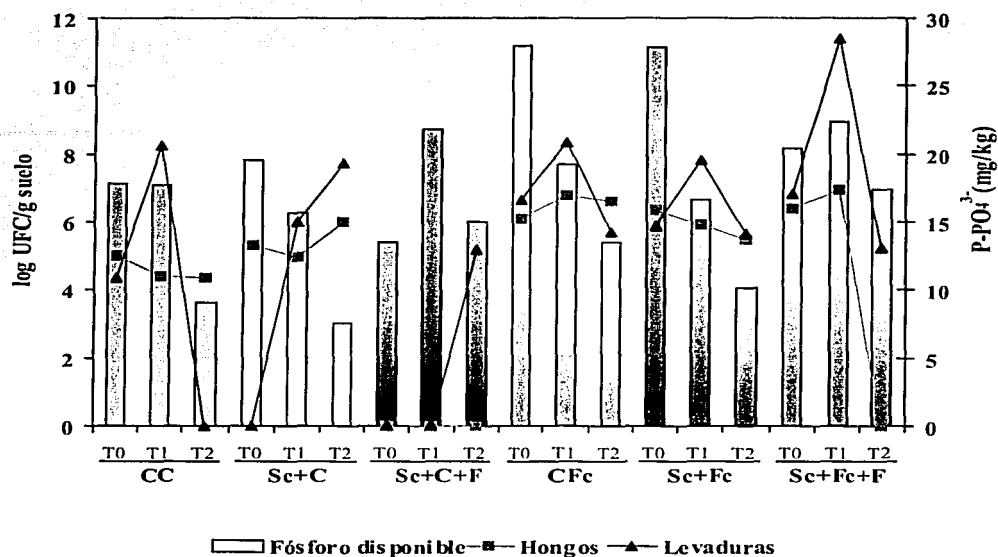
Aunque el contenido de fosfatos en el suelo fue relativamente bajo para los tratamientos sin adición de fertilizantes (Sc+C y Sc+Fc), se observó una disminución en el mismo a lo largo del experimento, que es un indicio de la utilización del mismo (**Figura VI.14**). De acuerdo con esto, algunos reportes señalan que el ión fosfato monobásico es asimilado por los hongos (Pateman *et al.* 1984), que es la forma predominante en intervalos de pH entre 4 y 7.2.

Si los nutrientes están disponibles como el fósforo, sólo será cuestión de tiempo antes de que los microorganismos lo utilicen. Además, debido a la versatilidad que tienen los hongos para la obtención del mismo, estos pudieron desarrollarse adecuadamente, y contribuir en la biodegradación del diesel.

Por lo que respecta a los tratamientos a los cuales se les adicionó fosfato triple, se esperaría un mayor desarrollo, pero debido a las condiciones fisicoquímicas del suelo el resultado no fue óptimo. Ya que, a un valor de pH arriba de 6 la tasa de consumo de fósforo declina rápidamente en los hongos (Pateman *et al.* 1984), por lo que es de suponerse que aunque había fosfato inorgánico disponible, no fue utilizado completamente, y mostró una pequeña disminución (**Figura VI.14**).

En el caso de las levaduras pueden ser aprovechados tanto el ortofosfato y fosfatos inorgánicos condensados como fuentes comunes de fósforo (Walker, 1998). De esta forma los requerimientos de fósforo pudieron haber quedado satisfechos, ya que se observó el desarrollo de levaduras en ambos tratamientos sin adición de fertilizantes (**Figura VI.14**). Cabe señalar que sólo en el tratamiento Sc+Fc+F (T<sub>1</sub>) es en donde se obtuvo el valor más alto de UFC/g, de  $10^{11}$ , y en donde se tuvo la mayor concentración de fosfatos, el cual pudo ser utilizado para su crecimiento y por

ende su posible participación en la degradación del diesel, no obstante las condiciones adversas en donde su efecto en mayor medida se reflejó en los hongos.



Fósforo disponible (mg/kg)	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
	17.8	17.6	9.0	19.4	15.9	8.0	14.0	22.0	15.0	27.9	19.2	13.5
	28.0	17.0	10.0	20.0	22.0	17.0	20.0	22.0	17.0	20.0	22.0	17.0

Figura. VI. 14. Concentración de fosfatos y su efecto sobre el desarrollo de hongos y levaduras

Falta Página

6 0

## VII. CONCLUSIONES

- ✓ Mediante el uso de medios de cultivo selectivos se logró la determinación de grupos microbianos, tales como bacterias potencialmente degradadoras de diesel, bacterias amonificantes, hongos y levaduras en los distintos tratamientos aplicados a un suelo contaminado con diesel..
  
- ✓ La utilización de texturizantes orgánicos además de su efecto como diluyente, mejoró las características fisicoquímicas del suelo, así como el aporte de nitrógeno y fósforo disponible, lo cual se reflejó en la disminución de la concentración de diesel; esto se observó más claramente en los tratamientos sin fertilizantes.
  
- ✓ El uso de la urea como fuente de nitrógeno, afectó de manera negativa a los microorganismos tanto en su desarrollo como en su capacidad degradadora de diesel, principalmente por las condiciones alcalinas que predominaron a lo largo del experimento, siendo más evidente en el caso de hongos y levaduras.
  
- ✓ La adición de una fuente de fosfatos en forma de fertilizante parece no haber sido necesario para la actividad microbiana, ya que en ambos texturizantes contenían fósforo disponible suficiente para la población existente.
  
- ✓ El aporte de amonio por parte de las bacterias amonificantes, en los tratamientos Sc+C y Sc+Fc pudo haber contribuido en cierta medida a la actividad de los microorganismos potencialmente degradadores de diesel.
  
- ✓ El número de bacterias potencialmente degradadoras , osciló entre  $10^5$  y  $10^7$  ufc/g.suelo en los tratamientos con y sin fertilizantes, además del suelo contaminado (Sc), sin embargo el mayor porcentaje de degradación se obtuvo en los tratamientos Sc+C y Sc+Fc, con un 72.25 % y 60.69 % lo que representa una reducción de 30,000 a 8,553 y 11,892 mg/kg de diesel, respectivamente.

