

01177



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO FACULTAD DE INGENIERÍA

“ATENUACIÓN NATURAL EN SUELOS CONTAMINADOS
CON HIDROCARBUROS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN INGENIERÍA
(AMBIENTAL)

P R E S E N T A :

ING. AMB. LILIA CORONA RAMÍREZ

TUTORA: DRA. ROSARIO ITURBE ARGÜELLES

UNAM
POSGRADO
INGENIERÍA AMBIENTAL

México, D.F. Agosto de 2004.



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO FACULTAD DE INGENIERÍA

“ATENUACIÓN NATURAL EN SUELOS CONTAMINADOS
CON HIDROCARBUROS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN INGENIERÍA²

(AMBIENTAL)

P R E S E N T A :

ING. AMB. LILIA CORONA RAMÍREZ

TUTORA: DRA. ROSARIO ITURBE ARGÜELLES

UNAM
POSGRADO
INGENIERÍA

México, D.F. Agosto de 2004.

Agradecimientos

A mi mamá y hermana

Por todo el amor, cariño, tiempo y ejemplo que me han brindado, por ser la base de mi vida y que gracias a ello he logrado todas mis metas... Hoy en día, m: Maestría.

A mi tutora

Gracias... por compartir todos sus conocimientos, confiar en mí, por el apoyo, comprensión y tolerancia durante la elaboración de la tesis.

A mi amiga y compañera de trabajo... Jessiquilla

Gracias individua... por todo el apoyo que me diste cuando más lo necesité, por todos los momentos que pasamos juntas incluyendo los de la carrera, pero aún más por vivir conmigo esta aventura! TQ1B.

A mi flaquito

Por ser una personita super especial en mi vida, por demostrarme todo tu amor, ser todo oídos, hombro y principalmente corazón en todo momento!. Recuerda que TAD!

A mis amigos de UPIBI: PMMEJMY... los de "Siempre"

Por el ánimo y confianza que me dan, recuerden que son esenciales en mi vida...

Gracias y juntos x siempre!

A mis amigos de Maestría

Ahora sé que las buenas personas están por todos lados... Mil gracias por su amistad!

En especial a ti Miau!!!

Al Instituto Politécnico Nacional

Gracias... por ser mi *alma mater* ya que gracias a los conocimientos aprendidos, he logrado una meta más.

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Gracias... por haberme brindado espacio y conocimiento durante mis dos años de maestría.

A CONACyT

Gracias... por ser parte importante en la elaboración de éste trabajo.

A la DGEP

Por el apoyo proporcionado durante éste tiempo para realizar mi maestría.

Finalmente, gracias a aquellos que no pude mencionar pero que fueron de gran ayuda para realizar éste trabajo; en especial... *Luis y a mi comité tutorial, Dra. Frida y Dr. Durán.*

¡Gracias a todos ellos por ser la principal prioridad en mi vida y por ocupar un inmenso espacio en mi pequeño corazón!

Lilia

ÍNDICE

Resumen	1
APÍTULO I. Introducción	3
APÍTULO II. Antecedentes	5
2.1 Antecedentes de la concentración de los contaminantes.....	9
APÍTULO III. Objetivos	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
3.3 Alcances.....	14
APÍTULO IV. Marco Teórico	15
4.1 Contaminación del suelo.....	15
4.2 Atenuación natural.....	16
4.3 Biorremediación del suelo.....	21
4.4 Hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAP).....	28
4.4.1 Degradación de los HAP.....	30
4.4.2 Características de los HAP.....	33
APÍTULO V. Legislación Ambiental	41
APÍTULO VI. Metodología y Técnicas Analíticas	49
6.1 Metodología.....	49
6.1.1 Diagrama del experimento.....	49
6.1.2 Caracterización del suelo.....	51
6.1.3 Experimentación en cajones.....	67
6.1.4 Pruebas de respirometría.....	69
6.1.5 Análisis estadístico.....	70

CAPÍTULO VII. Resultados y Discusión	73
7.1 Caracterización del suelo	73
7.2 Concentración de HAP	75
7.3 Eficiencias de remoción de HAP	77
7.4 Cuenta bacteriana	86
7.5 Respirimetría	89
7.6 Análisis estadístico	95
CAPÍTULO VIII. Conclusiones y Recomendaciones	99
8.1 Conclusiones	99
8.2 Recomendaciones	101
CAPÍTULO IX. Referencias	103

Resumen

Se realizó un experimento con suelo contaminado, proveniente de una refinería, con hidrocarburos derivados del petróleo, específicamente con concentraciones elevadas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). El objetivo de este trabajo es conocer la degradación de los compuestos HAP por atenuación natural y biorremediación por medio de la estimulación con nutrimentos y surfactantes. El estudio consistió en preparar 6 cajones con 7 kg de suelo, cada una con las siguientes condiciones:

S₁ suelo contaminado con hidrocarburos y 15% de contenido de agua.

S₂ suelo contaminado con hidrocarburos y adición de nutrimentos (N y P) con 15% de contenido de agua.

S₃ suelo contaminado con hidrocarburos y adición de nutrimentos y de un surfactante no iónico con 15% de contenido de agua.

S₄ igual a S₁ pero con 30% de contenido de agua.

S₅ igual a S₂ con 30% de contenido de agua.

S₆ igual a S₃ con 30% de contenido de agua.

S₇ suelo contaminado testigo, sin control de humedad y sin aireación.

La experimentación consistió en airear el suelo diariamente y controlar el contenido de agua de manera que éste fuera constante. Así mismo, se llevaron a cabo pruebas de respirometría y se observó una producción importante de CO₂, excepto en el suelo testigo que no se aireó. Los resultados indican que los HAP son susceptibles de ser removidos con atenuación natural y con biorremediación.

CAPÍTULO I

Introducción

Los suelos poseen un umbral específico de estabilidad, es decir, una capacidad para asimilar las intervenciones humanas, sin entrar en procesos de deterioro, lo cual varía en función del tipo de suelo y de su entorno. Por lo tanto, una misma acción puede inducir efectos de diferente magnitud en función inversa de sus umbrales de estabilidad (Acevedo, 2000). La acción humana contribuye enormemente en la contaminación de los suelos causada principalmente por residuos industriales, mineros o urbanos.

Debido a la intercomunicación entre los recursos que constituyen el medio ambiente, los efectos causados por actividades humanas pueden ser propagados, repercutiendo en el mismo, provocando efectos adversos.

Los suelos son medios vivos y frágiles, en los que se operan intensos intercambios biológicos y fisicoquímicos; es por ello, que es importante tomar en cuenta que los suelos se agotan cuando sus propiedades no tienen la posibilidad de regenerarse naturalmente.

El balance de la degradación de los suelos efectuado por el International Soil Reference and Information Center (ISRIC, 2000), no es nada tranquilizador, pues el

fenómeno afecta actualmente a más de 20 millones de km²; de los cuales por lo menos 12 millones de km² de suelo se han degradado como consecuencia de la actividad humana.

El desarrollo económico en México ha ocasionado en la industria el resultado de una política de precios bajos de petróleo lo que ha propiciado su uso intensivo y con esto, un crecimiento de la demanda energética más acelerada, presentándose en la segunda parte de la década de los 70's, la reestructuración productiva de la industria, la cual se modificó debido al crecimiento petrolero. La petroquímica básica se convirtió en la actividad con mayor contribución a la contaminación, llegando a ser una de las actividades más relevantes por su impacto potencial al ambiente. Debido a la importancia económica que representa el petróleo para México y ante la demanda en el mercado exterior a pesar de las fluctuaciones de su precio, se ha intensificado su explotación. El desarrollo petrolero y el crecimiento de la industria petroquímica han requerido del uso intensivo de los energéticos fósiles para cubrir las necesidades de una sociedad más consumista (PEMEX, 2003).

En la extracción del petróleo no se considera el bienestar del ambiente, lo que ha contribuido a la degradación del aire, agua y suelo. En México se ha realizado poca investigación sobre este último aspecto, en comparación con el aire y el agua referente a estudios de contaminación, por lo que es necesario llevar a cabo estudios para conocer el estado actual de los suelos cercanos a zonas industriales y urbanas, indispensables para el uso adecuado y conservación de éstos.

CAPÍTULO II

Antecedentes

En México, existen diferentes fuentes generadoras de contaminación de suelos y acuíferos, dependiendo de las actividades que se desarrollen en cada zona; la contaminación por hidrocarburos es la más ampliamente distribuida en el país (Saval, 1995).

En México, la industria petrolera en su conjunto ha tenido un gran impacto en materia ambiental. Por la amplia gama de productos derivados del petróleo, no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los petroquímicos básicos (Acevedo, 2000).

A la industria petrolera la constituyen las áreas de la prospección, explotación, producción, refinación y procesamiento de diversos productos derivados del petróleo, principalmente, gasolina, diesel y gas. Es una de las industrias más importantes por el volumen de producción, generación de empleos y necesidades que satisface.

Por las diferentes actividades industriales que efectúa la industria del petróleo en México es que existe un potencial de contaminación del ambiente. Siendo un punto importante de que esto suceda, el transporte de petróleo crudo y productos

refinados que tiene implícita la posibilidad de derrames que pueden contaminar al suelo. El suelo y el subsuelo constituyen un recurso natural difícilmente renovable. Un recurso natural es un elemento natural que se presenta sin la inducción del hombre y es susceptible de ser aprovechado en beneficio de éste.

Durante mucho tiempo y hasta hace poco, nadie se preocupaba por el destino de los residuos generados, dando por hecho que la naturaleza limpiaba el ambiente, pero según fue cambiando la naturaleza y composición de los residuos, y al aumentar la cantidad y complejidad de éstos, la capacidad degradativa y amortiguadora empezó a alterarse.

Los suelos contaminados con hidrocarburos se consideran materiales peligrosos por lo que anteriormente se solicitaba el análisis CRETIB. Desde 2002, lo que procede es identificar el tipo y concentración de los contaminantes, lo cual constituye el punto de partida para estudiar las alternativas que permitan su tratamiento (según el PROY-NOM-138-SEMARNAT-2003), tomando en cuenta que las características fisicoquímicas del contaminante, así como las propias del sitio determinan su permanencia o migración.

Por otra parte, los residuos o desechos de la actividad petrolera se encuentran clasificados como residuos peligrosos. Se calcula que en 1991 se generaron 5,292 miles de Ton/año de residuos peligrosos y se ha estimado que el 24% son derivados del petróleo, es decir, 130,183 Ton/año. Un informe de la Secretaria de Desarrollo Social en conjunto con el Instituto Nacional de Ecología (SEDESOL y el INE, 1994) menciona que los residuos anuales de los procesos de refinación y petroquímicos de Petróleos Mexicanos, alcanzaban la cifra de 1.7 millones de Ton de residuos. De estos, el 90.15% correspondía a desperdicios semisólidos; el 9.6% a líquidos y 0.25% a sólidos; de los cuales un 18% del total se consideraban

peligrosos. Los residuos reciclados representaban el 0.1% y se estimó que sólo un 13% de¹ total era susceptible de ser reutilizado (Acevedo, 2000).

Tabla 2.1 Residuos anuales generados por los procesos de refinación y petroquímica de la industria del petróleo en México.

Residuos	10 ³ T/año	%
Desperdicios semisólidos	1,532.55	90.15
Desperdicios líquidos	163.2	9.6
Desperdicios sólidos	4.25	0.25
Residuos peligrosos	221.0	18.0
Residuos reciclados	1.7	0.1
Residuos susceptibles de ser utilizados	187.0	13.0

Fuente: SEDESOL-INE, 1994

En el informe anual de 1999 de la industria del petróleo en México, en 1999 se estableció que el derrame de hidrocarburos representó el 0.3% de las emisiones y descargas totales (SEMARNAT, 2000). El 56% de este volumen fue consecuencia de los 93 derrames ocurridos en instalaciones de PEMEX Refinación (PR), siendo el volumen restante debido a los 763 derrames en instalaciones de PEMEX Exploración y Producción (PEP). En lo que se refiere a hidrocarburos líquidos transportados por ductos en tierra, PEP derramó 14.3 barriles por cada millón de barriles transportados mientras que PR derramó 17.1. Las emisiones al aire constituyeron un 84% de las emisiones y descargas totales. Cerca del 70% de las emisiones al aire se refirieron a SO_x, mientras que casi el 20% fueron compuestos orgánicos volátiles totales (COVT). El 91% de las emisiones de estos últimos provinieron de la evaporación de hidrocarburos, mientras que 9% se refiere a los hidrocarburos liberados por procesos de combustión parcial. Las refinерías participaron con el 87% del total y esta evaporación se dió principalmente en los tanques de almacenamiento.

Es entonces que debido a la gran cantidad de sitios contaminados por hidrocarburos en México, existe desde hace algunos años el interés por el saneamiento de los suelos contaminados. Sin embargo, dadas las experiencias infructuosas que han ocurrido en otros países en los que se ha gastado una fuerte cantidad de dinero sin obtener resultados adecuados, se ha profundizado en el estudio de la atenuación natural y biorremediación debido a que son procesos que han obtenido una gran aceptación por ser de bajo costo y con muchas posibilidades de éxito.

Dentro de los procesos de atenuación natural y biorremediación existen distintos métodos, los cuales pueden dividirse en las siguientes categorías (Torres *et al*, 1997):

- Tratamiento en fase sólida.- Se puede aplicar en forma de cultivo de suelo (en pilas de suelo) o de composteo. El composteo consiste en la mezcla de suelo contaminado con materiales acondicionadores tales como paja, corteza, aserrín, bagazo u otros esquilmos agrícolas.
- Tratamiento en fase lodosa.- Consiste en tratar el suelo en un bio-reactor, en el cual se mezcla el suelo a tratar y cierta cantidad de agua y nutrimentos para obtener un lodo manejable.
- Tratamiento *in situ*.- Se diferencia de los anteriores procedimientos en el hecho de que no requiere de efectuar excavaciones ni transferencia de materiales, pues consiste en la inyección directa de soluciones nutrientes oxigenadas (en ocasiones inoculadas con microorganismos específicos) con el fin de estimular o amplificar la actividad microbiana natural.
- Tratamientos combinados.- Consisten en la aplicación de más de un tipo de tratamiento simultáneo, por ejemplo, composteo en la capa superficial de suelo e inyección de microorganismos hacia las capas inferiores (Chow *et al*, 1992).

En el caso específico de la atenuación natural, se aprovechan procesos naturales para disminuir la contaminación causada por derrames de productos químicos y reduce la concentración y la cantidad de contaminantes en los lugares afectados. El proceso de atenuación natural se encuentra determinado por la presencia y el tamaño de las poblaciones microbianas del suelo, así como de las condiciones ambientales que afectan la actividad de dichas poblaciones y de la disponibilidad de compuestos orgánicos. La atenuación natural, conocida también como una “medida correctiva intrínseca”, “bioatenuación” o “biocorrección intrínseca”, es un método de tratamiento *in situ*, es decir, que se dejan los contaminantes donde están mientras se produce la atenuación natural.

Con frecuencia se utiliza la atenuación natural como parte de la limpieza de un sitio contaminado haciendo uso de procesos naturales, donde también se recurre al control o la extracción de la fuente de contaminación. Además de ser una técnica no invasiva que permite usar productivamente el lugar mientras se realiza la limpieza (Hinchee, 1995).

2.1 ANTECEDENTES DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS CONTAMINANTES

En el año de 1999 se realizó un estudio titulado “Evaluación de la Contaminación y Niveles de Limpieza requeridos en el Subsuelo y Acuífero de una Refinería” (Iturbe, 2000) a partir del cual los resultados obtenidos y en las recomendaciones dadas, se solicitó la aplicación de pruebas piloto de las técnicas de saneamiento propuestas en terrenos de una refinería, proponiendo además, evaluar la eficiencia de la atenuación natural de acuerdo con la comparación de algunos resultados del muestreo del suelo realizado durante 1999.

Dentro del estudio anteriormente mencionado, se contempló llevar un control de la atenuación natural en las áreas con concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) mayores a 2,000 y menores a 30,000 mg/kg. Para lograr satisfacer los objetivos y alcances de dicho estudio se consideraron las siguientes actividades:

- a) Realizar un muestreo de suelo a la misma profundidad que el de 1999 en los puntos que presentaron mayores concentraciones de HTP.
- b) Realizar un plano comparativo de los puntos con mayores concentraciones, donde se muestren dichas concentraciones registradas en 1999 y las del año 2000, respectivamente, como se muestra en las siguientes Tablas.

Tabla 2.2 Resultados comparativos de HTP (1999-2000)

Concentración de HTP (mg/kg)					
Patio Norte			Refinería		
Punto	1999	2000	Punto	1999	2000
36	20,935	30,265	181	15,783	51,873
57	51,798	94,815	257	15,488	18,634
306	501	111,150	258	5,990	14,389
307	20,758	130,584	265	6,761	17,259
			273	5,382	7,973

Tabla 2.3. Resultados comparativos de HAP (1999-2000)

Concentración de HAP (mg/kg)			
Compuesto	Punto	1999	2000
Antraceno	227	NR	1.41
	273	15.90	ND
Benzo(a)pireno	273	1.65	ND
Criseno	181	ND	0.64
	227	NR	0.91
Fenantreno	227	NR	10.98
	273	94.30	ND
Naftaleno	181	6.28	13.55
	227	NR	4.94
	273	13.60	ND

ND= No Detectado; NR= No Realizado

Para evaluar la atenuación natural después de transcurrido un año del primer muestreo, se seleccionaron 33 de los 324 puntos muestreados en 1999. El criterio para la selección del muestreo se basó en los puntos que en el año de 1999 presentaron las más altas concentraciones de HTP.

Como en el inicio de la aplicación de la atenuación natural en el suelo de la Refinería, se presentaron concentraciones elevadas de hidrocarburos poliaromáticos (1999), en especial del antraceno, benzo(a)pireno, criseno, fenantreno y naftaleno; en el año 2000 y posteriormente en el 2002 se determinó nuevamente la concentración de HAP, conociendo por medio de éste último el punto de muestreo que presentó mayor concentración de los mismos que fueron analizados en noviembre del mismo año y en marzo del año en curso.

Tabla 2.4. Resultados comparativos de HAP en la Refinería, 2002-2003

Concentración de HAP (mg/kg)		
Compuesto	2002	2003
Antiaceno	28.0363	0.0098
Benzo(a)pireno	8.9887	0.0350
Criseno	12.1661	0.1013
Fenantreno	265.5959	0.0426
Naftaleno	15.7385	0.0254

CAPÍTULO III

Objetivos

De acuerdo con los antecedentes mencionados, se presentan a continuación los objetivos de este trabajo:

3.1 OBJETIVO GENERAL

- Estudiar la atenuación natural y biorremediación en suelos contaminados con HAP (hidrocarburos aromáticos policíclicos).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudiar la atenuación natural y biorremediación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, encontrados en el suelo proveniente de una Refinería Mexicana, como el antraceno, benzo (a) pireno, criseno, fenantreno y naftaleno.
- Estudiar en pruebas experimentales la evolución de la atenuación natural y biorremediación en función del tiempo.

- ➤ Comparar la evolución de la atenuación natural y biorremediación en el suelo contaminado con hidrocarburos de la Refinería, con respecto a las pruebas experimentales estudiadas.

- Seleccionar los factores que influyen en la evolución de la atenuación natural y biorremediación.

3.3 ALCANCES

- Medir la degradación de los HAP en un periodo de tres meses, en un suelo contaminado; y mediante estudios en laboratorio, en cajones con condiciones controladas, determinar si estas afectan durante el proceso de la atenuación natural y la biorremediación.

CAPÍTULO IV

Marco Teórico

4.1 CONTAMINACIÓN DEL SUELO

El suelo se define como toda la capa de tierra que se encuentra suelta, diferenciándola de la roca sólida y de la cual dependen plantas, microorganismos y seres vivos. El suelo es un sistema complejo, polifuncional, polidisperso, polifásico, abierto, estructurado, dinámico en el tiempo y variable en el espacio, que ocupa la parte superficial de la corteza de intemperismo de las rocas. La formación del suelo es una función compleja de diferentes factores como el relieve, material parental, microorganismos, clima y tiempo. Su principal característica es que está formado por arena, limo y arcilla, además de estar constituido por otra gran variedad de compuestos, de los cuales, los más importantes son los nutrientes. Su espesor va de algunos milímetros a varias decenas de metros (Acevedo, 2000).

De manera general, puede definirse a la *contaminación*, como la adición de cualquier sustancia al medio ambiente, en tales cantidades que sea capaz de causar efectos adversos a los seres vivos o materiales que se encuentren expuestos a dosis que sobrepasan los niveles que de manera normal, se encuentran en la naturaleza.

Es debido al contexto anterior que, en este caso la *contaminación del suelo*, es consecuencia de la alteración nociva del ecosistema, ocasionando el desequilibrio del recurso no renovable o difícilmente renovable, alterando sus propiedades y/o características.

4.2 ATENUACIÓN NATURAL

Años atrás el esfuerzo de la remediación era dirigida por una combinación de factores económicos y políticos. Durante este tiempo los contaminantes como los disolventes clorados, metales pesados y a los hidrocarburos aromáticos Policíclicos (HAP) se les prestaba mayor atención. La evolución de las tecnologías de remediación ha sido influenciada no sólo por el cambio de factores políticos y económicos, sino que además por el tipo y características químicas de los contaminantes de interés. Las tecnologías de remediación han sufrido cambios durante estas últimas dos décadas, en las cuales se han aplicado diferentes técnicas de limpieza en la superficie por problemas de contaminación de residuos peligrosos. Algunos de estos cambios se han suscitado en la forma de aplicación de las tecnologías de remediación como resultado de la presión que existe por parte del sector industrial, trayendo con ello, una mejora continua en técnicas de eficiencia y costo-eficacia en tecnologías. El patrón de evolución se ha enfocado a soluciones más naturales, aumentando la existencia de condiciones biogeoquímicas en la superficie, las cuales contribuyen en la remediación.

Los cambios más recientes ocurrieron al final de la década de los 90, con el reconocimiento y demostración de que los mecanismos naturales contribuyeron al contenido, control y reducción de masa de contaminantes en el suelo y agua subterránea. Conocido por varios nombres entre los que destacan: la atenuación natural, bioatenuación, remediación natural, monitoreo de atenuación natural), esta propuesta de remediación ha tomado importancia como una propuesta viable

de remediación de sitios contaminados, con apropiadas condiciones biogeoquímicas aceptables (Suthersan, 2002).

La atenuación natural no es una alternativa de no acción. Los procesos de atenuación natural incluyen una gran variedad de procesos físicos, químicos o biológicos que bajo condiciones favorables actúan sin intervención humana para reducir la masa, toxicidad, movilidad, volumen y concentración de los contaminantes presentes en el suelo.

El monitoreo de la atenuación natural (MAN) define el monitoreo requerido de parámetros para demostrar que el proceso natural progresivo continua para conocer los objetivos de la remediación. El MAN es también referido como degradación natural y remediación intrínseca o pasiva. El MAN se considera una buena elección, puesto que ayuda a controlar y mantener los niveles de contaminación; lo cual depende de las condiciones geológicas, tipo de contaminante, masa del contaminante y distribución presente en el sitio contaminado (NRC, 2000).

La agencia de protección del medio ambiente de Estados Unidos (USEPA, 1999) define la atenuación natural supervisada como: "la confianza en los procesos naturales de la atenuación (dentro del contexto de un acercamiento cuidadosamente controlado y supervisado de la limpieza general del sitio) para alcanzar objetivos (sitio-específicos) de remediación dentro de un tiempo que es razonable comparado al ofrecido por otros métodos más activos. Los procesos naturales de la atenuación presentes en la remediación incluyen una variedad de procesos físicos, químicos o biológicos que, bajo condiciones favorables, actúan sin la intervención humana para reducir la masa, toxicidad, movilidad, volumen o concentración de contaminantes en suelo o agua subterránea. Estos procesos *in-situ* incluyen la biodegradación, dispersión, dilución, absorción, volatilización,

decaimiento radiactivo y estabilización, transformación o destrucción química o biológica de contaminantes” .

La *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 1997) define la atenuación natural como: “la reducción en masa o la concentración de un compuesto en distancia en un cierto plazo, del agua subterránea de la fuente de los componentes debido a la comprobación que naturalmente ocurre, al producto químico y a los procesos biológicos; tal como la biodegradación, dispersión, dilución, adsorción y volatilización”.

El centro de la fuerza aérea de Estados Unidos para la excelencia ambiental (Wiedermeier, *et al*, 1995) define la atenuación natural como: “resultado de los procesos de la integración de varios mecanismos subsuperficiales de la atenuación que se clasifican como destructivos o no destructivos. La biodegradación es el mecanismo destructivo más importante de la atenuación. Los mecanismos no destructivos de la atenuación incluyen la absorción, dispersión, dilución de la recarga y volatilización”.

El ejército de Estados Unidos (US Army, 1995) define la atenuación natural como: “la reducción de las concentraciones del contaminante en el ambiente con los procesos biológicos (consumo aerobio y anaerobio de la biodegradación, de plantas y animales), los fenómenos físicos (advección, dispersión, dilución, difusión, volatilización, sorción/desorción) y las reacciones químicas (intercambio iónico, complejación, transformación abiótica). Los términos tales como remediación o biotransformación intrínseca son incluidos dentro de la definición natural más general de la atenuación”.

La atenuación natural, se considera una alternativa para darle saneamiento a suelos contaminados con hidrocarburos, donde la degradación ocurre de forma

natural y por lo tanto, la más económica en comparación con otras técnicas de saneamiento, con las cuales no se han obtenido grandes tasas de remoción altas para HAP, o en el caso de que así sea, ha sido a costa de elevadas inversiones. Es por consiguiente que, después de técnicas como bombeo y tratamiento, desorción térmica, extracción de vapor e inyección de aire (Troy, 1995), entre otros tratamientos químicos; la atenuación natural ha sido propuesta como una alternativa para sitios donde aún después de la aplicación de dichas técnicas la concentración de hidrocarburos persiste. Sin embargo, han ayudado enormemente al reducir el potencial de la migración fuera del sitio de los contaminantes. Es entonces que se aplica la atenuación natural como complemento de un tren de tratamiento para remediar suelos contaminados. En otros países, como Alemania, se considera a la atenuación natural como una alternativa, como técnica clásica de remediación; ya que por medio de procesos de manera natural se retienen y reducen los contaminantes (Suthersan, 2002).

De manera general, la atenuación natural se ha aplicado a nivel laboratorio, en columnas, tratando agua subterránea en la mayoría de los casos y no precisamente se ha estudiado en suelos, o en campo para limpieza de acuíferos. En el agua subterránea, de manera similar que en el suelo, la atenuación depende de factores ambientales; sin embargo, en este caso depende principalmente de mediciones a la entrada y salida de las columnas, de oxígeno disuelto ya que es el indicador de que se lleve a cabo la atenuación. En los estudios en columnas se han obtenido hasta el momento, resultados satisfactorios en cuanto a la remoción de BTEX y de HAP (McAllister, 1995).

La literatura menciona que la mayoría de los HAP de bajo peso molecular y de los BTEX son fácilmente degradables en presencia de oxígeno. Los estudios de campo indican que la degradación anaerobia de los mismos es posible en presencia de Fe(III) y que específicamente en el caso del naftaleno se observa la utilización de

Mn(IV) como aceptor de electrones, además de que se presenta degradación en presencia de sulfato como aceptor de electrones (Schulze *et al*, 2001).

Aunque lo anterior se ha presentado en algunos casos, no puede generalizarse, ya que cada uno de los sitios consta de características y propiedades completamente distintas. Sin embargo, es muy importante tomar en cuenta que los estudios con microcosmos son requeridos para entender el proceso de atenuación microbiana y para poder diagnosticar la degradación del contaminante presente en la pluma del sitio en estudio. La biodegradación es uno de los principales procesos que ayudan a la atenuación natural en el suelo, siendo los microorganismos esenciales para cambiar la química del suelo. La adaptabilidad que tenga la población microbiana, así como el requerimiento nutricional es lo que permite remover con mayor rapidez a los contaminantes por medio de reacciones. Es entonces que los cambios químicos causados por los microorganismos pueden directa o indirectamente disminuir las concentraciones de los contaminantes (Ginn, 1995).

Los microorganismos utilizan enzimas para acelerar las tasas de ciertas reacciones biogeoquímicas; las reacciones más importantes son de reducción y oxidación, conocidas como reacciones redox; éstas involucran la transferencia de electrones de una molécula a otra, lo cual permite a los microorganismos generar energía y crecimiento.

Es entonces que como consecuencia de las reacciones que se presentan en el suelo, la biodegradación potencial variará dependiendo del tipo de hidrocarburo (J. Calabrese, 1991).

4.3 BIORREMEDIACIÓN DEL SUELO

La biorremediación del suelo consiste en el uso de microorganismos para limpiar suelos contaminados, dichos microorganismos, con ayuda de componentes celulares y enzimas libres, se encargan de consumir los compuestos contaminantes y siguiendo vías metabólicas son catalizadas por enzimas segregadas por ellos, logrando realizar una mineralización (compuesto orgánico \Rightarrow $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$), una transformación parcial, la humificación de los residuos o de agentes contaminantes y una alteración del estado redox de los metales.

En algunas publicaciones se considera que la biorremediación es parte de la atenuación natural y en otras se considera que la atenuación natural es parte de la biorremediación. En este trabajo se considera por separado, ya que la biorremediación consta de múltiples opciones (biopilas, biolabranza, biorremediación *in situ* con adición de nutrientes, etc.), mientras que la atenuación natural considera una acción de control en que se estudian los procesos que se están llevando a cabo. La biorremediación se basa en la activación de la degradación microbiana de compuestos en sitios contaminados, a través de mejorar factores ambientales, como son la concentración de nutrientes, el contenido de agua, el pH, la temperatura, el intercambio de oxígeno y la disponibilidad de los contaminantes hacia los microorganismos. En comparación con las técnicas de remediación química, física y térmica, la remediación microbiológica del suelo ha probado principalmente ser la técnica más eficiente, económica y la más favorable para la limpieza de suelos contaminados (Riser, 1992).