- ✓ La cuenta de hongos en los tratamientos sin nutrientes osciló entre  $10^5$  y  $10^6$  ufc/g suelo, semejante a lo encontrado en el suelo contaminado (Sc), esto sugiere que la presencia diesel no interfirió en su metabolismo.
- ✓ La cuenta de levaduras en los tratamientos Sc+F y Sc+C, fue mas variable entre  $10^5$  y  $10^8$  ufc/g suelo, por lo que pudo haber existido un efecto del diesel sobre el crecimiento de las levaduras.
- ✓ En los tratamientos con adición de fertilizantes el número de hongos y levaduras resultó muy variable, ( ND a  $10^{11}$  ufc/g suelo) en parte debido al pH alcalino y a exceso en la concentración de nitrógeno, lo cual pudo inhibir su actividad, y consecuentemente la concentración final de diesel la cual resultó de 20,480 (33.55%) y 20,649 (31.75%) mg/kg para el tratamiento Sc+C+F y Sc+Fc+F respectivamente.
- ✓ En lo que se refiere a la variabilidad en los análisis fisicoquímicos en la mayoría de los casos resultó con valores cercanos al 10 %, lo cual confiere representatividad a los datos, con excepción del amonio (78 % en algunos casos). Esto se debe a que normalmente esta sujeto a cambios muy rápidos a través de procesos como amonificación, nitrificación y desnitrificación.
- ✓ En cuanto a los análisis microbiológico, presentó una variabilidad mayor al 10 %; en parte se debió al hecho de tener diferentes lotes, (por tratamiento) además de la variabilidad intrínseca que puede existir en un sistema como es el suelo.
- ✓ Finalmente cabe destacar que aún cuando en el mejor tratamiento (Sc+C) también existieron variaciones en cuanto a microorganismos se refiere, posiblemente interactuaron de manera tal, que cada uno utilizó las diferentes fracciones del diesel de acuerdo a su menor o mayor complejidad estructural como una fuente de carbono fácilmente asimilable, ya que tanto bacterias, hongos y levaduras poseen capacidades metabólicas muy particulares, lo cual se reflejo en el % final de degradación del combustible.



## VIII. RECOMENDACIONES

Algunos de los aspectos que se recomiendan para poder en un futuro continuar con investigaciones de este tipo son las siguientes:

- Realizar experimentos de degradación de diesel considerando exclusivamente hongos y levaduras, con el fin de confirmar su posible participación en la degradación de diesel.
- Confirmar si las bacterias que fueron cuantificadas son verdaderas degradadoras de diesel y proceder a su identificación. Esto incluye aquellas que corresponden al control del suelo no contaminado.
- Realizar el análisis de la capacidad de intercambio catiónico del suelo en los tratamientos con y sin texturizantes, con lo cual se podría entender el comportamiento fisicoquímico general del suelo, así como su interacción con los microorganismos y su implicación en la degradación del diesel.
- Evitar la adición de fertilizantes, ya que la cantidad de nitrógeno y fósforo aportada por los texturizantes, sobre todo en el caso de la composta, fueron suficientes para los microorganismos.
- Esterilizar los texturizantes mediante otro método que asegure una completa eliminación de la actividad microbiológica.

# BIBLIOGRAFIA

- Aguilera N, 1989. *Tratado de edafología de México*; Tomo I, Facultad de ciencias, UNAM, pp 96.
- Aislabie J, Mcleod M, Fraser R, 1998. Potential for biodegradation of hydrocarbons in soil from the Ross Dependency, Antártica; **Applied Microbiology and Biotechnology**, Vol 49, 210-214.
- Alexander M, 1980. *Introducción a la microbiología del suelo*; AGT Editor, México, pp 13-21, 63, 243-270, 355-371.
- Allison L. E., et al., 1985. *Diagnóstico y rehabilitación de suelos salinos y sódicos*; Ed Limusa, México. Editado por Richards L.A. 6ª Edición.
- Atlas R, 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective microbiological reviews; **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 45, No 1, 180-209.
- Atlas R, and Bartha R, 1973c. Abundance distribution and oil biodegrading potential of microorganisms in Raritan bay. **Environmental Pollution**, Vol 4:291-300.
- Balba T, 1993. Microorganisms and detoxification of industrial waste; In *Exploitation of microorganisms*; Champan Hall, pp 380-392; , Cambridge, Great Britain.
- Balba M, Al-Awadhi R, Al Daher, 1998. Bioremediation of oil contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation; **Journal of Microbiological Methods**, Vol. 32, 155-164.
- Bear E, 1963. *Química del suelo*; Ed Interamericana, Madrid, España pp 129-131.
- Bennett J. and Faison B, 1997. Use of fungi in Biodegradation; In *Manual of Environmental Microbiology*, Hurst C.J. ASM Press. Wash.D.C USA pp 758-765.
- Berry D, 1976. The environmental control of the physiology of filamentous fungi; In *The filamentous fungi*, Vol.2 Biosynthesis and Metabolisms; Edward Arnold, London, Great Britain pp 25-27, 367.
- Bohn L, 1985. *Química del suelo*, Limusa, México, pp 167.
- Boopathy R, 2000. Factors limiting bioremediation technologies; **Biosource Technology**, Vol. 74, 63-67.

- Bottolomey P, 1993. Microbial activity in soil; **Current Opinion in Biotechnology**, Vol 4, No 3, 318-322.
- Braddock J, Ruth M, Catteral P, Walworth J, McCarthy K, 1997. Enhancement and inhibition of microbial activity in hydrocarbon contaminated arctic soils: Implications for nutrient amended bioremediation; **Environmental Science and Technology**, Vol. 31, No. 7, pp 2078-2084.
- Bures S, 1997. *Sustratos*; Ed. Agrotécnicas S L. , Madrid, España pp 189.
- Calabrese E, Kostecki P, 1992. Diesel fuel contaminated; In *Hydrocarbon Contaminated soils and Groundwater*, Vol. 2, Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Campbell R. 1987. Ecología Microbiana. Ed. Limusa. Impreso en México. pp 101-104.
- Carter M, 1993. *Soil sampling and methods of análisis*; Lewis publishers, USA.
- Cepeda D, 1991. Compuestos orgánicos del suelo; *Química de suelos*; Ed. Trillas, México pp 43-49.
- Cerniglia C, Sutherland J, Sydney A, 1992. Fungal metabolism of aromatic hydrocarbons; In *Microbial degradation of natural products*; Winkelmann VCH Press, Weinheim, Germany pp 194-195.
- Cookson Jr. J, 1995. *Bioremediation engineering design and applications*; Mc Graw Hill, Inc., N. Y., USA, pp 87, 433-459.
- Crow S, Bell S, and Ahearn D, 1980. The uptake of aromatic and branched chain hydrocarbons by yeast; *Botanica Marina*, Vol.23, pp 117-120.
- Deacon J, 1997. *Modern mycology*; Blackwell Science, Great Britain, pp 94.
- Deni J, and Penninckx J, 1999. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria a hydrocarbon-polluted; **Applied and Environmental Microbiology**, Vol.65 No 9 , 4008-4013.
- Dennis D, Slater J, Hicks P, Jones H, 1993. In situ biological remediation of petroleum hydrocarbons in unsaturated soils, In *Principles and practices for petroleum contaminated soils*; Calabrese E, Kostecki P, Lewis Publishers, pp 458.