En general existen dos estrategias para ayudar a un ecosistema a remediarse:

- Agregando nutrimentos de manera que se estimule a las población microbiana que se encuentra de manera natural (bioestimulación), logrando con ello aumentar su actividad.
- Introduciendo microorganismos exógenos dentro del ecosistema como forma de remediación, empleando microorganismos genéticamente modificados haciéndolos más eficientes en la biorremediación (aumentación).

Las ventajas más importantes de la biorremediación son entre otras(Testa, 1991):

1. Que es un proceso natural.
2. La remediación de los productos remediados es principalmente inofensiva.
3. Los suelos descontaminados pueden ser reutilizados.

Debido a que la biorremediación *in situ* no implica excavación, los costos y molestias de excavación y transporte son eliminados, es por ello que la biorremediación es uno de los pocos procesos de tratamiento actualmente aceptados. La mayor desventaja de esta tecnología es que no todos los compuestos químicos pueden ser degradados por los microorganismos y la acumulación de metabolitos tóxicos durante la remediación del suelo no puede ser excluida (Reddi, 2000).

Además, los suelos naturales en la región aerobia, casi siempre contienen microorganismos que pueden emplear hidrocarburos combustibles como fuente de energía. Las bacterias del suelo, *actinomicetos* y otros microorganismos pueden ser relativamente fácilmente aclimatados para utilizar los compuestos en su

proceso metabólico, logrando que el compuesto sea reducido a biomasa y CO₂ en este tipo de degradación.

Para el diseño de una exitosa remediación biológica *in situ* se deben considerar los siguientes 5 parámetros (Calabrese and Kostecki; 1991):

- Microbiología del suelo: Se debe analizar la microbiología del suelo del sitio problema con la finalidad de garantizar la presencia de un número de bacterias heterótrofas dentro de las cuales existan las que degradan los compuestos de interés.
- Química del suelo: Se debe analizar la concentración de nutrimentos en el suelo para asegurar que se cuenta con la relación adecuada de carbono, nitrógeno y fósforo. Además, debe existir el nivel de oxígeno requerido para mantener el crecimiento de los microorganismos así como los niveles no tóxicos de sales o metales pesados que pueden estar presentes.
- Física del suelo: La permeabilidad del aire en el suelo debe ser adecuada para permitir el movimiento del oxígeno y nitrógeno para el suelo afectado y movimiento de CO₂.
- Morfología del suelo: Es necesario conocer la estratigrafía del suelo en la zona afectada con la finalidad de considerar la homogeneidad del estrato. En caso de más de un estrato se requiere conocer las características de los demás para saber si es factible la actividad degradadora de los microorganismos.
- Hidrogeología: La profundidad del nivel freático, la dirección del flujo y el gradiente del agua subterránea, la presencia o ausencia de productos flotantes y concentraciones de los hidrocarburos de petróleo en el agua subterránea debe conocerse previo a la aplicación de la biorremediación *in situ*.

Microbiología del suelo

Los pasos cruciales de la bioquímica de los hidrocarburos de petróleo son la oxidación de la cadena recta o los alcanos ramificados y el rompimiento de los anillos aromáticos por la enzima oxigenasa, pues relativamente pocos microorganismos poseen los sistemas de enzima necesarios para cumplir estos pasos cruciales.

Dos preguntas críticas que deben ser analizadas para el diseño en la biorremediación in situ en suelos en los cuales los hidrocarburos de petróleo se extienden a profundidades mayores de 15 m o más, son:

1. ¿Son viables los microorganismos presentes en el suelo a diferentes profundidades con los hidrocarburos de petróleo?
2. ¿Son estos microorganismos capaces de degradar hidrocarburos de petróleo?

En general, la mayor población de microorganismos radica en los horizontes superficiales, según las condiciones de temperatura, humedad, aireación y alimento, sean o no favorables. De acuerdo con lo anterior un nuevo organismo puede desarrollarse fácilmente en 20 o 30 minutos. Es por ello, su importancia con respecto a su ilimitada capacidad de aumentar una población en el suelo (Buckman, 1991).

Químicos del suelo

En un suelo que contiene hidrocarburos del petróleo, la degradación biológica ocurre naturalmente hasta que la disponibilidad de oxígeno y nutrientes se consumen.

El oxígeno se requiere en una tasa de aproximadamente 3.1 kg de oxígeno/kg de hidrocarburo degradado. La suma máxima de oxígeno en un suelo bien aireado es de aproximadamente el 20%, o 200,000 ppm. La suma máxima de oxígeno en un suelo saturado es de aproximadamente 8 ppm. Dado que el oxígeno es generalmente el mayor elemento limitante en los suelos contaminados, el sistema más eficiente para suministrar oxígeno en el suelo es en fase vapor (J. Calabrese and Kosteki; 1993).

El nitrógeno se requiere en una tasa arriba de 1 kg de nitrógeno amoniacal por 160 kg de hidrocarburo. El nitrato de amonio, se disuelve en el agua del suelo como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). Cuando el ión anhídrido de amonio en el suelo seco entra en contacto con el agua, el amoniaco se disuelve como ión amonio (NH_4^+).

El fósforo es generalmente considerado, por ser el otro elemento limitante en la biorremediación del suelo y es rutinariamente añadido sobre el suelo en los casos de biorremediación. El fósforo es muy insoluble en muchos suelos y la disponibilidad de que en el suelo decrezca es debajo de un pH de 5.5 y arriba de 7.0. Bajo estas condiciones el intervalo óptimo de pH es de 7.5 a 8.5, por lo que es difícil incrementar la disponibilidad del fósforo por adición de fertilizante (Dragun, 2001).

Pruebas anteriores indican que en algunos sitios determinados no solamente los elementos como el nitrógeno y oxígeno son limitantes en la biorremediación, sino también los cambios en la microbiología del suelo.

Física del Suelo

La capacidad para tratar oxígeno y nitrógeno reducido en el suelo contaminado depende de la estimulación que tengan los microorganismos nativos para

degradar a los hidrocarburos del petróleo. La permeabilidad de aire (k_{aire}) es una función de la textura del suelo (distribución del tamaño de partícula en el suelo), del contenido de agua en el suelo y densidad de volumen, este parámetro se encarga de controlar el movimiento de vapor en el suelo.

Por lo que la existencia de la población microbiana en el suelo dependerá de las condiciones del suelo, particularmente de la abundancia de alimentos. Así hay una fluctuación constante y rápida: multiplicación y muerte, casi siempre por inanición. La mayoría de las bacterias presentes en el suelo son heterótrofas, es decir, que la energía y el carbono los toman directamente de la materia orgánica del suelo. Los microorganismos del suelo reportados para degradar hidrocarburos bajo condiciones favorables incluyen las *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achrombacter*, *Anthrobacter*, *Micrococcus* y *Actinobacter*. Más de 200 especies de microorganismos del suelo pueden asimilar hidrocarburos como sustrato. Los suelos fértiles, con adecuado contenido de carbón, oxígeno y nutrimentos generalmente contienen de 10 millones a 1 billón de microorganismos por gramo, es decir, 10^7 a 10^9 microorganismos/g de suelo seco, de los cuales 10^5 a 10^6 son degradadores de hidrocarburos (previo a la adición de hidrocarburos). Después de que los hidrocarburos han sido introducidos, se observa que hay degradadores de hidrocarburos en 10^6 a 10^8 /g de suelo seco (K. Nyer, 1993).

La variedad de productos de hidrocarburos y su concentración también tiene un gran efecto sobre la tasa de bioactividad. Los hidrocarburos que tengan menos de 10 átomos de carbono tienden a ser relativamente fáciles de degradar, en tanto la concentración no sea alta o suficiente como para ser tóxico para el microorganismo. A medida de que el tamaño de la molécula se incrementa, la tasa de biodegradación tiende a disminuir en una forma desproporcionada.

La estructura del suelo, la cual es la forma de montaje de las partículas, determina la disponibilidad de que el suelo transmita aire, agua y nutrientes para la zona de bioactividad. En suelos que contienen significantes porcentajes de limo y arcilla, generalmente no se transmiten estas sustancias suficientemente para estimular la bioactividad rápida. Los suelos más permeables son más propicios para rápidas actividades de limpieza.

Es de gran importancia tener siempre en cuenta que las condiciones físicas, la calidad del producto y biomasa son únicos en cada sitio y que las pruebas de laboratorio son un requisito previo para el éxito del proyecto de remediación. La mayoría de los organismos que degradan productos combustibles actúan cerca de los 20°C, aunque presentan una significativa actividad entre los 10°C y los 30°C (USEPA, 2001).

La disponibilidad de agua es un factor muy importante en la acción microbiana. La cantidad de agua presente influye en la composición de especies en el sitio. En general, la actividad óptima ocurre cuando el contenido de agua del suelo es 50-80% de saturación (capacidad de campo). Cuando cae por debajo del 10%, la bioactividad llega a ser marginal. Otro factor importante es la tasa de control de oxígeno disponible a la cual los organismos aerobios pueden funcionar. La falta de oxígeno es generalmente el factor limitante principal para la biodegradación *in situ*. El agua subterránea puede contener entre 1-4 ppm de oxígeno. 1 L de agua en el espacio de poro contienen 4 ppm de oxígeno, mientras que 1 L de aire contiene 20% de oxígeno. La bioactividad en suelos insaturados, por lo tanto, puede ser mucho más rápido en la parte superficial que debajo de la capa freática cuando un volumen adecuado de aire abastece ésta, siempre que los niveles de oxígeno y nutrientes sean controlados.

4.4 HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP)

Los hidrocarburos son compuestos formados por átomos de carbono e hidrógeno, de gran abundancia en la naturaleza, presentes principalmente en el petróleo. Se considera a los hidrocarburos de petróleo como una mezcla líquida compleja de gases, líquidos y sólidos, en que existen pequeñas cantidades de mezclas de nitrógeno, oxígeno y azufre, además de contener compuestos de hierro, níquel, vanadio y otros metales. Dentro de la clasificación de los hidrocarburos se encuentran los Hidrocarburos Antrópicos, los cuales se presentan como resultado de cualquier tipo de actividad humana. Los procesos de combustión industrial contribuyen con niveles mucho más altos, debido principalmente al humo generado por combustibles fósiles, las descargas de aguas municipales, las actividades de transporte y los derrames que son algunas de las principales fuentes de estos contaminantes.

Los HAP son contaminantes orgánicos originados de la pirólisis de combustibles fósiles, así como sus homólogos alquil y los sustituidos con azufre o nitrógeno. Adicionalmente, son contaminantes orgánicos de gran importancia debido a que algunos de ellos son tóxicos, cancerígenos y mutagénicos, que afectan el equilibrio ecológico y la salud humana, por lo que se ha reportado que los HAP son producidos a altas temperaturas entre los 400-500°C.

La característica química principal es su estructura constituida por varios anillos bencénicos que pueden tener origen natural (las plantas y las bacterias son fuente de hidrocarburos) o antropogénico, derivado tanto de las actividades que emplean al petróleo, como de combustiones incompletas, (incineración de residuos urbanos e industriales, incendios forestales, centrales térmicas, etc.) (Blumer, 1975).

Una vez que los HAP son liberados al ambiente acuático, la degradación a través de microorganismos es a menudo lenta, lo que conduce a su acumulación en los sedimentos, suelos, plantas acuáticas y terrestres, peces e invertebrados expuestos. Los HAP son sustancias liposolubles que se forman como productos de la combustión del petróleo y residuos del procesamiento del carbón. Estos se pueden considerar como contaminantes ubicuos. Por su persistencia en el ambiente y su genotoxicidad, actualmente se realizan investigaciones para la remoción de estos compuestos, ya que son removidos de los sitios contaminados principalmente por la degradación microbiana. Sin embargo, pueden sufrir procesos tales como volatilización, fotooxidación, oxidación química, bioacumulación, absorción y adsorción a la matriz del suelo. También son compuestos no polares o muy débilmente polares. Se ha determinado que los compuestos no polares o débilmente polares tienen afinidad por las fases orgánicas hidrofóbicas en ácido húmico siendo las fuerzas de Van der Waals o la atracción hidrofóbica la unión del enlace.

Se encuentran formados por dos o más anillos de benceno fusionados entre sí, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático.

Existen 2 clases de hidrocarburos aromáticos: los de bajo peso molecular que poseen de 2 a 3 anillos aromáticos como lo son el naftaleno, el fenantreno, el antraceno y sus derivados, y los de alto peso molecular que tienen de 4 a 7 anillos aromáticos como el criseno y benzo(a)pireno. Sus características físicas y químicas varían de acuerdo con su peso molecular y, en consecuencia, en su distribución y efecto en el ambiente, lo mismo sus efectos en los sistemas biológicos (Dragun, 2001).

4.4.1 DEGRADACIÓN DE LOS HAP

Los estudios de degradación de los HAP comenzaron hace más de 80 años cuando se aislaron bacterias capaces de degradar compuestos aromáticos usándolos como fuente de carbono. Desde entonces es que se conoce la importancia que tiene el desarrollo y función de los microorganismos para que se logre degradación de los contaminantes.

Existe una amplia gama de bacterias degradadoras para los HAP; las *Pseudomonas* de diferentes especies, encontrándose la *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescense*, las que comúnmente se encuentran como degradadora de ellos; principalmente para el naftaleno, fenantreno y criseno, respectivamente; por el contrario para el benzo(a)pireno, debido a su estructura de 5 anillos, la biodegradación es mucho más complicada, siendo la *Mycobacterium sp.* y *S. paucimobilis*, las bacterias que se han encontrado hasta el momento capaces de degradar hidrocarburos aromáticos con 5 anillos (Sudip, *et al*, 2002).

Así como los microorganismos nativos se han encargado de degradar a los HAP, de igual manera se han inoculado bacterias que aceleran la mineralización del fenantreno y del criseno (que son los que se encuentran con mayor frecuencia) en un suelo contaminado con aceite crudo. Sin embargo, se han obtenido diferentes relaciones entre la producción de CO₂ y la degradación y/o mineralización de los HAP. Las bacterias probadas se han clasificado como DC1 y PD2 (*Pseudomona*), obteniendo que la inoculación en un suelo con aceite crudo, la bacteria DC1 no incrementa la liberación de CO₂ del fenantreno y el pireno; en contraste con la mineralización acelerada cuando DC1 se adiciona a suelos contaminados con hidrocarburos en ausencia de aceite (Smith, *et al*, 1999). De la misma forma, el naftaleno se reporta como uno de los HAP que se han visto favorecidos por los

microorganismos nativos del suelo, los cuales han sido capaces de degradarlo (Gini, *et al*, 1995).

En el caso del fenantreno, varios estudios reportan la alta degradación que se alcanza, gracias a las bacterias nativas del suelo; es por esto, que el fenantreno ha sido usado como modelo en estudios de vías de degradación, ya que su estructura es muy similar a la del benzo(a)pireno (HAP carcinógeno). Tomando en cuenta que dicha situación se presenta si el contenido de agua es elevado en el suelo, aproximadamente del 40% de su capacidad de campo (Liu, *et al*, 2001), es que alrededor de los 2 meses se observa una notoria disminución en su concentración; sin embargo, su tasa de mineralización es muy lenta en la mayoría de los casos, aún teniendo alto contenido de agua; el motivo de que esto suceda puede ser la fuerte adsorción y la baja solubilidad en agua del fenantreno, a diferencia del naftaleno, que aproximadamente en 4 días ya presenta disminución en su concentración y mineralización.

La importancia de la degradación de los HAP es debido a la toxicidad que la mayoría de éstos representan para el ser humano, además de que son de gran interés por ser identificados como compuestos químicos potenciales en el ambiente por los efectos adversos que causan (USEPA, 1989). Esto se deduce de un estudio realizado en aceite crudo, en el cual se analizan los 16 HAP que se encuentran con mayor frecuencia; encontrando que el naftaleno y el criseno se presentan con un 100% de frecuencia, el fenantreno con un 98%, seguido del benzo(a)pireno con un 75% y finalmente el antraceno con un 40% (Kerr, *et al*, 2001).

La biodegradación de los HAP depende del control del pH, nutrimentos, oxígeno (para procesos aeróbicos) y humedad que presente el suelo (Iturbe, *et al*, 2003), además de considerar la disposición del contaminante, la cual puede influir al

igual que los demás factores en la tasa de degradación o mineralización del compuesto (Freijer, *et al*, 1996).

Para determinar la mineralización de los HAP que presenta el suelo es importante considerar, además de los factores ambientales; la producción de CO₂ y el consumo de O₂ que se obtiene de la cinética o bioactividad de los microorganismos con ayuda de la disponibilidad del sustrato y de un aceptor de electrones (Smith, *et al*, 1997).

La tasa de descomposición y la disminución de la concentración en el tiempo es debido al continuo consumo de los hidrocarburos asimilados por los microorganismos (Freijer, 1996).

Estudios anteriores (Adams, *et al*, 2002) han probado que las tasas de respiración dependen de la intensidad de contaminación que presente el suelo, es decir, si el suelo presenta contaminación moderada de hidrocarburos, las tasas de respiración son ligeramente más altas, en comparación con muestras muy contaminadas, en las que se observan tasas de respiración más bajas. Deduciendo que para este parámetro el porcentaje de carbono orgánico, la textura del suelo muy fina y la aireación reducida en suelos orgánicos, así como la inadecuada relación de nutrientes, son factores que influyen en la reducción de la respiración microbiana.

4.4.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS HAP (Montgomery, 1990; Hawly, 1993; Lide, 1999; Budavari, 2001)

ANTRACENO

Estructura Química (C₁₄H₁₀)



Propiedades:

- Cristales amarillos con fluorescencia azul.
- Tiene propiedades de semiconductores.
- Combustible.
- Reacciona el anillo central porque así se obtiene un producto que posee la aromaticidad completa de dos anillos de benceno. Cualquier otra posibilidad conduciría a un producto de aromaticidad más baja y, por tanto, menos estable.

Propiedades Químicas:

Tabla 4.1 Propiedades Químicas del Antraceno

Peso molecular (g)	178.24	Punto fusión (°C)	217
Densidad g/cm ³ (27/4°C)	1.25	Punto ebullición (°C)	340
Log Kow	4.45	Presión de vapor a 279 °C (mm Hg)	200
Cte. Henry (atm*m ³ /mol)	6.50x10 ⁻⁵	Punto inflamación (°C)	121
Estado	Cristalino/ Gas	Tem. autoignición (°C)	540
Polarizabilidad (10 ⁶ x10 ⁻²⁴ cm ³)	25.4	Solubilidad en agua (mg/L)	4.34x10 ⁻²

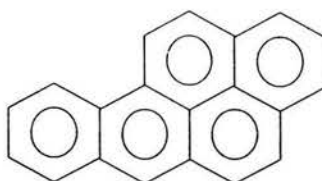
Volumen molar crítico (cm ³ /mol)	35	Entalpía estándar de formación a 298.15 K (J/mol)	Cristalino: 129.2 Gas: 230.9
Entalpía vaporización en el punto de ebullición (kJ/mol)	0.57	Entalpía de combustión a 298.15 K (J/mol)	Cristalino: 7067.5 Gas: 7169.2
Entalpía vaporización a 25 °C (kJ/mol)	7.45	Entalpía fusión en el punto de fusión (KJ/mol)	28.83
Temperatura crítica (°C)	1400	Entropía estándar a 298.15 K (J/mol)	Cristalino: 207.5
Cte. dieléctrica de líquidos a 229°C (a 100 kPa)	2.649	Capacidad calorífica molar a 298.15 K (J/mol)	Cristalino: 210.5

Usos:

- Colorante: Alizarina, Fenantreno carbazol, antraquinona.
- Semiconductor orgánico de investigación.

BENZO(a)PIRENO

Estructura Química (C₂₀H₁₂)



Propiedades:

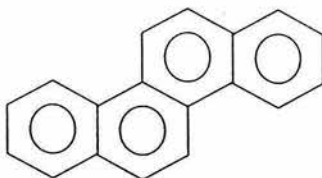
- Cristales amarillos.
- Inoloro.
- Poco soluble en agua, presenta mayor solubilidad en numerosos solventes orgánicos (aromáticos, clorados, etc).

Propiedades Químicas:**Tabla 4.2 Propiedades químicas del Benzo(a)pireno**

Peso molecular (g)	252.3	Punto fusión (°C)	178
Contenido de carbono e hidrógeno (%)	C: 95.21 H: 4.79	Punto ebullición (°C)	448
Densidad g/cm ³ (20/4°C)	1.282	Presión de vapor a 25°C (mm Hg)	5.49x10 ⁻⁹
Log K _{ow}	5.99	Entalpía fusión en el punto de fusión (kJ/mol)	17.3
Cte. Henry (atm*m ³ /mol)	<2.4x10 ⁻⁶	Log K _{oc}	5.60-6.29
Estado	Cristalino	Solubilidad en agua a 25°C (mg/L)	0.0038

Usos:

- ✓ Investigación química.
- ✓ Investigación bioquímica.

CRISENO**Estructura Química (C₁₈H₁₂)****Propiedades:**

- ✓ Cristales.
- ✓ Carcinógeno potencial en humanos.
- Apariencia de placas ortorómbicas, mostrando fuerte fluorescencia bajo luz ultravioleta.
- Sublima fácilmente en el vacío.

- Insoluble en agua y ligeramente soluble en alcohol, éter, ácido acético.
- Se obtiene de la destilación del alquitrán de hulla.

Propiedades Químicas:

Tabla 4.3 Propiedades Químicas del Criseno

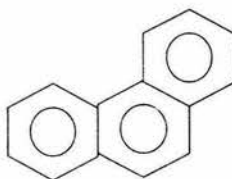
Peso molecular (g)	228.30	Punto fusión (°C)	254
Densidad g/cm ³ (20/4°C)	1.274	Punto ebullición (°C)	448
Log K _{ow}	5.73	Presión de vapor a 25°C (mm Hg)	6.3x10 ⁻⁷
Cte. Henry (kPa*m ³ /mol)	0.006	Energía de ionización (eV)	7.6
Estado	Cristales y Gas	Tem. autoignición (°C)	-
Entalpía de combustión a 298.15 K (J/mol)	26.2	Solubilidad en agua a 25°C (mg/L)	0.006
Entalpía fusión en el punto de fusión (kJ/mol)	26.2	Entalpía estándar de formación a 298,15 K (J/mol)	Cristales: 145.3 Gas:269.8

Usos

- Síntesis orgánica.
- Derivado de carbón experimental e industrial en operaciones de gasificación.

FENANTRENO

Estructura Química (C₁₄H₁₀)



Propiedades:

- Sustancia nociva por inhalación, y principalmente por ingestión.
- Si se mezcla con otros compuesto poliaromáticos, aumenta su toxicidad.
- Se remueve por evaporación, oxidación microbiana y sedimentación.
- Se obtiene por destilación fraccionada de aceites de alquitrán de hulla de alto punto de ebullición con posterior recristalización en alcohol.

Propiedades Químicas:**Tabla 4.4 Propiedades químicas del Fenantreno**

Peso molecular (g)	178.24	Punto fusión (°C)	100.5
Contenido de carbono e hidrógeno (%)	C: 94.34 H: 5.66	Punto ebullición (°C)	340
Log K _{ow}	4.52	Presión de vapor a 25 °C (mm Hg)	6.8x10 ⁻⁴
Cte. Henry (atm*m ³ /mol)	3.9x10 ⁻⁵	Solubilidad en agua a 15°C (mg/L)	1.6
Estado	Cristales y Gas	Entalpía estándar de Formación a 298.15 K (J/mol)	Cristalino: 116.2 Gas: 207.5
Energía de ionización (eV)	7.8914	Entalpía fusión en el punto de fusión (kJ/mol)	16.46
Entalpía vaporización a 25 °C (KJ/mol)	75.5	Entropía estándar a 298.15 k (J/mol)	Cristalino: 215.1
Temperatura crítica (°C)	595.85	Capacidad calorífica molar a 298.15 K (J/mol)	Cristalino: 220.6

Usos:

- Colorante.
- Explosivo.
- Síntesis de drogas.
- Investigaciones bioquímicas.

- Fabricación de fenantreno quinona.
- Síntesis orgánicas.

NAFTALENO

Estructura Química (C₁₀H₈)



Propiedades:

- Es sólido a temperatura ordinaria.
- Copos volátiles, de color blanco, formando cristales.
- Tiene olor fuerte y característico al alcanfor.
- Su olor es perceptible ya en concentraciones de 0.3 ppm.
- Comercialmente se presenta en forma de polvos, escamas o esferas.
- Es soluble en tolueno, xileno y éter etílico; y muy poco soluble en agua, aceite y alcohol etílico.
- El líquido proveniente de la fusión es de color amarillento o marrón, conservando el olor característico.
- Cerca del punto de fusión, el producto sólido sublima, emitiendo vapores que son mas pesados que el aire y se propagan a ras del suelo.
- Sublima a temperatura ambiente.

Propiedades Químicas:

Tabla 4.5 Propiedades químicas del Naftaleno

Peso molecular (g)	128.18	Punto fusión (°C)	80.2
Contenido de carbono e hidrógeno (%)	C: 93.71 H: 6.24	Punto ebullición (°C)	217.96

Densidad g/cm ³ (20/4°C)	1.145	Presión de vapor a 25°C (mm Hg)	0.23
Log K _{ow}	3.36	Punto inflamación (°C)	80
Cte. Henry (atm*m ³ /mol)	4.6x10 ⁻⁴	Tem. autoignición (°C)	526
Estado	Cristales y Gas	Solubilidad en agua a 25°C (mg/L)	30
Temperatura crítica (°C)	511.25	Entalpía estándar de Formación a 298.15 k (J/mol)	Cristales: 78.5 Gas: 150.6
Entalpía vaporización en el punto de ebullición (kJ/mol)	43.2	Entalpía de combustión a 298.15 k (J/mol)	5156.3
Capacidad calorífica molar a 298.15 k (J/mol)	Cristales: 165.7 Gas: 131.9	Entalpía fusión en el punto de fusión (kJ/mol)	19.01
Volumen molar crítico (cm ³ /mol)	407	Entropía estándar a 298.15 k (J/mol)	Cristales: 16.74 Gas: 338.1

Usos:

- Combustible.
- Preparación de pesticidas, fungicidas, detergentes.
- Resinas sintéticas.
- Conservadores.
- Químicos textiles.

Por lo anteriormente expuesto, en este estudio se pretende estudiar la atenuación natural y biorremediación en un suelo arenoso contaminado con HAP, de manera diferente a lo reportado, pues no existe hasta el momento estudios de laboratorio, empleando cajones como contenedores de almacenamiento, específicamente en un suelo arenoso con variabilidad de condiciones consideradas como necesarias para la degradación de los 5 HAP que se encuentran con mayor frecuencia en un suelo contaminado (antraceno, benzo(a)pireno, criseno, fenantreno y naftaleno); como es

la adición de un coadyuvante (surfactante) y de diferentes contenidos de agua en el suelo; los cuales ayudan a la degradación de los HAP.

Para el estudio se toman en cuenta tanto la presencia de bacterias heterótrofas en el suelo, como la tasa de respiración que éstas presentan, determinando así, si les afecta o ayudan las características dadas a cada uno de los cajones del experimento.

CAPÍTULO V

Legislación Ambiental

en Materia de Hidrocarburos

La Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente (LGEEPA, 1996) es el instrumento fundamental que introdujo la modificación en el régimen de las autorizaciones de obras o actividades "que pueden causar desequilibrios ecológicos o rebasar los límites y condiciones establecidos en las disposiciones aplicables para proteger el ambiente y preservar y restaurar los ecosistemas, con la finalidad de evitar o de reducir al mínimo sus efectos negativos sobre el ambiente".

La protección de los elementos naturales del suelo queda alineada en el ámbito general de la LGEEPA (2000), por lo mismo, son aplicables sus instrumentos de control, la ordenación ecológica del territorio, la manifestación del impacto ambiental para obras y actividades antes mencionadas, la adopción de medidas de protección en áreas naturales. Con respecto a la normatividad en materia de suelos contaminados con hidrocarburos se cuenta con la norma emergente: NOM-EM-138-ECOL-2002, ahora proyecto de norma: PROY-NOM-138-SEMARNAT-2003

Esta norma tiene por objetivo establecer límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y restauración. El campo de aplicación de esta norma oficial mexicana se considera aplicable en todo el territorio nacional para quienes ocasionen contaminación con hidrocarburos en el suelo. Por el hecho de que las sustancias que están involucradas en los derrames de hidrocarburos, causan efectos adversos, ya que ponen en peligro los lugares donde se producen, la integridad de los ecosistemas, así como la preservación de los recursos naturales.

Actualmente, se cuenta con el PROY-NOM-138-SEMARNAT-2003; la cual presenta algunas diferencias con respecto a la norma emergente, previamente publicada. En ella se consideran límites máximos permisibles de los productos asociados a los derrames de hidrocarburos, los cuales ocasionan contaminación en suelos; se consideran diversos productos contaminantes, reduciendo el número de ellos en el anteproyecto de norma, los cuales son frecuentemente presentes en BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) y HTP (hidrocarburos totales del petróleo). Ahora se especifica que para cada tipo de fracción de HTP (pesada, media), la determinación de HAP, no siendo necesaria en la fracción ligera, diferente a la tabla pasada que se consideraba requisito para todas las fracciones de HTP como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 5.1 Hidrocarburos que deberán analizarse en función del producto contaminante

Producto contaminante	Hidrocarburos					
	Fracción pesada	HAP	Fracción media	HAP	Fracción ligera	BTEX
Mezclas desconocidas	X	X	X	X	X	X
Petróleo crudo	X	X	X	X	X	X
Combustóleo	X	X				

Producto contaminante	Hidrocarburos					
	Fracción pesada	HAP	Fracción media	HAP	Fracción ligera	BTEX
Emulsiones asfálticas	X	X				
Asfalto	X	X				
Parafinas	X	X				
Petrolatos	X	X				
Aceites	X	X				
Gasóleo			X	X		
Diesel			X	X		
Turbosina			X	X		
Keroseno			X	X		
Creosota			X	X		
Gasavión					X	X
Gasolvente					X	X
Gasolinas					X	X
Gasnafta					X	X

Los límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo, son mayores a los indicados en el proyecto de norma a diferencia de los límites que hasta la fecha se han seguido, 2000 mg/kg (NOM-EM-138-ECOL-2002), siendo considerablemente elevados para la fracción pesada de hidrocarburos, en uso agrícola, residencial e industrial, a los establecidos, encontrándose en el rango de 3,000 a 6,000 mg/kg (Tabla 5.2).