- Dibble J, and Bartha R, 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge; **Applied and Environmental Microbiology**, Vol. 32, No. 4, 729-739.
- Dominguez A. A. 2001. Pruebas de biotratibilidad de un suelo contaminado con diesel mediante el uso de texturizantes. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Dunn G, 1985. Nutritional requirements of microorganisms; In. *Comprehensive biotechnology*; Pergamon Press, Great Britain, pp116-117.
- Edmonds P, 1978. *Microbiology and environmental perspective*; Macmillan Publishing. Co. Inc., N. Y., USA. pp 381-387;
- Ekundayo E, Obuekwe C, 1999. Hydrocarbon utilization in yeast isolates found to grow in association with petroleum in a polluted ultisol of midwestern Nigeria; **Environmental Monitoring and Assessment**, Vol. 63, 381-387.
- Fassbender H, 1987. *Química de suelos*; Ed. IICA, México. pp 205-218, 255-274.
- Filonov A, Puntus I, Karpov A, Gaiazov R, Kosheleva I, Boronin A, 1999. Growth and survival of *Pseudomonas putida* strains degrading naphthalene in soil model systems with different moisture levels; **Process Biochemistry**, Vol. 34, no.3, pp 303-308.
- Foth, H; Turk, L; 1981. *Fundamentos de la ciencia del suelo*; Ed. CECSA, México, p 527.
- Frankenberger Jr. W, 1988. Use of urea as a nitrogen fertilizer in bioreclamation of petroleum hydrocarbons in soil; **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Vol. 40, 66-68.
- Frankenberger Jr. W, 1994. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbon, In *Hydrocarbon Contaminated soils and groundwater*. Vol. 2 Calabrese E, Kostecki P, (Eds) Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Garraway M, Evans R, 1991. *Fungal nutrition and physiology*; Krieger Publishing , USA. pp 87-91.
- Gavande A, 1991. *Física de suelos, principios y aplicaciones*; Ed. Limusa, México, pp 34-35.
- Gibson T, 1984. *Microbial Degradation of organic compound*; Marcel Dekker Inc, NY, USA pp 89-130.

- Grant W, Long D, 1989. *Microbiología ambiental*; Ed. Acribia, Zaragoza, España pp 28-32, 123-125, 205-212, 216-218.
- Griffin D, 1980. *Fungal Physiology*; Wiley NY. p 383.
- Gruiz K, Kriston E, 1995. In situ bioremediation of hydrocarbons; *Journal of soil contamination*, Vol. 4, No. 2, 163-172.
- Guzmán L.A, 2001 Pruebas de biotratibilidad de suelos y agua subterránea contaminados con mezclas de diesel y gasolina. Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Hasset J, Bonwart W, 1992. *Soil and their Environment*; Prentice Hall, ; New Jersey USA, pp 257-279.
- Hillel D, 1982; Soil structure and aggregation; In. *Introduction to soil physics*; Hillel D, Academic Press, London, pp 200-204..
- Hupe K, Luth J, Heerenklage J, Stegman R, 1998. In *Bioremediation fundamentals*, Safferman S, Vol 1 pp 681
- Jackson M, 1982. *Análisis químico de suelos*; Ed omega, Barcelona, España, p 662.
- Johnson C, Scow, K, 1999. Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils; *Biodegradation*, Vol. 10, 43-50.
- Jorgensen K, Puustinen J, Suortti A, 2000. Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by composting in biopiles; *Environmental Pollution*, Vol. 107, 245-254.
- Kästner M, Lotter J, Heerenklage J, Brevier-Jammali M, Stegman R, Mahro B, 1995. Fate of <sup>14</sup>C-labeled anthracene and hexadecane in compost-manured soil; *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 43, 1128-1135.
- Kästner, M, Mahro, B, 1996. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matriz of compost; *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 44, 668-675.
- Katznelson H, 1946. The rhizosphere effects of mangels on certain groups of soil microorganisms; *Soil Science*, Vol. 62, 343-354.

- Klecka G.M, 1985. Biodegradation. In *Environmental Exposure from Chemicals*, Vol.1 Neeley W.B. and Blau G. E. CRC Press Inc. Boca Raton Florida. pp 109-135.
- Leahy J, Colwell R, 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment microbiological reviews; *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 54, No. 3, 305-311.
- Li G, Huang W, Lerner N, Zhang X, 2000. Enrichment of degrading microbes and bioremediation of petrochemical contaminants in polluted soils; *Water Research*, Vol 34, No 15, 3845-3853.
- Lukito P, Kuono K, Ando T, 1998. Phosphorus requirements of microbial biomass in a regosol and andosol; *Soil Biology and biochemistry*, Vol. 30, No. 7, 865.
- Mahmood S, Rao R, 1993. Microbial abundance and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil; *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 50, 486-491.
- Manilal B, Alexander M, 1991. Factors affecting the microbial degradation of phenathrene soil; *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 35, 401-405.
- Margesin R, Zimmerbauer F, Schinner F, 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities; *Chemosphere*, Vol 40, 339-346.
- Metting Jr. B, 1992. *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*; Marcel Dekker Inc. N.Y.USA. p 646.
- Metting Jr. B, 1992. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. In *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*; Marcel Dekker Inc. N.Y.USA. pp 3-10.
- Milcic-Terzic J, Lopez-Vidal Y, Vrvic M.M., Saval S. Biodegradation potential assessment of microbial consortia isolated from a diesel contaminated soil. *Water Science and Technology*. 42 (5-6):403-406.
- Mills S, Frankenberger Jr. W, 1994. Evaluation of phosphorus sources promoting bioremediation of diesel fuel in soil; *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol.53, 280-284.
- Miller F, 1992. Composting as a process based on the control of ecologically selective factors, In *Soil microbial ecology applications in agricultural and environmental manegement*; Metting Jr. Blaine F (Ed), Marcel Dekker Inc. pp 527.

- Mobley L, 1992. Ureasas microbial; In *Encyclopedia of microbiology*; Academic Press, USA, pp 327-335.
- Morgan P, Watkinson R, 1989. Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment; **Critical Reviews in Biotechnology**, Vol. 8 No. 4, 305-315.
- Mullen M, 1998. Transformation of the other elements; In *Principles and applications of soil microbiology*; Sylvia D, Furhmann J, Hartel P, Zuberer D, Prentice Hall, USA, pp 369-375.
- Palittapongarnpim M, Pokethitiyook P, Upatham E, Tangbanluekal L, 1998. Biodegradation of crude oil by soil microorganisms in the tropic; **Biodegradation**, Vol. 9, 83-90.
- Pateman J, Kinghorn J. 1984. Nitrogen metabolism; In *The filamentous fungi*, Smith J, Berry D, Vol. 3, Edward Arnold, London, pp 159-161.
- Pérez P. A, 2001. Efecto de la adición de texturizantes orgánicos sobre la biodegradación de diesel en un suelo contaminado. Tesis de Licenciatura QFB. Facultad de Química. UNAM.
- Rangel J, Leal H, Palacios S, Sanchez S, and Ramirez R, Coconut fiber as casing material for mushroom production (*Agaricus sp.*) En proceso de publicación
- Rhykerd R, Crews B, McInnes, K, Weaver R, 1999. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage and remediation of oil contaminated soil; **Bioresource Technology**, Vol. 67, 279-285.
- Richard T, Amonia odors. In [www.cfe.cornell.edu/compost/cic.html](http://www.cfe.cornell.edu/compost/cic.html)
- Richardson A, Hadobas P, 1997. Soil isolates of *Pseudomonas spp.* That utilize inositol phosphates; **Canadian Journal and Microbiolgy**, Vol. 43, 509-516.
- Raiser E, 1992. *Bioremediation of contaminated sites*; CRC Press, Boca Raton, Florida. USA, pp 35-43, 86-96, A 51-A 61, A 144 - A 184.
- Rose A, 1987. Responses to the chemical Environment. In. *The Yeast* Vol 2. 2end edition. Academic Press Inc. London. pp 5-20
- Saval S, 1995. Remediación y restauración, En *PEMEX: ambiente y energía*, UNAM-Petróleos Mexicanos, México, pp 173.

- Saval S, 1996. Biorremediación de suelos contaminados. Biodegradación de compuestos orgánicos industriales; Vol 1, 84-91.
- Saval S, 1997. Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. *Ingeniería y Ciencias Ambientales* No.33 (julio-septiembre).
- Saval S, 1998. Situación actual y perspectivas de la biorremediación de suelos y acuíferos en México; *Biotecnología*; Vol 3, 71-76.
- Saval, S, 1998. Biorremediación; *Revista Interamericana Asamblea y Saneamiento*; No.2, 24-29.
- Saval, S, 1999. Biorremediación de suelos y acuíferos, *Teorema*; No. 22, 53-55.
- Saval, S, 1999. Éxitos y fracasos de la biorremediación de suelos contaminados en sitios contaminados con hidrocarburos; En *Conservación y restauración de suelos*; Programa universitario del medio ambiente, México pp 510-521.
- Scheda R, Box P, 1966. Hydrocarbon as substrate for yeast; *Nature*, Vol. 211, 660.
- Scmitz C, Goebel I, Wagner S, Vomberg A, Klinner U, 2000. Competition between n-alkane-assimilating yeasts and bacteria during colonization of sandy soil microcosms; *Applied Microbiology and Biotechnology*; Vol 54,126-132.
- Schulten H, Schnitzer M, 1998. The chemistry of soil organic nitrogen: a review; *Biology and Fertility of Soils*, Vol 26, 1-15.
- Shennan J, Levi J, 1974. The growth of yeast on hydrocarbons; In *Progress in industrial microbiology*, Hockenhull D,(ed) Vol 13; Churchill Livingstone, London, pp 1-15.
- Sims J, Sims R, Matthews J, 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil; *Hazardous Waste & Hazardous Materials*, Vol. 7, No. 2, 117-149.
- Skladany G, Meeting Jr. F, 1992. Bioremediation of contaminated soil; In *Soil Microbial Ecology: applications and agricultural and environmental management*; Meeting Jr. B, Marcel Dekker Inc., NY USA. pp 483-509.
- Smith J, 1994. *Aspergillus*. Plenum Press NY. USA. Pp 33-34.



- Steffensen W. and Alexander M, 1995. Competition for inorganic Nutrients in the biodegradation of mixtures of substrates; **Applied. Environmental. Microbiology**, Aug. 2859-2862.
- Stratton M, Barker V, and Recheigl J, 1995. Compost. In *Soil. Amendments and Environmental Quality*; Recheigl J.E, Lewis Publishers CRS press Inc. USA pp 270.
- Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P, Zuberer D, 1999. *Principles and applications of soil microbiology*; Prentice Hall; New Yersey, USA, p 550.
- Tabatabai M, Bremner, J, 1972. Assay of urease activity in soils; **Soil biology and Biochemistry**, Vol. 4, 479-487.
- Tamhane R, 1986. Propiedades físicas del suelo. En *Suelos: su química y fertilidad en suelos tropicales*; Ed. Diana, México, pp 35-39, 483.
- Tavera S, 1985. *Criterios para interpretación y aprovechamiento de los reportes de laboratorio para las áreas de asistencia técnica*. Serie: Temas didácticos. Publicación No. 3 Sociedad de la Ciencia del Suelo.
- Thorn G, 1997. The fungi in soil, In *Modern soil microbiology*; van Elsas, Trevors J, Wellington E, Marcel Dekker Inc N.Y. USA.
- Tivy J, 1990. *Agricultural ecology*; Longman Scientific & Technical, England, pp 64-65.
- USEPA, 1966b SW-846 Test Metods for Evaluating Solid Waste Pysical/Chemical Methods. Tercera Revisión. Washington.
- Vázquez A, 1993. Guía para la interpretación de análisis químicos de suelo y agua. Depto. Suelos, UACH.
- Vishniac H, 1995. Stimulated *in situ* competitive ability and survival of a representative soil yeast, *Cryptococcus albidus*; **Microbial Ecology**, Vol 30, 309-320.
- Wagner G, Wolf D, 1998. Carbon transformations and soil organic matter formation, In *Principles and applications of soil microbiology*, Sylvia D, Furmann J, Hartel P, Zuberer D ; Prentice Hall, New Yersey, USA, pp 246-249.