Tabla 5.2 Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en el suelo

Hidrocarburos específicos	Uso de suelo predominante ¹ (mg/kg base seca)			Método analítico
	Agrícola ²	Residencial ³	Industrial	
Ligera	200	200	500	Cromatografía de gases *Anexo A.1
Media	1,000	1,000	3,000	Cromatografía de gases *Anexo A.2

Hidrocarburos específicos	Uso de suelo predominante ¹ (mg/kg base seca)			Método analítico
	Agrícola ²	Residencial ³	Industrial	
Pesada	3,000	3,000	6,000	Espectroscopia infrarroja *Anexo A.3

1. Para usos de suelo mixto, deberá aplicarse la especificación al menor valor de los usos de suelo involucrados

2. Agrícola incluye suelo forestal, recreativo y de conservación

3. Residencial incluye comercial

* Procedimiento establecido en el proyecto de norma

En el caso de los límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos, al igual que las concentraciones permitidas en los HTP, han aumentado, a excepción del benceno en el rubro industrial, considerando únicamente 6 HAP (Tabla 6.3), los cuales presentan efectos colaterales por su toxicidad; como el benzo(a)pireno; sin embargo, se considera necesario contemplar los hidrocarburos aromáticos que se presentan frecuentemente en suelos contaminados, teniendo gran importancia su remoción debido a que éstos alcanzan concentraciones notoriamente elevadas, como en éste estudio (tal como el fenantreno, naftaleno, criseno y antraceno).

Tabla 5.3 Límites máximos permisibles para hidrocarburos específicos en suelo

Hidrocarburos específicos	Uso de suelo predominante ¹ (mg/kg base seca)			Método Analítico*
	Agrícola ²	Residencial ³	Industrial	
Benceno	6	6	15	Anexo A.4
Tolueno	40	40	100	Anexo A.4
Etilbenceno	10	10	25	Anexo A.4
Xilenos (suma de isómeros)	40	40	100	Anexo A.4
Benzo[a]pireno ⁴	2	2	10	Anexo A.5
Dibenzo[a,h]antraceno ⁴	2	2	10	Anexo A.5
Benzo[a]antraceno ⁴	2	2	10	Anexo A.5
Benzo[b]fluoranteno ⁴	2	2	10	Anexo A.5
Benzo[k]fluoranteno ⁴	8	8	80	Anexo A.5
Indeno (1,2,3-cd)pireno ⁴	2	2	10	Anexo A.5

- 1 Para usos de suelo mixto, deberá aplicarse la especificación al menor valor de los usos de suelo involucrados.
 - 2 Agrícola incluye suelo forestal, recreativo, y de conservación.
 - 3 Residencial incluye comercial.
 - 4 La determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos deberá realizarse únicamente en los casos que se pretende demostrar que se está cumpliendo con los límites máximos permisibles
- * Cromatografía de gases, procedimiento establecido en el proyecto de norma.

En México, con anterioridad a la expedición de la Norma Oficial Mexicana Emergente, fueron manejados por la PROFEPA (1999), criterios de limpieza desarrollados por el Grupo de Trabajo sobre Restauración de Suelos Contaminados conformado por ésta dependencia, tal como se muestra en la Tabla 5.4, tomando en cuenta que las concentraciones en la mayoría de los casos son menores a los que actualmente se pretenden establecer como Norma Oficial Mexicana, además de tomar en cuenta en aquella fecha, los hidrocarburos que comúnmente se presentan debido a la contaminación causada.

Tabla 5.4 Límites permisibles para HAP establecido por Canadá y los Países Bajos y criterios de limpieza desarrollados por la PROFEPA

Fuente	Parámetro	Uso de Suelo (mg/kg)		
		Agrícola	Recreativo/ Residencial	Industrial
PROFEPA	HTP	1000	1000	2000
	Benzo(a)pireno	0.08	0.08	0.75
	Benzo(a)antraceno	0.8	0.8	7.5
	Benzo(b)fluoranteno	0.8	0.8	7.5
	Benzo(k)fluoranteno	8.0	8.0	75
	Criseno	80	80	750
Canadá	Benzo(a)antraceno	0.1	1.0	10.0
	Benzo(a)pireno	0.1	1.0	10.0
	Benzo(a)fluoranteno	0.1	1.0	10.0
	Benzo(b)fluoranteno	0.1	1.0	10.0
	Dibenzo(a,h)antraceno	0.1	1.0	10.0
	Indeno(1,2,3 cd)pireno	0.1	1.0	10.0
	Naftaleno	0.1	5.0	50.0
	Fenantreno	0.1	5.0	50.0
	Pireno	0.1	10.0	100.0

Fuente	Parámetro	Uso de Suelo (mg/kg)		
		Agrícola	Recreativo/ Residencial	Industrial
Países Bajos	Naftaleno		5	
	Fenantreno		10	
	Antraceno		10	
	Fluoranteno		10	
	Criseno		5	
	Benzo(a)antraceno		5	
	Benzo(a)pireno		1	
	Benzo(k)fluoranteno		5	
	Indeno(1,2,3-c,d)pireno		5	
	Benzo(g,h,i)perileno		10	
	HPA total		20	

El proyecto de norma contempla con mayor detalle la caracterización del sitio que debe hacerse; sin embargo, es importante considerar, la importancia que tiene conocer las condiciones reales del sitio, especialmente, la geohidrología, estratigrafía y edafología; teniendo informado a la PROFEPA de dichas condiciones.

Para el muestreo, se establecen los puntos de muestreo considerados como necesarios dependiendo el área contaminada; sin embargo, en ninguno de los puntos, establece rangos promedio a la profundidad y distancia que debe existir en promedio entre ellos. Es por ello, que es importante incluir en la metodología que se lleve en el Plan de Muestreo (ya considerado en la norma), los puntos seleccionados, la profundidad a la que se hizo el muestreo, el volumen de muestra que se tomó, y la ubicación de cada punto. Es importante considerar, que la matriz del suelo es muy compleja y aunque se hagan duplicados en algunos casos los resultados del análisis no son muy parecidos; entonces, debería establecerse dependiendo el número de puntos muestreados, los duplicados que deberán hacerse por cierto número de muestras; no únicamente un duplicado por 10 muestras tomadas (como se indica en la norma).

Existen diferentes tipos de equipos de muestreo y la selección de éstos dependerán de las necesidades que se presenten en el muestreo (Tabla 5.5); en el caso de que se tenga amplio conocimiento del equipo que existe y las características del mismo, no sería necesario mencionarlo en la norma; sin embargo, cuando el caso no es éste, sería importante considerarlo en uno de los puntos como en la publicación previa al proyecto.

Tabla 5.5 Equipo para toma de muestras

Tipo de muestreador	Aplicación	Observación
Cuchara o cucharones	Se podrá aplicar este tipo de dispositivos para el muestreo de suelos hasta 0.3 metros de profundidad o cuando se deba realizar la toma de muestras en fondo de fosas o paredes de fosas	Este tipo de dispositivo de muestreo, solamente se deberá aplicar en muestreos someros o como elemento auxiliar en la colección de muestras extraídas con barrenas.
Barrenas (auger) de cualquier tipo	Únicamente se podrá utilizar este equipo cuando las condiciones particulares del sitio (por ejemplo, manto rocoso cercano a la superficie) impidan el uso de los nucleadores. Por ello, se debe realizar la descontaminación de la barrena antes de la toma de muestra y esta muestra no podrá ser utilizada para la determinación de compuestos orgánicos volátiles (http fracción gasolina y BTEX).	No existe restricción en cuanto al tipo de suelo y profundidad, solamente se restringe su uso en función del compuesto que se muestra.
Nucleadores	Uso general.	Los nucleadores podrán ser utilizados con tubos (liners) y tapas de teflón.
Nucleadores por empuje directo	Uso general.	Los nucleadores deberán ser utilizados con tubos (liners) y tapas de teflón.

Tipo de muestreador	Aplicación	Observación
Tubo Shelby	Podrán ser utilizados para el muestreo de cualquier tipo de contaminante, pero previo a su uso se deberán descontaminar.	El trasvase de la muestra de suelo al recipiente se deberá realizar con guantes de látex o equivalentes. Cuando se utilice para gasolina y compuestos orgánicos volátiles, la operación deberá realizarse inmediatamente.
Penetrómetros	Podrán ser utilizados para el muestreo de cualquier tipo de contaminante, pero previo a su uso se deberán descontaminar.	El transvasado de la muestra de suelo al recipiente se deberá realizar con guantes de látex o equivalentes. Cuando se utilice para gasolina y compuestos orgánicos volátiles, la operación deberá realizarse inmediatamente.

Será responsabilidad de la empresa restauradora seleccionar el equipo de trabajo, tanto maquinaria como equipo de protección personal contra riesgos de origen químico, biológico y físico que puedan presentarse durante el muestreo. Es importante tener en cuenta que, dependiendo del contaminante será el tipo de recipiente utilizado para la muestra, temperatura y tiempo de conservación. Logrando con todo lo anterior, llevar un control en el registro de la información del muestreo. En el caso de que tenga que restaurarse el sitio, en el proyecto de norma no se mencionan los requisitos que deberán cubrirse; únicamente se menciona que deberán alcanzarse los límites máximos permisibles establecidos en las tablas ya referidas; pero será necesario contemplar que deberá entregarse una propuesta de restauración del suelo, indicando la metodología que se seguirá y el tiempo aproximado en que se llevará a cabo dicha restauración.

CAPÍTULO VI

Metodología y Técnicas Analíticas

6.1 METODOLOGÍA

El suelo analizado, proviene de una refinería Mexicana. El suelo extraído para su estudio fue contaminado por muchos años, casi por 70 años; por lo que presenta elevadas concentraciones de hidrocarburos, diesel, gasolinas, coque, combustóleo, entre otros tipo de crudos que se procesan dentro de la misma refinería.

6.1.1 DIAGRAMA DEL EXPERIMENTO

Para conocer la viabilidad de aplicar la atenuación natural y la biorremediación como técnicas de saneamiento, se siguió de manera general el procedimiento que se muestra en la siguiente figura:

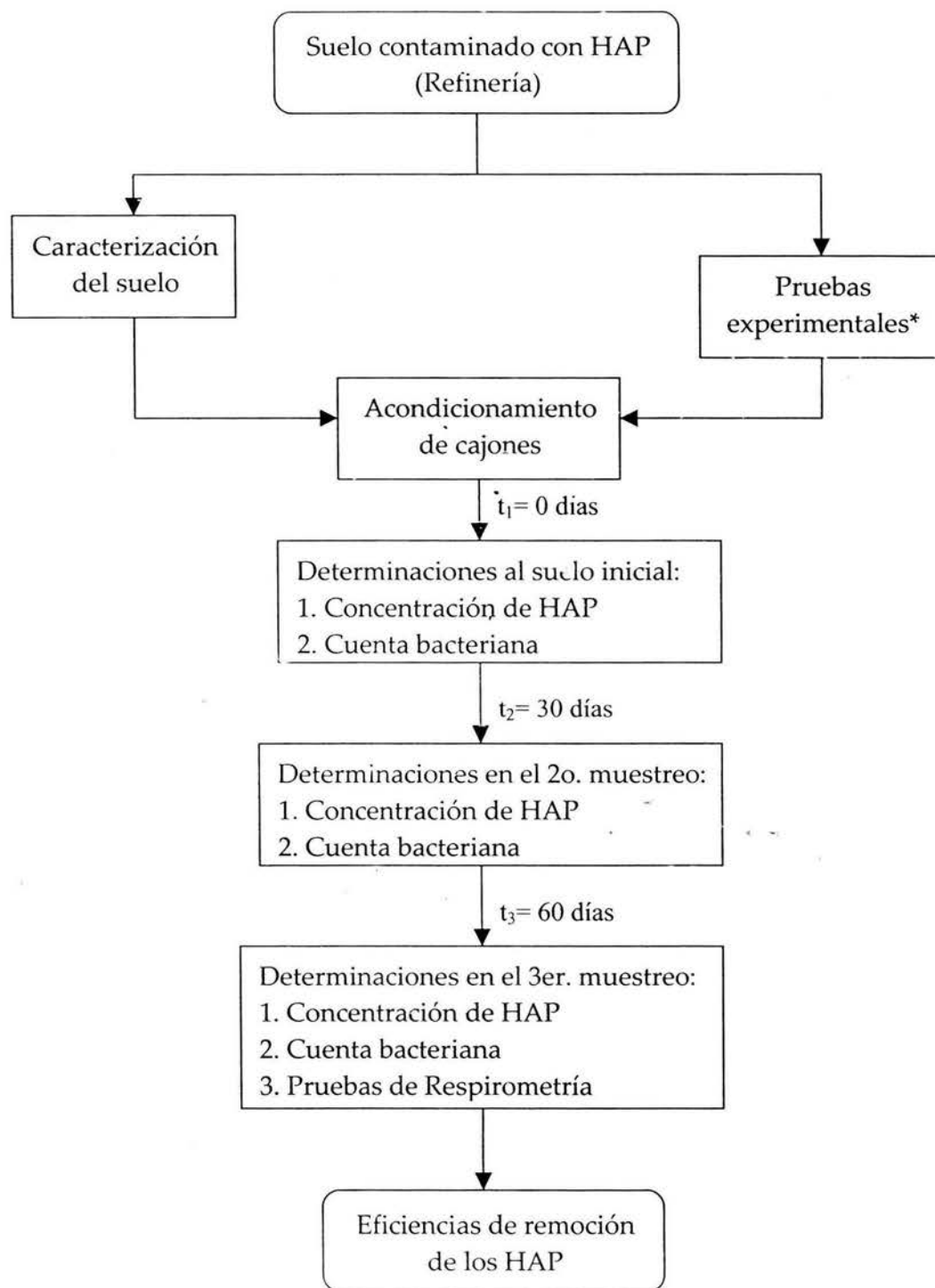


Figura 6.1 Procedimiento para determinar la evolución de la atenuación natural y biorremediación en el suelo contaminado.

* Realizadas previamente para la determinación de las condiciones en el suelo, rangos de porcentajes de contenido de agua.

6.1.2 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

Inicialmente se llevó a cabo la caracterización del suelo en estudio, proveniente de una zona contaminada de la refinera, conteniendo concentraciones elevadas de hidrocarburos.

La caracterización del suelo consistió en la determinación de las principales propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo contaminado. A continuación se describen las determinaciones realizadas.