- Walker G, 1998. *Yeast physiology and biotechnology*; John Wiley and Sons, USA, pp 55-56, 75-81, 148, 234-235, 241, 247-248.
- Walter M. and Crawford R, 1997. Overview: Biotransformation and Biodegradation, In *Manual of Environmental Microbiology*, Hurst C, Knudsen G, McInerney M, Stezenbach L, and Walter M; ASM Press, Wash D.C. USA, pp 707.
- Walworth J. L., Woolard C. R., Braddock J. F. and Reynolda C. M. 1997a. The role of soil nitrogen concentration in bioremediation. En *In situ and On Site Bioremediation: Memories the Fourth International in situ and on site bioremediation Symposium*. New Orleans.
- Waksman S, Starkey R, 1931. The microbe and its activities; In. *The soil and the microbe*; N. Y. USA, John Wiley and Sons, pp 21-37, 57-69, 127-133.
- Wild A, 1992. *Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell*; Mundi-Prensa, Madrid, España, pp 641-644, 702-704, 736-738, 763.
- Winterhoff W, 1992. Factores ecológicos que afectan la flora fungica del suelo; In. *Fungi in vegetation*; Winterhoff W, (ed). Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands, pp 207.
- [www.cfe.cornell.edu/compost/cic.html](http://www.cfe.cornell.edu/compost/cic.html)
- Xu J, Johnson R, 1997. Nitrogen dynamics in soils with different hydrocarbons contents planted to barley and field pea. *Canadian Journal of Soil Science*, Vol. 7 No. 3 (Abstract)
- Yúfera E, 1987. *Química agrícola*; Ed Alambra, España, pp 119, 139.
- Zegarra M. G., 1998. Optimización de la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta. Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, AIDIS, Lima, Perú.
- Zegarra M.G., 2000 Optimización de la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta. Tesis para obtener el grado de maestro en Ingeniería Ambiental, División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería, UNAM.
- Zobell, C.E. 1946. Action of microorganisms on hydrocarbons. In *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective*, Atlas R, 1981. *Microbial reviews*, Vol.45 No.1 ,180-209.

## Niveles de Nitrógeno, Fosfatos y Materia Orgánica en Suelos

Nitrógeno		Fosfatos	Materia Orgánica	
(%)	mg/kg	mg/kg	(%)	Denominación
<0.032		<320	0 - 0.2	Extremadamente pobre
0.032 - 0.063	< 4.0	320 - 630	0.8 - 2.0	Pobre
0.064 - 0.095		640 - 950	2.0 - 4.0	Regular
0.096 - 0.126	4.0 - 6.9	960 - 1260	4.0 - 8.0	Medianamente rico
0.127 - 0.158	7.0 - 12.5	1270 - 1580	8.0 - 15.0	Rico
0.159 - 0.221		1590 - 2210	15.0 - 30.0	Muy rico
>0.221	<12.5	>2210	>30.0	Extremadamente rico

(Tomado de Aguilera, 1989; Vázquez, 1993; Tavera, 1985)

# RESULTADOS OBTENIDOS

## ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Tiempo	Tratamientos	Humedad %	pH	Nitrógeno amoniacal (mg/kg)	Nitrógeno total (mg/kg)	Fosfatos (mg/kg)
TO	Sc+C	27.49	5.83	13.68	3,985.07	19.43
		27.20	5.83	18.82	4,848.9	15.92
		27.0	5.75	13.49	5,027.4	21
	Promedio	27.4	5.80	12.6	4,620	19.4
	% variabilidad	1.91	0.80	12.61	12.06	15.87
	Sc+Fe	49.0	5.92	3.86	3,568.63	27.52
		45.3	5.86	10.8	3,583.18	28.06
		48.3	5.76	7.62	4,061.9	28.06
	Promedio	47.53	5.84	7.4	3,737.90	28.0
	% variabilidad	4.14	1.38	46.77	7.51	1.11
	Sc+C+F	29.0	8.11	2,807.77	8,774.65	15.14
		29.3	8.29	2,892.19	9,108.91	12.39
		27.7	8.24	2,980.93	9,004.15	13.05
	Promedio	28.67	8.21	2,894	8,963	14
	% variabilidad	2.97	1.13	2.99	1.91	10.61
	Sc+Fe+F	42.3	7.73	5,563.48	5,996.53	20.24
		46.2	7.86	6,215.83	7,290.31	20.1
		46.9	7.96	5,083.67	6,195.86	20.94
	Promedio	45.14	7.85	5,620.9	6,494	20
	% variabilidad	1.47	5.50	10.11	10.73	2.20
	CC	24.0	7.31	3.13	184.21	17.81
	CFc	37.0	5.82	95.98	2,900.39	27.93

Tiempo	Tratamientos	Humedad %	pH	Nitrógeno amoniacal (mg/kg)	Nitrógeno total (mg/kg)	Fosfatos (mg/kg)
T1	Sc+C	31.0	6.36	40.00	5,072.00	15.34
		32.6	6.84	11,69	5,341.24	16.49
		29.5	6.91	11,18	4,964.54	15.09
	<b>Promedio</b>	<b>31.03</b>	<b>6.70</b>	<b>20.9</b>	<b>5,126</b>	<b>15.92</b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>5.00</b>	<b>4.47</b>	<b>78.71</b>	<b>3.78</b>	<b>4.79</b>
	Sc+Fc	48.6	5.62	95.89	5,583.66	14.12
		53.0	5.58	96.49	5,872.34	17.34
		58.2	5.65	37.73	7,033.49	18.42
	<b>Promedio</b>	<b>53.26</b>	<b>5.61</b>	<b>76.7</b>	<b>6,163</b>	<b>17</b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>9.02</b>	<b>0.63</b>	<b>44.01</b>	<b>12.45</b>	<b>13.44</b>
	Sc+C+F	32.5	8.88	3,585.14	9,343.02	20.28
		34.6	8.87	4,058.23	9,633.03	23.02
		31.4	8.79	3,253.80	8,775.51	21.95
	<b>Promedio</b>	<b>32.56</b>	<b>8.84</b>	<b>3,632.40</b>	<b>9251</b>	<b>22</b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>4.93</b>	<b>0.56</b>	<b>11.13</b>	<b>4.72</b>	<b>635</b>
	Sc+Fc+F	60.6	8.45	4,253.93	15,710.7	23.42
		54.8	8.41	3,690.62	14,004.4	23.07
		57.4	8.39	3,795.54	15,680.8	20.46
<b>Promedio</b>	<b>57.6</b>	<b>8.41</b>	<b>3,913.4</b>	<b>15,132</b>	<b>22</b>	
<b>% variabilidad</b>	<b>5.04</b>	<b>0.36</b>	<b>7.66</b>	<b>6.45</b>	<b>7.24</b>	
CC	29.0	7.42	16.69	407.8	17.67	
CFC	53.1	5.80	105.09	3,710.02	19.21	

Tiempo	Tratamientos	Humedad %	pH	Nitrógeno amoniacal (mg/kg)	Nitrógeno total (mg/kg)	Fosfatos (mg/kg)
T2	Sc+C	28.2	6.95	87.86	5,752.08	8.2
		25.7	7.13	32.69	5,693.14	8.69
		23.3	7.38	51.93	5,932.20	5.85
	<b>Promedio</b>	<b>25.73</b>	<b>7.15</b>	<b>57.2</b>	<b>5792</b>	<b>8.0</b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>9.52</b>	<b>3.02</b>	<b>48.71</b>	<b>2.15</b>	<b>20.02</b>
	Sc+Fc	32.9	6.89	69.91	4,113.26	9.35
		51.1	6.19	37.10	5,357.87	11.71
		46.8	6.45	22.82	4,266.92	9.26
	<b>Promedio</b>	<b>43.6</b>	<b>6.51</b>	<b>43.3</b>	<b>4,579</b>	<b>10.0</b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>21.82</b>	<b>5.44</b>	<b>55.80</b>	<b>14.82</b>	<b>13.73</b>
	Sc+C+F	27.0	8.42	4,828.29	9,493.15	15.68
		30.69	8.71	3,545.20	8,988.6	11.76
		12.1	8.32	2,481.05	8,157.0	17.67
	<b>Promedio</b>	<b>23.26</b>	<b>8.48</b>	<b>3,618.2</b>	<b>8,880</b>	<b>15.0</b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>42.31</b>	<b>2.39</b>	<b>32.48</b>	<b>7.60</b>	<b>19.99</b>
	Sc+Fc+F	53.6	8.20	2,932.24	14,396.6	18.83
		56.2	8.26	8,233.31	15,799.1	17.83
		49.4	8.11	4,029.39	14,938.7	15.59
<b>Promedio</b>	<b>53.07</b>	<b>8.19</b>	<b>5,064.9</b>	<b>15,045</b>	<b>17.0</b>	
<b>% variabilidad</b>	<b>6.47</b>	<b>0.92</b>	<b>55.25</b>	<b>4.70</b>	<b>9.53</b>	
CC	23.2	7.15	35.93	419.27	9.03	
CFC	39.0	5.67	158.24	2,962.35	13.5	

## ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Tiempo	Tratamientos	Bacterias potencialmente degradadoras (ufc/g suelo)	Bacterias amonificantes (NMP/g suelo)	Hongos (ufc/g suelo)	Levaduras (ufc/g suelo)
T0	Sc+C	$2.03 \times 10^7$	0	$1.78 \times 10^5$	0
		$2.29 \times 10^7$	$2.74 \times 10^7$	$1.86 \times 10^5$	0
		$2.15 \times 10^7$	$2.73 \times 10^7$	$2.05 \times 10^5$	0
	Promedio	$2.15 \times 10^7$	$2.74 \times 10^7$	$1.96 \times 10^5$	0
	% variabilidad	6.18	86.60	6.73	0
	Sc+Fc	$1.33 \times 10^7$	$2.54 \times 10^7$	$2.01 \times 10^6$	$5.41 \times 10^6$
		$1.04 \times 10^7$	$3.10 \times 10^8$	$3.52 \times 10^6$	$2.97 \times 10^5$
		$2.07 \times 10^7$	$2.51 \times 10^8$	$1.41 \times 10^6$	$2.57 \times 10^5$
	Promedio	$1.48 \times 10^7$	$1.95 \times 10^8$	$2.31 \times 10^6$	$1.98 \times 10^6$
	% variabilidad	35.74	76.84	46.97	149.03
	Sc+C+F	$1.32 \times 10^7$	$2.39 \times 10^5$	0	0
		$5.94 \times 10^6$	$2.40 \times 10^5$	0	0
		$2.61 \times 10^5$	$2.35 \times 10^5$	0	0
	Promedio	$6.46 \times 10^6$	$2.38 \times 10^5$	0	0
	% variabilidad	100.23	1.19	0	0
	Sc+Fc+F	$8.49 \times 10^6$	$2.53 \times 10^6$	$5.89 \times 10^6$	$4.61 \times 10^7$
		$1.79 \times 10^7$	$7.39 \times 10^4$	$3.25 \times 10^5$	$3.71 \times 10^5$
		$3.53 \times 10^6$	$2.48 \times 10^5$	$8.19 \times 10^6$	$1.88 \times 10^5$
	Promedio	$9.97 \times 10^6$	$8.74 \times 10^5$	$4.80 \times 10^6$	$1.53 \times 10^7$
	% variabilidad	73.20	141.31	84.21	173.17
CC	$7.43 \times 10^3$	$3.28 \times 10^7$	$1.05 \times 10^5$	$2.36 \times 10^3$	
CFc	$3.03 \times 10^3$	$4.8 \times 10^6$	$1.27 \times 10^6$	$4.35 \times 10^6$	
Sc	$2.03 \times 10^6$	$2.72 \times 10^8$	$1.52 \times 10^7$	$3.30 \times 10^7$	
	$1.60 \times 10^7$	$3.24 \times 10^7$	$1.62 \times 10^6$	$5.11 \times 10^7$	
	$2.66 \times 10^6$	$4.74 \times 10^6$	$1.16 \times 10^6$	$1.74 \times 10^7$	
Promedio	$7.0 \times 10^6$	$9.0 \times 10^7$	$6.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$	
% variabilidad	114.47	142.65	133.12	167.92	