A continuación se describen las técnicas analíticas realizadas:

Tabla 6.1 Técnicas analíticas empleadas en la caracterización del suelo

Prueba	Técnica Analítica
Densidad aparente	Método de la probeta
Densidad real	Método del picnómetro
Contenido de agua	Método de estufa
Granulometría	Método de cribado por mallas
Porosidad	Método por diferencia porcentual
Conductividad eléctrica	Método pasta saturada
Fósforo disponible	Método de Bray-I
Fracción de carbono orgánico	Método de Walkley-Black
Nitrógeno	Método Kjeldahl
Potencial hidrógeno, pH	Método de dilución
Conteo de bacterias aerobias en placa	Método de cuenta en placa

Densidad

En el suelo, como en cualquier otro cuerpo físico, la densidad se define como la masa por unidad de volumen.

El suelo como todo cuerpo poroso tiene dos densidades. La densidad real (densidad media de sus partículas sólidas) y la densidad aparente (teniendo en cuenta el volumen de poros)(Buckman, 1991).

Densidad aparente

La densidad aparente refleja el contenido total de porosidad en un suelo y es importante para el manejo de los suelos, ya que refleja la compactación y facilidad de circulación del agua y el aire. Refleja la masa de una unidad de volumen de suelo seco y no perturbado, para que incluya tanto a la fase sólida como a la gaseosa englobada en ella.

Su valor permite establecer equivalencias entre las relaciones masa/masa, que son la forma habitual de medir los parámetros del suelo (Buckman, 1991).

Método de la probeta (Domínguez, 1990; Orantes, 2002): La prueba fue realizada a una muestra seca de suelo. Este método consiste en tamizar el suelo ya seco, en una malla del No. 10, para después colocar el suelo obtenido en una probeta, la que es llenada hasta 10 ml, posteriormente, se golpea ligeramente 10 veces, sobre una superficie firme y nuevamente se le agrega suelo hasta alcanzar el volumen deseado. Se coloca la probeta con el suelo en la balanza analítica y se pesa para conocer el peso del suelo, restándole al peso obtenido, el peso de la probeta.

Entonces, la densidad aparente, se puede calcular con la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad aparente} = \frac{\text{peso del suelo}}{\text{volumen}} = x \text{ g / ml}$$

Densidad real ó específica

Se designa de esta forma a la densidad de la fase sólida. Es la proporción de masa de una unidad de volumen de un material a un estado de temperatura con la masa en aire del mismo volumen de agua destilada de gas libre a un estado de temperatura.

La densidad específica de un suelo es utilizada en casi todas las ecuaciones expresando la fase relacionada del aire, agua y sólidos en un volumen dado de material.

El término “partículas sólidas”, se entiende como partículas de minerales que no son muy solubles en agua. Así, la densidad específica de materiales conteniendo material extraño (como cemento, limo, etc.), materia soluble en agua (como cloruro de sodio) y suelos conteniendo materia con una densidad específica menor que uno, comúnmente requiere un tratamiento especial o una definición competente de densidad específica (Orantes, 2002).

Método del picnómetro (ASTM; D 854-83, 1995): Se adicionaron en el picnómetro (previamente calibrado) 5g de la muestra de suelo con agua destilada, posteriormente se dejó en el desecador durante 30 min, a vacío de 10 mmHg, después de ese tiempo se purgó y se midió la temperatura a la cual se encontraba la muestra. Se pesó el picnómetro después de haber llenado el picnómetro, seguido de haber pesado, se pasó la muestra a un vaso y éste se dejó evaporar en la parrilla a una temperatura de 50°C, aproximadamente, hasta obtener un volumen de 20 a 25 ml. Se pasó la muestra a la estufa durante 12 horas, a 90°-100°, se retiró de la estufa y se pasó al desecador durante 1 h. Finalmente, se pesa la muestra, obteniendo el valor por diferencia de volúmenes.

Siguiendo la fórmula:

$$\text{Densidad específica, a } T_x = \frac{W_o}{[W_o + (W_a - W_b)]}$$

Donde:

W_o = Peso de la muestra del suelo en el horno-seco (g)

W_a = Peso del picnómetro llenado con agua a una temperatura T_x ¹ (g)

W_b = Peso del picnómetro llenado con agua y suelo a una temperatura T_x (g)

T_x = Temperatura del contenido del picnómetro cuando el peso W_b fue determinado (°C)

Contenido de agua

Los nombres tradicionales aplicados a las clases de diferencias en contenido de agua del suelo incluyen la palabra “drenaje”, la cual implica la tasa de movimiento del agua a través del sistema. Los suelos según su tasa de movimiento de agua se pueden clasificar en (FitzPatrick, 1980):

- ↪ Excesivamente drenados (excesivamente aerobios)
- ↪ Bien drenados (aerobios)
- ↪ Imperfectamente drenados (débilmente anaerobios)
- ↪ Muy mal drenados (continuamente anaeróbicos)
- ↪ Suelos Inundados

Método de estufa: Determina el porcentaje de humedad y se basa en la pérdida de peso que sufre la muestra cuando se somete a las condiciones de tiempo y

¹ Nota: Este valor se tomó de la tabla de valores de W_a , preparado para la temperatura actual cuando el peso W_o fue tomado.

temperatura que se establecen en la norma, NMX AA-16-1984, considerando que dicha pérdida se origina por la eliminación de agua.

Campo:

Mediante el método de cuarteo, se obtiene una muestra representativa de 1kg, la cual se vierte dentro de un molino triturador para obtener un producto mas homogéneo y de un tamaño semejante a la arena gruesa.

Se utiliza una caja, la cual coloca abierta y su tapa en la estufa a 120°C durante 2 h, transcurrido ese tiempo, se tapa la caja dentro de la estufa, e inmediatamente se pasa al desecador durante dos horas como mínimo o hasta obtener un peso constante. Se vierte la muestra sin compactar hasta un 50% del volumen de la caja. Posteriormente, se pesa la caja cerrada con la muestra y se introduce destapada a la estufa a 60°C durante 2 h, se deja enfriar y se pesa nuevamente. Se repite esta operación las veces que sea necesario hasta obtener peso constante (se considera peso constante cuando entre dos pesadas consecutivas la diferencia es menor al 0.01%).

Laboratorio:

El contenido de agua en el suelo se determina de acuerdo a lo indicado en las normas, NMX-AA-052-1985, mediante la diferencia de pesos, después de haber sido sometida la muestra durante 24 h, en la estufa a una temperatura de 105°C.

Para calcular el porcentaje de contenido de agua:

$$H = \frac{G - G_1}{G} \times 100$$

Donde:

H = Contenido de agua (%)

G = Peso de la muestra húmeda (g)

G₁ = Peso de la muestra seca (g)

La diferencia máxima permisible entre determinaciones efectuadas por duplicado no debe ser mayor al 1% en caso contrario se recomienda repetir la determinación.

Análisis granulométrico

El objetivo de esta técnica es clasificar las partículas del suelo de acuerdo a su tamaño, lo cual consiste en términos generales en separar y clasificar por tamaño las partículas que lo forman. La obtención de los tamaños y distribución de las partículas de un suelo, es factible obtenerse por el método de cribado por mallas y el análisis de una suspensión del suelo con hidrómetro (densímetro). El primero es aplicable a suelos gruesos y consiste en hacer pasar el suelo por mallas de aberturas conocidas y el segundo método, es aplicable a la porción fina de un suelo y está basada en la Ley de Stokes, la cual rige la caída libre de una esfera en un líquido (K.H. Head, 1992).

Conocer la granulometría es esencial para cualquier estudio del suelo. Las clasificaciones aceptan los términos de grava, arena, limo y arcilla, pero difieren en los valores de los límites establecidos para definir cada clase. De todas estas escalas granulométricas, son la de Atterberg o Internacional (llamada así por haber sido aceptada por la Sociedad Internacional de la Ciencia del Suelo) y la americana del USDA (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos) las más ampliamente utilizadas.

Método de cribado por mallas (Juárez, Rico; 1977): Para realizar la técnica se requiere que la muestra de suelo esté seco, para con ello, se elimina el agua que contenga y así se facilita el proceso de disgregación.

Primero, se disgrega el suelo, posteriormente, se pesa la muestra inicial del suelo. La técnica se llevó a cabo en dos etapas, en la primera se colocaron mallas de los números de 1½", 1", ¾", ½", 3/8", ¼" y No. 4, para la fracción gruesa del suelo y en la segunda etapa se ocupan los tamices número 10, 20, 40, 60, 100 y 200, para la fracción del suelo fino. Colocándolas en forma descendente y con ayuda de un equipo vibratorio mecánico durante 15 minutos se obtendrá en cada una de las mallas, la cantidad de suelo retenido. Finalmente, se calcula el porcentaje en peso que paso en cada malla, para que con estos valores se trace la distribución granulométrica.

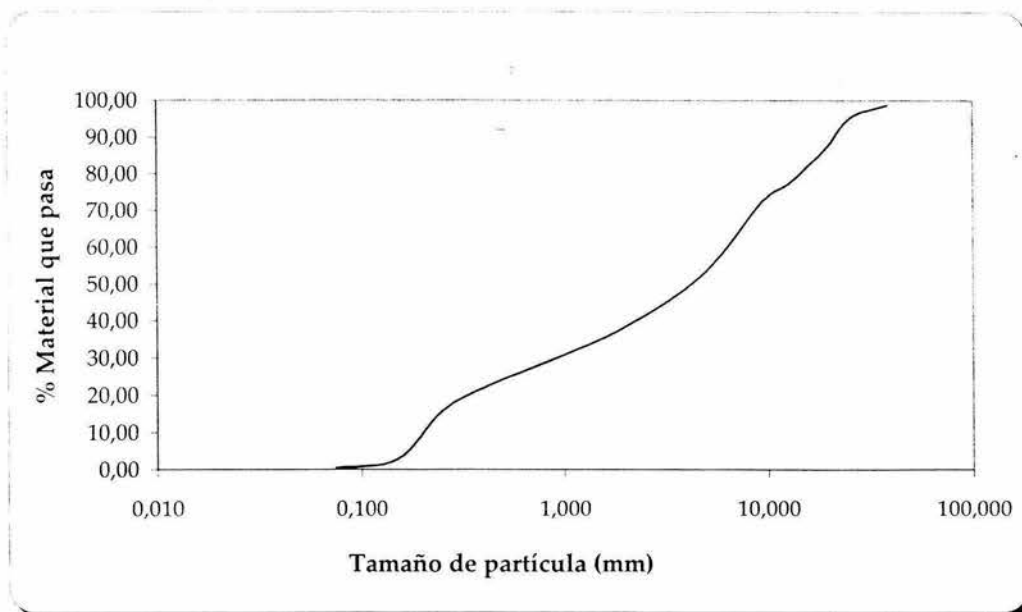


Figura 6.2 Curva de distribución de suelo contaminado con HAP

A partir de la curva de distribución se obtienen los coeficientes de uniformidad (C_u) y el de curvatura (C_c). Los cuales se determinan con las siguientes relaciones:

$$C_u = \frac{D_{60}}{D_{10}}$$

Donde:

D_{60} = tamaño tal que sea igual o menor que el 60% en peso del suelo.

D_{10} = llamado por Hazen diámetro efectivo; es el tamaño tal que sea igual o mayor que el 10%, en peso del suelo.

El C_u es un coeficiente de no uniformidad, pues su valor decrece cuando la uniformidad aumenta. Suelos con $C_u < 3$ se consideran muy uniformes.

$$C_c = \frac{(D_{30})^2}{D_{60}(D_{10})}$$

Donde:

D_{30} = tamaño tal que sea igual o menor que el 30% en peso del suelo.

Esta relación tiene un valor entre 1 y 3 en suelos bien graduados, con amplio margen de tamaños de partículas y cantidades apreciables de cada tamaño intermedio.

Porosidad

Representa el porcentaje total de huecos que hay entre el material sólido de un suelo. Es un parámetro importante porque de él depende el comportamiento del suelo frente a las fases líquida y gaseosa, y por tanto vital para la actividad biológica que pueda soportar (FitzPatrick, 1980).

Método por diferencia porcentual (Orantes, 2002): Se obtiene mediante la diferencia relativa porcentual entre la densidad real y la densidad aparente:

$$\eta = \frac{D_r - D_{ap}}{D_r}$$

Donde:

η = Porosidad

D_r = Densidad real (g/cm³)

D_{ap} = Densidad aparente (g/cm³)

Conductividad eléctrica (CE)

Es el parámetro más extendido y más ampliamente utilizado en la estimación de la salinidad, se basa en la velocidad con que la corriente eléctrica atraviesa una solución salina, la cual es proporcional a la concentración de sales en solución. Por tanto, la CE refleja la concentración de sales solubles en la disolución. Actualmente se expresa en dS/m (dS=decisiemens) (1 mmhos/cm = 1 dS/m).

La clasificación americana de suelos (Soil Taxonomy), adopta el valor de 2 dS/m como límite para el carácter salino a nivel de gran grupo y subgrupo, pues a partir de ese valor las propiedades morfológicas y fisicoquímicas del perfil (y por tanto la génesis) quedan fuertemente influenciadas por el carácter salino (Domínguez y Aguilera, 1990).

La conductividad eléctrica de un suelo cambia con el contenido en agua, disminuye en capacidad máxima (se diluye la solución) y aumenta en el punto de marchitamiento (se concentran las sales). Se ha adoptado que la medida de la CE se hace sobre el extracto de saturación a 25°C.

Método pasta saturada (página web, www.astm.org): La conductividad de un suelo (grado de salinidad) es la conductividad específica a 25° C de un extracto acuoso obtenido de un mezcla de suelo y agua de una relación definida, 2:1.

La CE, el United States Salinity Laboratory de Riverside establece los siguientes grados de salinidad:

Tabla 6.2 Clasificación de suelos con base en su conductividad eléctrica

Intervalo (dS/m)	Clasificación
0-2	Suelos normales
2-4	Suelos ligeramente salinos
4-8	Suelos salinos
8-16	Suelos fuertemente salinos
>16	Suelos extremadamente salinos

Determinación de fósforo disponible

El fósforo es el segundo elemento más importante en el suelo, después del nitrógeno, la falta de este elemento en el suelo puede impedir que otros sean absorbidos por las plantas (J. Calabrese and Kostecki, 1993).

La disponibilidad del fósforo está determinada por los siguientes factores:

- ↪ pH del suelo
- ↪ Fe, Al, y Mn solubles
- ↪ Presencia de minerales que contienen Fe, Al y Mn.
- ↪ Minerales de calcio y magnesio disponibles
- ↪ Cantidad y descomposición de materia orgánica
- ↪ Actividad de microorganismos

Existen diferentes métodos para determinar el fósforo en el suelo. El método de Bray-I ha sido ampliamente usado como un índice del fósforo disponible en los suelos. En general, este método ha dado muy buenos resultados en suelos ácidos y resultados aceptables en suelos de pH neutros o ligeramente alcalinos.

Método de Bray-I (Reyes, 1999): Permite determinar el fósforo disponible en suelos ácidos. El fósforo es extraído con una solución de fluoruro de amonio (NH_4F) ácida (HCl) y diluida, la cual tiene como finalidad remover las formas de fósforo fácilmente solubles en medio ácido, así como gran parte de los fosfatos de calcio una porción de los fosfatos de aluminio y de hierro. El fluoruro de amonio disuelve los fosfatos de aluminio y de hierro, debido a la formación de un ión complejo con estos iones metálicos cuando se encuentran en solución ácida.