Tiempo	Tratamientos	Bacterias potencialmente degradadoras (ufc/g suelo)	Bacterias amonificantes (ufc/g suelo)	Hongos (ufc/g suelo)	Levaduras (ufc/g suelo)	
T1	Sc+C	$1.30 \times 10^6$	$2.89 \times 10^8$	$8.69 \times 10^4$	$1.24 \times 10^6$	
		$3.71 \times 10^6$	$3.70 \times 10^7$	$1.51 \times 10^5$	$6.52 \times 10^5$	
	Promedio	$2.14 \times 10^6$	$1.20 \times 10^7$	$9.83 \times 10^4$	$1.09 \times 10^6$	
	% variabilidad	62.96	145.80	49.13	35.65	
	Sc+Fc	$1.10 \times 10^7$	$7.78 \times 10^7$	$5.36 \times 10^6$	$2.68 \times 10^7$	
		$1.74 \times 10^6$	$2.76 \times 10^8$	$3.46 \times 10^5$	$3.59 \times 10^7$	
	Promedio	$5.22 \times 10^6$	$1.38 \times 10^8$	$2.01 \times 10^6$	$1.04 \times 10^8$	
	% variabilidad	96.03	87.13	144.58	121.32	
	Sc+C+F	$4.60 \times 10^4$	$2.52 \times 10^6$	0	0	
		$1.79 \times 10^5$	$2.59 \times 10^5$	0	0	
	Promedio	$7.14 \times 10^4$	$2.47 \times 10^5$	0	0	
	% variabilidad	71.43	129.65	0	0	
	Sc+Fc+F	$1.72 \times 10^7$	$3.29 \times 10^7$	$6.75 \times 10^9$	$2.46 \times 10^{11}$	
		$1.13 \times 10^7$	$5.53 \times 10^7$	$4.42 \times 10^5$	$2.94 \times 10^{11}$	
	Promedio	$2.19 \times 10^7$	$5.86 \times 10^7$	$2.34 \times 10^5$	$2.00 \times 10^{11}$	
	% variabilidad	1.68	$3.24 \times 10^7$	$2.25 \times 10^6$	$2.47 \times 10^{11}$	
	CC	$4.35 \times 10^3$	$2.81 \times 10^7$	$2.53 \times 10^4$	$1.68 \times 10^8$	
	CFC	$3.82 \times 10^3$	$3.62 \times 10^7$	$5.82 \times 10^6$	$2.13 \times 10^8$	
	Sc	$5.39 \times 10^5$	$3.08 \times 10^7$	$6.16 \times 10^5$	$1.54 \times 10^6$	
		$1.07 \times 10^6$	$3.10 \times 10^7$	$4.64 \times 10^5$	$4.18 \times 10^6$	
	Promedio	$7.60 \times 10^5$	$2.96 \times 10^7$	$4.19 \times 10^5$	$4.96 \times 10^4$	
	% variabilidad	8.0	$3.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	
			33.66	2.45	20.67	161.18

Tiempo	Tratamientos	Bacterias potencialmente degradadoras (ufc/g suelo)	Bacterias amonificantes (ufc/g suelo)	Hongos (ufc/g suelo)	Levaduras (ufc/g suelo)
T2	Sc+C	3.62 x 10 <sup>5</sup>	2.78 x 10 <sup>8</sup>	1.20 x 10 <sup>6</sup>	1.01 x 10 <sup>11</sup>
		1.23 x 10 <sup>6</sup>	2.28 x 10 <sup>8</sup>	2.55 x 10 <sup>6</sup>	2.82 x 10 <sup>5</sup>
		1.40 x 10 <sup>5</sup>	3.25 x 10 <sup>7</sup>	3.68 x 10 <sup>5</sup>	5.08 x 10 <sup>5</sup>
	<b>Promedio</b>	<b>5.77 x 10<sup>5</sup></b>	<b>1.79 x 10<sup>8</sup></b>	<b>1.37 x 10<sup>6</sup></b>	<b>3.37 x 10<sup>8</sup></b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>99.88</b>	<b>72.25</b>	<b>80.16</b>	<b>173.19</b>
	Sc+Fc	1.70 x 10 <sup>7</sup>	5.21 x 10 <sup>8</sup>	2.17 x 10 <sup>5</sup>	4.96 x 10 <sup>7</sup>
		4.38 x 10 <sup>6</sup>	3.47 x 10 <sup>8</sup>	2.98 x 10 <sup>5</sup>	4.08 x 10 <sup>5</sup>
		1.50 x 10 <sup>7</sup>	3.75 x 10 <sup>7</sup>	3.85 x 10 <sup>5</sup>	4.04 x 10 <sup>5</sup>
	<b>Promedio</b>	<b>1.21 x 10<sup>7</sup></b>	<b>3.02 x 10<sup>8</sup></b>	<b>3.00 x 10<sup>5</sup></b>	<b>4.36 x 10<sup>7</sup></b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>55.95</b>	<b>81.11</b>	<b>27.92</b>	<b>11.88</b>
	Sc+C+F	1.36 x 10 <sup>6</sup>	1.78 x 10 <sup>6</sup>	0	1.09 x 10 <sup>4</sup>
		2.19 x 10 <sup>6</sup>	3.60 x 10 <sup>6</sup>	0	1.08 x 10 <sup>4</sup>
		8.76 x 10 <sup>5</sup>	2.27 x 10 <sup>5</sup>	0	2.84 x 10 <sup>7</sup>
	<b>Promedio</b>	<b>1.47 x 10<sup>6</sup></b>	<b>1.87 x 10<sup>6</sup></b>	<b>0</b>	<b>9.48 x 10<sup>5</sup></b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>45.08</b>	<b>90.37</b>	<b>0</b>	<b>173.01</b>
	Sc+Fc+F	1.91 x 10 <sup>6</sup>	3.66 x 10 <sup>4</sup>	0	1.84 x 10 <sup>2</sup>
		2.49 x 10 <sup>7</sup>	3.88 x 10 <sup>5</sup>	0	4.79 x 10 <sup>4</sup>
		2.63 x 10 <sup>6</sup>	5.92 x 10 <sup>5</sup>	0	4.84 x 10 <sup>5</sup>
	<b>Promedio</b>	<b>9.81 x 10<sup>6</sup></b>	<b>3.39 x 10<sup>5</sup></b>	<b>0</b>	<b>2.39 x 10<sup>5</sup></b>
	<b>% variabilidad</b>	<b>76.51</b>	<b>82.94</b>	<b>0</b>	<b>93.34</b>
CC	2.43 x 10 <sup>7</sup>	2.21 x 10 <sup>6</sup>	2.21 x 10 <sup>4</sup>	0	
CFc	8.23 x 10 <sup>4</sup>	6.54 x 10 <sup>3</sup>	3.92 x 10 <sup>6</sup>	4.90 x 10 <sup>2</sup>	
Sc	6.79 x 10 <sup>3</sup>	1.94 x 10 <sup>7</sup>	3.65 x 10 <sup>5</sup>	3.13 x 10 <sup>2</sup>	
	5.63 x 10 <sup>5</sup>	6.26 x 10 <sup>6</sup>	3.22 x 10 <sup>5</sup>	6.41 x 10 <sup>6</sup>	
	4.29 x 10 <sup>5</sup>	2.67 x 10 <sup>5</sup>	1.26 x 10 <sup>5</sup>	1.57 x 10 <sup>5</sup>	
<b>Promedio</b>	<b>6.0 x 10<sup>3</sup></b>	<b>9.0 x 10<sup>6</sup></b>	<b>3.0 x 10<sup>5</sup></b>	<b>2.0 x 10<sup>6</sup></b>	
<b>% variabilidad</b>	<b>22.49</b>	<b>113.24</b>	<b>47.17</b>	<b>155.50</b>	