Inicialmente se realizó la curva patrón, las soluciones patrón se hicieron con 1, 2, 3, 4 y 5 ppm. Se tomó lectura del porcentaje de transmitancia y absorbancia, en el espectrofotómetro a $660 \text{ m}\mu$, para que en ésta pudieran interpolarse las lecturas obtenidas del blanco, así como de las muestra preparadas previamente.

Para calcular la concentración de fósforo, se considera el factor de dilución:

$$\text{Concentración real del fósforo en la muestra de suelo} = \text{ppm de fósforo obtenidas de la gráfica} * 35 \text{ (factor de dilución)}$$

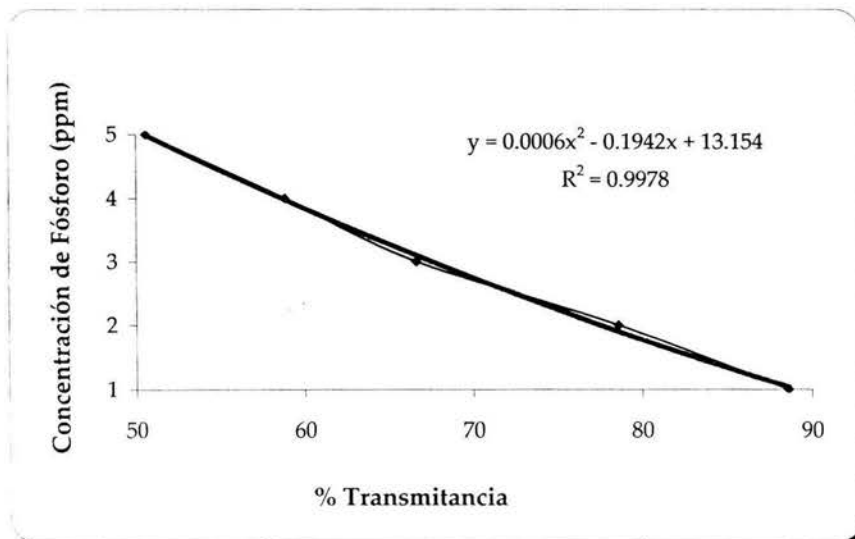


Figura 6.3 Curva patrón de concentración de fósforo

Considerando datos ya establecidos en la siguiente tabla, se determina la clase del suelo en función de la concentración de fósforo que éste tiene:

Tabla 6.3 Clase de suelo en función de su concentración de fósforo (Reyes, 1999)

Concentración de Fósforo (mg/kg)	Clase
< 15	Bajo
15 a 30	Medio
>30	Alto

Fración de carbono orgánico

Aún no se ha logrado llegar a una clasificación química detallada de la materia orgánica humificada que ocurre en forma separada en la superficie del suelo o bien mezclada con el material mineral. Por tanto, en los análisis de rutina que se hacen para clasificar los suelos, sólo se determinan las cantidades totales de carbono y de nitrógeno. Por lo general, los porcentajes de carbono se multiplican por el factor de conversión 1.72, para obtener una indicación de la cantidad total de materia orgánica presente (Orantes, 2002).

La relación carbono nitrógeno (C/N) se utiliza como una medida del grado de humificación y tiene un intervalo mayor de 10 a 8. La primera cifra elevada corresponde al material fresco y poco descompuesto que se encuentra en la hojarasca y la turba, mientras que la última se registra en muchos horizontes superiores que contienen una mezcla de material mineral y de materia orgánica bien humificada, mostrando que al hacerse la humificación hay una reducción del carbono respecto al nitrógeno. La razón C/N por lo general disminuye con la profundidad y unos cuantos horizontes intermedios, además de que tiende a aumentar con el incremento de la acidez del suelo (Buckman, 1991).

Metodo de Walkley-Black (NOM-021-RECNAT-2000): Este método se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio, K_2CrO_7 . La fracción de carbono orgánico se determinó mediante la titulación de la muestra con la solución de sulfato de amonio ferroso hexahidratado.

Mediante la siguiente fórmula se determina el valor de corrección para calcular la fracción de carbono orgánico:

$$A = (mL BC - mL M) \left(\frac{mL BF - mL BC}{mL BF} \right) + (mL BC - mL M)$$

Donde:

A = Valor de corrección

mL BC = mililitros empleados en el blanco caliente

mL M = mililitros empleados en la muestra

mL BF = mililitros empleados en el blanco frío

$$\% \text{ Carbono orgánico} = \frac{A \cdot [NFe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O] \times 0.003 \times 100}{g \text{ suelo seco}}$$

Entonces el **porcentaje de materia orgánica (%MO)** es:

$$\% MO = \% \text{ carbono orgánico} \times 1.72$$

Determinación de nitrógeno total

El objetivo de esta determinación es evaluar la dinámica biótica en el suelo por medio de la determinación del nitrógeno total; conformado por el orgánico e

inorgánico; sin embargo, la mayor cantidad de nitrógeno es parte integrante de materiales orgánicos complejos del suelo (Riser, 1992). El nitrógeno es necesario para la descomposición de la materia orgánica por los microorganismos heterótrofos del suelo y si el material orgánico que se descompone tiene poco nitrógeno en relación al carbono presente, los microorganismos utilizan el amonio o nitratos presentes en el suelo. Este nitrógeno permite el rápido crecimiento de los microorganismos que proporcionan material con carbono al suelo. El nitrógeno total en los suelos varía de 0.01% a varias unidades porcentuales.

Método Kjeldahl (Alef, 1995; Reyes, 1999): A través de éste método, el nitrógeno orgánico y de los nitratos se convierte en sulfato de amonio, el cual se destila en ácido bórico y se titula con ácido sulfúrico 0.1N, utilizando como indicador verde de bromocresol-rojo de metilo.

Para calcular la concentración de nitrógeno total (orgánico) se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% N_T = \frac{(T - B) \cdot N \cdot 1.4}{M}$$

Donde:

T = Volumen de H₂SO₄ empleado en titular la muestra

B = Volumen de H₂SO₄ empleado en titular el blanco

N = Normalidad del H₂SO₄

M = Peso de la muestra

1.4 = Factor equivalente del peso del nitrógeno

Para interpretar los contenidos de nitrógeno total (orgánico):

Tabla 6.4 Clase del suelo en función de su concentración de nitrógeno total

Clase	Nitrógeno total (%)
Pobre	< 0.032
Medianamente pobre	0.033 – 0.095
Mediano	0.096 – 0.158
Medianamente rico	0.159 – 0.221
Rico	> 0.222

Potencial hidrógeno, pH

El suelo también utiliza esta forma de medición para indicar el grado de alcalinidad o acidez del sustrato, en función del grado de concentración de iones de hidrógeno que presente (FitzPatrick, 1980). El pH del suelo es importante por que la variación de éste modifica el grado de solubilidad de los minerales, además de que también afecta al proceso de lixiviación de las sustancias nutritivas. Un suelo ácido tiene una capacidad menor de retención catiónica porque los iones hidrógeno desplazan a los cationes como el potasio y el magnesio. Dentro del intervalo normal, los dos factores principales que lo controlan son la materia orgánica y el tipo y cantidad de cationes. Las cantidades grandes de materia orgánica inducen acidez, excepto cuando está contrabalanceada por una concentración elevada de cationes básicos. El pH de la mayor parte de los suelos varía entre 4 y 8; sin embargo, algunos se salen de este rango.

Método de dilución (ASTM; D 4972-89, 1995): Se preparó la muestra con 10 g de suelo, en agua destilada (25 mL), se agitó durante 25 minutos a 170 rpm y se dejó reposar durante 15 minutos; posteriormente, se determinó el pH del suelo por medición potenciométrica.

Cuenta bacteriana

Cuando se requiere investigar el contenido de microorganismos viables es comúnmente utilizada la técnica de cuenta en placa (K. Nyer, 1993).

En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutrimentales, temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente.

Método de cuenta en placa (NOM-092-SSA1-1994): Se realizó la preparación y dilución de la muestra conforme a la Norma Oficial Mexicana. NOM-110-SSA1-1994., para el correspondiente análisis microbiológico.

El peso de las muestras consistió en pesar 1 g de la muestra por analizar en un recipiente, adicionando un volumen de 9 ml del diluyente (solución salina) llevado a una temperatura similar a la de la muestra; con un homogeneizador peristáltico se homogeneiza hasta obtener una suspensión.

Se deja que las partículas grandes sedimenten y se transfiere 1 ml de las capas superiores de la suspensión de la dilución primaria en otro recipiente conteniendo nueve veces el volumen del diluyente estéril a la temperatura apropiada y se mezcla cuidadosamente cada botella de diluyente. El criterio para seleccionar las diluciones a preparar de acuerdo con el número de microorganismos esperado para la técnica de cuenta en placa es considerar aquellas en las que se puedan contar de 25 a 250 colonias en un mínimo de una de tres diluciones en el método de cuenta de bacterias aerobias en placa.

Posteriormente, se le adiciona el medio de cultivo, Agar Triptona-Extracto de Levadura (agar para cuenta estándar) y se homogeneiza, después de inocular las diluciones de las muestras preparadas en las cajas Petri, las cuales se incuban a la temperatura que se requieran, según el microorganismo del que se trate, como se muestra la siguiente tabla:

Tabla 6.5 Condiciones de tiempo y temperatura para la técnica de cuenta en placa

Grupo bacteriano	Temperatura	Tiempo de incubación
Termofílicos aerobios	$55 \pm 2^{\circ}\text{C}$	48 ± 2 h
Mesofílicos aerobios	$35 \pm 2^{\circ}\text{C}$	48 ± 2 h
Psicrotróficos	$20 \pm 2^{\circ}\text{C}$	3 - 5 días
Psicrofílicos	$5 \pm 2^{\circ}\text{C}$	7 - 10 días

6.1.3 EXPERIMENTACIÓN EN CAJONES

El experimento consistió en la preparación de 12 cajones que sirvieron como contenedores de almacenamiento; a los cuales se les colocaron 7 kg de suelo contaminado a cada uno. Las variables consideradas fueron las siguientes: Contenido de agua (15% y 30%), adición de nutrientes y adición de un surfactante.

Para la adición de nutrientes se consideró la concentración de carbono que presentó el suelo al inicio de la experimentación, partiendo de la relación 100:10:1 (C: N: P), así como de la concentración de nitrógeno y fósforo determinada en el suelo previamente, adicionando de acuerdo a ello, 3343.4 y 700.8 mg/cajón, respectivamente. A dos cajones se les adicionó un surfactante que sirviera como coadyuvante para la degradación, siendo 0.48 mL/cajón de surfactante (John, *et al*,

1998). La selección del surfactante, se basó en resultados de estudios previos (Iturbe, *et al*, 2002) que demostraron importantes eficiencias de remoción, logrando hasta la mineralización de los mismos (White, *et al*, 1997). Para fines experimentales, se empleó un surfactante no-iónico (Nonil Fenol Etoxilado).

La clasificación y características que se le dio a cada uno de los cajones fue la siguiente:

Tabla 6.6 Características de los cajones experimentales

Número de Cajones	Clasificación	Características
2	S ₁	Suelo+15% Contenido de Agua
	S _{1'}	Suelo+15% Contenido de Agua (duplicado*)
2	S ₂	Suelo+15% Contenido de Agua+Nutrimentos
	S _{2'}	Suelo+15% Contenido de Agua+Nutrimentos (duplicado*)
2	S ₃	Suelo+15% Contenido de Agua+Nutrimentos+Surfactante
	S _{3'}	Suelo+15% Contenido de Agua+Nutrimentos+Surfactante (duplicado*)
2	S ₄	Suelo+30% Contenido de Agua
	S _{4'}	Suelo+30% Contenido de Agua (duplicado*)
2	S ₅	Suelo+30% Contenido de Agua+Nutrimentos
	S _{5'}	Suelo+30% Contenido de Agua+Nutrimentos (duplicado*)
2	S ₆	Suelo+30% Contenido de Agua+Nutrimentos+Surfactante
	S _{6'}	Suelo+30% Contenido de Agua+Nutrimentos+Surfactante (duplicado*)

* Cajones utilizados para fines de control biológico (determinaciones biológicas)

Las pruebas experimentales realizadas en el laboratorio se consideran necesarias para conocer la evolución de la biodegradación de los compuestos de interés; en este caso de la atenuación natural y biorremediación. Estas son la determinación del número de bacterias heterótrofas que se encuentran presentes en el suelo, la

concentración de los HAP y la generación de CO₂ mediante pruebas de respirometría.

6.1.4 PRUEBAS DE RESPIROMETRÍA

La respiración del suelo es un proceso que involucra el consumo de O₂ y/o liberación de CO₂ por seres que metabolizan y viven en el suelo. La respiración microbológica se define como el consumo de O₂ y liberación de CO₂ por bacterias, hongos, algas y células de protozoos en el suelo incluyendo el intercambio de gases que resultan de ambos metabolismos, aerobio y anaerobio. La biomasa (células metabólicamente activas) en el suelo es el agente responsable para la respiración del suelo (Brookes, 1985).

Una de las reacciones biológicas que tienen gran influencia en los cambios de O₂ y CO₂, es la descomposición de los residuos orgánicos incorporados por los microorganismos, resultado dicho proceso de la oxidación de los compuestos carbónicos, siendo absorbido el O₂ y desprendido el CO₂.

Las concentraciones de O₂ y CO₂ se calculan analíticamente como una función del tiempo en un sistema cerrado, en las cuales aproximadamente la disminución del hidrocarburo del 80% puede en algunos casos ser atribuido a la mineralización y el otro 20% asumido a la conversión de biomasa y metabolitos (Freijer, 1996).

Las pruebas de respirometría del suelo se utilizan como pruebas de biotratabilidad del suelo contaminado con hidrocarburos. Es un método eficiente empleado a nivel laboratorio para determinar cuantitativamente la actividad de los microorganismos degradadores y valora la eficacia del tratamiento biológico. Para fines de la tesis, se pretende medir la respiración del suelo con la estimación de la biomasa para estudiar las relaciones entre los parámetros y los tratamientos bajo la

evaluación en el experimento. Es por ello que se aplicó el método que es comúnmente utilizado en laboratorio para conseguir la estimación de la liberación de CO₂ de las muestras de suelo.

Método con botellas o jarras cerradas (Gauger, 1999). El método consiste en la estimación de CO₂ desarrollada durante la incubación del suelo en un sistema cerrado, el CO₂ retenido en una solución de NaOH, la cual es después titulado con HCl.

La tasa de respiración se calcula como:

$$CO_2(mg)/t = \frac{(B - V)N \cdot E}{m}$$

Donde:

B = Volumen (ml) de ácido para titular el álcali del blanco

V = Volumen (ml) de ácido para titular el álcali colector de CO₂ del tratamiento al punto final

N = Normalidad del ácido

E = Peso equivalente

m = masa de suelo

6.1.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El diseño de experimentos juega un papel importante en la solución eventual del problema que lo motivó, ya que un experimento es sólo una prueba o una serie de pruebas y la validez de las conclusiones que se obtienen de un experimento depende en gran medida de la manera en que éste se efectúe.