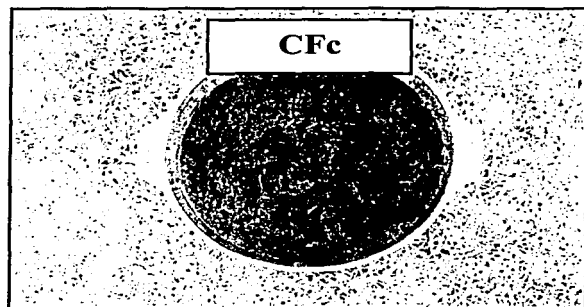
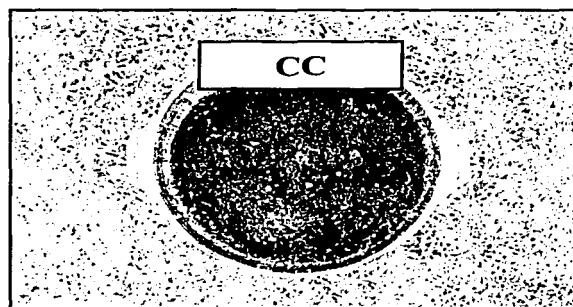
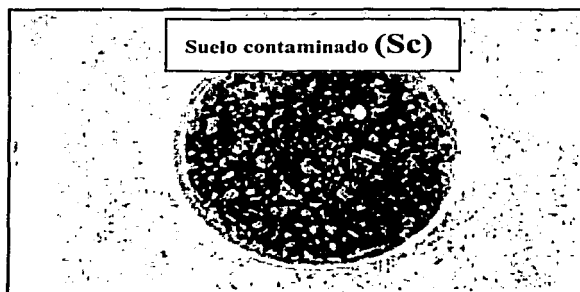


## DEGRADACIÓN DE DIESEL

	CONCENTRACIÓN DE DIESEL(mg/kg)			% ELIMINACIÓN		
	T0	T1 (40 días)	T2 (80 días)	T1 (40 días)	T2 (80 días)	40-80 días
<b>Sc+C</b>	30,820.00	21,130.75	10,251.81	31.44	66.74	51.48
	30,820.00	15,765.38	6,418.60	48.85	79.17	59.29
	30,820.00	18,419.35	8,989.24	40.24	70.83	51.20
<b>Promedio</b>	<b>30,820.00</b>	<b>18,438.49</b>	<b>8,553.215</b>	<b>40.27</b>	<b>72.25</b>	<b>53.99</b>
<b>Sc+Fc</b>	30,254.18	29,254.10	17,268.18	3.31	42.92	40.97
	30,254.18	19,704.17	8,715.31	3.87	71.19	55.77
	30,254.18	23,729.27	9,695.46	21.57	67.95	59.14
<b>Promedio</b>	<b>30,254.18</b>	<b>24,229.18</b>	<b>11892.98</b>	<b>19.91</b>	<b>60.69</b>	<b>51.96</b>
<b>Sc+C+F</b>	30,820.00	29,644.28	20,536.99	3.81	33.36	30.72
	30,820.00	28,787.60	14,099.94	6.59	54.25	51.02
	30,820.00	27,889.60	26,805.75	9.51	13.02	3.89
<b>Promedio</b>	<b>30,820.00</b>	<b>28,773.82</b>	<b>20,480.89</b>	<b>6.64</b>	<b>33.55</b>	<b>28.54</b>
<b>Sc+Fc+F</b>	30,254.18	29,573.89	26,090.96	2.25	13.76	11.78
	30,254.18	23,145.31	17,012.29	23.50	43.77	26.50
	30,254.18	24,745.21	18,843.85	18.21	37.71	23.85
	<b>30,254.18</b>	<b>25,821.47</b>	<b>20,649.03</b>	<b>14.65</b>	<b>31.75</b>	<b>20.71</b>
<b>Sc 1</b>	86,926.00	63,229.98	61,465.39	27.76	25.93	-
<b>Sc 2</b>	86,926.00	85,239.64	75,512.98	1.94	12.34	-
<b>Sc 3</b>	86,926.00	78,885.35	56,548.07	9.25	25.69	-

Unidades Experimentales

Controles



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Unidades Experimentales