Muchos experimentos se llevan a cabo para estudiar los efectos producidos por dos o más factores y para este tipo de experimentos el diseño factorial es muy poderosa (Montgomery, 1991).

En el análisis estadístico en un diseño experimental factorial, los ensayos del experimento (o corridas) se ejecutan con todas las combinaciones de los niveles de los factores, es decir, se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada ensayo completo o réplica del experimento (Montgomery, *et al.* 1996)

Una ventaja importante de los factoriales es que éste tipo de diseños pueden ilustrarse fácilmente; donde el factor *A* tiene *a* niveles, mientras que el factor *B* tiene *b* niveles, el experimento tiene *n* réplicas y cada una contiene *ab* combinaciones de tratamientos; indicando la relación existente entre cada factor, como se muestra en la siguiente tabla. El arreglo para los factores contemplados es el siguiente:

Tabla 6.7 Tratamientos y factores empleados en el diseño factorial

Factores		Tratamientos		
		Suelo (S)	Nutrientes (N)	Nutrientes + Surfactantes (N+Surf)
Contenido de Agua	15%	S+15%	S+15%+N	S+15%+N+Surf
	30%	S+30%	S+30%+N	S+30%+N+Surf

Como puede observarse, los experimentos factoriales son utilizados para descubrir las interacciones entre las variables, pues tanto los niveles como los factores son seleccionados de manera específica por el experimentador.

El análisis de varianza puede emplearse para probar hipótesis sobre los efectos principales de los factores A y B y la interacción AB . Dentro del análisis de varianza mediante la variabilidad total presente en los datos se mide con la suma total de cuadrados de las observaciones.

CAPÍTULO VII

Resultados y Discusión

7.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

La caracterización del suelo, se realizó previamente a la experimentación en cajones mediante técnicas experimentales ya probadas, determinando con ello, sus características fisicoquímicas.

Tabla 7.1 Resultados de la caracterización del suelo

Prueba		Suelo contaminado con HAP
Conductividad eléctrica (dS/m)		1.608
Densidad aparente (g/mL)	Suelo seco	1.4212
	Suelo húmedo	1.1752
Densidad real (g/mL)	Suelo seco	2.6466
	Suelo húmedo	2.7885
Fracción de carbono orgánico f_{oc} (%)	Suelo seco	1.3938
Potencial hidrógeno, pH		6.37
Porosidad		0.4624
Materia orgánica (%)		2.3973
Fósforo disponible (ppm, mg/kg)		7.0312
Granulometría	C_c	31.75
	C_u	0.6375

De acuerdo con los datos obtenidos y los intervalos establecidos en la bibliografía, la clasificación del suelo de acuerdo a sus propiedades es la siguiente:

Tabla 7.2 Observaciones a partir de la caracterización del suelo

Prueba	Clasificación del suelo contaminado con HAP
Conductividad eléctrica	Normal en salinidad
Cuenta de bacterias aerobias en placa	Presencia de bacterias heterótrofas
Fracción de carbono orgánico	Normal
Potencial hidrógeno	Ligeramente ácido
Porosidad	Permeable
Porcentaje de materia orgánica	Alta
Nitrógeno total	Medianamente pobre
Fósforo disponible	Bajo
Granulometría	Suelo mal graduado (arenas con poca o nada de finos)

Con base en los resultados obtenidos de la caracterización del suelo puede decirse que es un suelo normal en salinidad, es decir, que las propiedades morfológicas y fisiológicas del perfil no están influenciadas por el carácter salino. La determinación de la conductividad eléctrica de un suelo es un parámetro importante ya que tiende a cambiar el contenido de agua, parámetro que en este caso se considera relevante en la degradación de los hidrocarburos.

De acuerdo con la prueba realizada, hay presencia de bacterias heterótrofas en el suelo, encontrándose dentro del intervalo establecido para suelos contaminados con hidrocarburos (10^6 - 10^8 UFC/g).

La fracción de carbono orgánico en el suelo indica el alto porcentaje de materia orgánica que tiene, normal para este tipo de suelos, debido a los hidrocarburos presentes; es un suelo ligeramente ácido. En la prueba de análisis granulométrico de acuerdo con el sistema unificado de clasificación de suelos (SUCS) por su

coeficiente de curvatura y de uniformidad se obtiene que es un suelo arenoso mal graduado, con muy poca cantidad de finos.

Por ser un suelo arenoso, presenta mayor permeabilidad, teniendo con esto una gran ventaja para que permita el paso de agua, oxígeno y nutrientes necesarios, favoreciendo así las condiciones necesarias para que los microorganismos lleven a cabo la degradación de los hidrocarburos en estudio.

De acuerdo con la concentración de nutrientes, es un suelo con concentración baja en fósforo y medianamente pobre en nitrógeno total.

7.2 CONCENTRACIÓN DE HAP

Se llevaron a cabo un muestreo inicial y dos muestreos durante el experimento, el periodo entre cada muestreo fue de 30 días. Se obtuvieron muestras compuestas para determinar las concentraciones de los hidrocarburos aromáticos policíclicos de interés (antraceno, benzo(a)pireno, criseno, fenantreno y naftaleno) por el método de cromatografía de gases para HAP, registrado con el número 8310 (1986) de la EPA (Environmental Protection Agency).

Tabla 7.3 Concentraciones iniciales de los HAP

Contenido de agua	Cajón	Concentración de HAP (mg/kg)				
		Antraceno	Benzo(a)pireno	Criseno	Fenantreno	Naftaleno
15%	S ₁	3.5944	0.0724	0.1410	ND	4.3655
	S ₂	2.4132	0.0523	0.1180	ND	ND
	S ₃	6.5072	0.1090	ND	5.6842	ND
30%	S ₄	4.0465	0.0527	0.1287	0.0321	0.2632
	S ₅	1.7812	0.0419	0.1009	0.0492	0.2046
	S ₆	3.5183	0.1098	0.2584	0.0615	0.4787

ND= No Detectado

Tabla 7.4 Concentraciones de los HAP. Muestreo a los 30 días

Contenido de agua	Cajón	Concentración de HAP (mg/kg)				
		Antraceno	Benzo(a)pireno	Criseno	Fenantreno	Naftaleno
15%	S ₁	0.6824	0.0307	0.0576	ND	ND
	S ₂	0.3369	0.0088	0.0154	ND	ND
	S ₃	0.9593	0.0173	0.0314	1.1197	ND
30%	S ₄	0.5246	0.0211	0.0650	0.0100	0.0513
	S ₅	1.2628	0.0351	0.1134	0.0216	0.2007
	S ₆	1.2390	0.0470	0.1539	0.0473	0.0680

ND= No Detectado

Tabla 7.5 Concentraciones finales de los HAP. Muestreo a los 60 días

Contenido de agua	Cajón	Concentración de HAP (mg/kg)				
		Antraceno	Benzo(a)pireno	Criseno	Fenantreno	Naftaleno
15%	S ₁	0.3250	0.0145	ND	ND	ND
	S ₂	0.1736	0.0205	0.0215	ND	ND
	S ₃	0.7350	0.0279	0.0524	1.0356	ND
30%	S ₄	0.2467	0.0079	0.0155	0.0026	0.0049
	S ₅	0.1106	0.0050	0.0121	0.0030	0.0058
	S ₆	0.0450	0.0022	0.0135	0.0027	0.0058

ND= No Detectado

En el primer muestreo se obtuvieron las concentraciones consideradas como iniciales para cada compuesto. Con respecto al segundo muestreo, las concentraciones disminuyeron considerablemente y en el tercero, se observó una disminución pero de menor proporción con respecto al segundo muestreo. Lo anterior implica que la mayor degradación se realiza en los primeros 30 días para los 5 HAP estudiados.

Esto indica que durante el primer periodo de los muestreos, se favoreció la biodegradación; lo cual quiere decir, que de acuerdo al control de los factores ambientales contemplados, entre los que destacan la constante aireación, control del contenido de agua, acondicionamiento en los cajones con el suelo contaminado, la adición de nutrimentos y adición de un surfactante, sirvieron

como bioestimuladores para que los microorganismos presentaran una mejor actividad.

7.3 EFICIENCIAS DE REMOCIÓN DE LOS HAP

Las eficiencias de remoción obtenidas en cada uno de los cajones, con cada uno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos de interés, fue mediante el siguiente cálculo de eficiencia:

$$\eta = \frac{(C_1 - C_2)}{C_1} * 100$$

Donde:

η = Eficiencia de remoción (%)

C_1 = Concentración inicial (mg/kg)

C_2 = Segunda concentración (mg/kg)

Como puede observarse en la Tabla 7.6, las eficiencias totales de remoción en cada cajón resultaron satisfactorias, es decir, que la concentración de los HAP disminuyó en más de un 80%, con respecto a la que se tenía en el suelo inicialmente. Y de acuerdo con las concentraciones obtenidas puede notarse que, aproximadamente el 90% de los casos presentó disminución en la concentración de los hidrocarburos considerados, obteniendo en la mayoría altas eficiencias de remoción.

De acuerdo con el proyecto de norma PROY-NOM-138-SEMARNAT-2003, el límite máximo permisible del benzo(a)pireno de 10 mg/kg en uso de suelo industrial, como en este caso. Se obtuvieron experimentalmente eficiencias del 60% como mínima hasta el 99% de acuerdo a las características dadas en los cajones, indicando que las concentraciones obtenidas al final del experimento

fueron del orden de 0.0022-0.06 mg/kg la cual es muy inferior a la concentración establecida como límite máximo permisible para dicho hidrocarburo aromático.

Aunque el benzo(a)pireno es el único HAP contemplado en la norma mencionada, de los considerados en este estudio, los demás hidrocarburos aromáticos presentan concentraciones muy similares o menores, las cuales van de 0.04-0.3 mg/kg para el antraceno, 0.01-0.09 mg/kg para el criseno, 0.002-1 mg/kg para el fenantreno y 0.004-0.1 mg/kg para el naftaleno en las concentraciones finales del experimento.

Tabla 7.6 Eficiencias totales de remoción en cada cajón

Contenido de agua	Cajón	Eficiencia total, η_T				
		Antraceno	Benzo(a)pireno	Criseno	Fenantreno	Naftaleno
15%	S ₁	90.96	79.97	99.9999	-	99.99
	S ₂	92.81	60.80	81.9175	-	-
	S ₃	88.70	74.40	0	81.78	-
30%	S ₄	93.90	85.01	87.9564	91.90	98.14
	S ₅	93.79	88.07	88.0079	93.90	97.17
	S ₆	98.72	97.99	94.7755	95.61	98.79

Las curvas de eficiencia para cada cajón, muestran la degradación de los HAP (Figura 7.1), donde se presentan las eficiencias de remoción con respecto a los hidrocarburos estudiados; antraceno, benzo(a)pireno, criseno, fenantreno y naftaleno. En esta Figura se aprecia la baja eficiencia en el caso del criseno, en el cajón S₃, debido a la disminución de bacterias presentes en dicho cajón ocasionando esto una menor actividad microbiana; y la no detección en los cajones con el 15% de contenido de agua, para el fenantreno y naftaleno, desde el inicio del muestreo; lo cual pudo deberse a las diferentes características en el suelo en los puntos de muestreo.

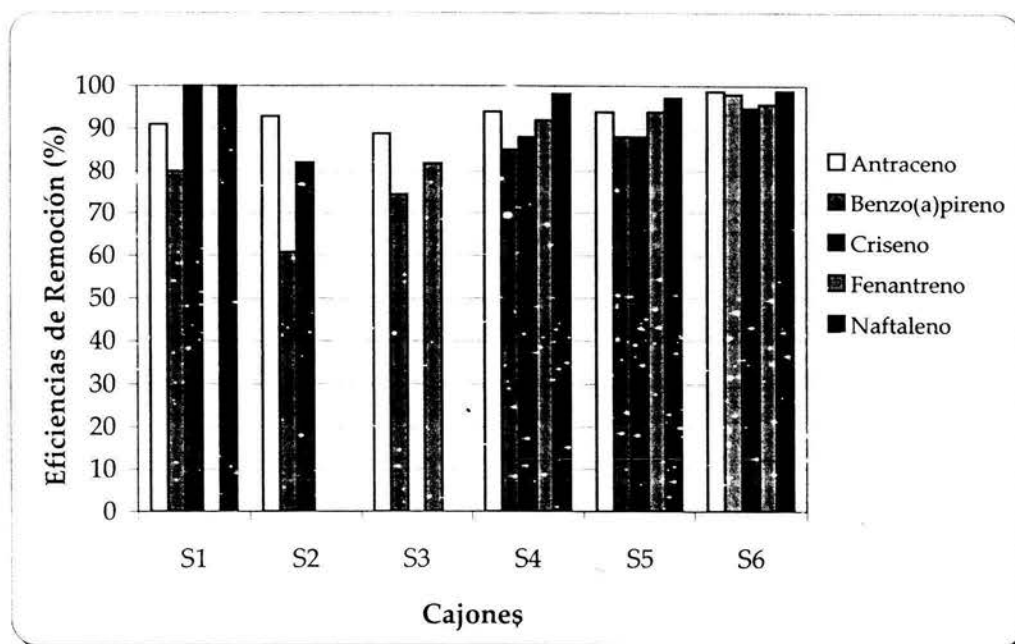


Figura 7.1 Eficiencia de remoción de los HAP estudiados

Analizando los resultados obtenidos en cuanto al compuesto se refiere, el HAP que presentó mayor eficiencia de remoción fue el naftaleno con un 99% de remoción, seguida por el antraceno, criseno y fenantreno, los cuales presentan eficiencias elevadas, muy similares a las que se tienen con el antraceno, siendo mayores al 90%, específicamente. El HAP que presenta menor susceptibilidad a ser biodegradado es el benzo(a)pireno; sin embargo, se obtuvo una eficiencia de remoción mayor al 80%.

De manera general, de acuerdo a las características del suelo en cada uno de los cajones y la de los HAP estudiados (mencionadas en el Capítulo IV), los principales factores como son el peso molecular, el número de anillos, la solubilidad, la densidad y los coeficientes de partición octanol-agua (K_{ow}) y el de adsorción (K_{oc}), entre otros, los que intervienen en las eficiencias de remoción, por medio de la atenuación y biorremediación en el suelo (Tabla 7.7).

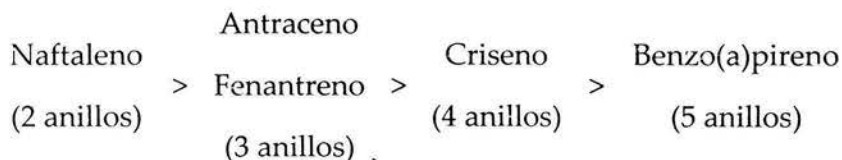
Tabla 7.7 Valores de R de los parámetros que influyen en la atenuación natural y biorremediación del suelo

Contenido de agua	Cajón	Características de los HAP					
		PM	#Anillos	Solubilidad	Densidad	Log K _{ow}	K _{oc}
15%	S ₁	-0.6004	0.3486	0.5092	-0.8945	-0.5257	-0.8780
	S ₂	0.5926	-0.9834	0.7921	-1.0000	-0.8538	-0.9526
	S ₃	-0.8752	-0.8752	0.0403	-0.8945	-0.8939	-0.8857
30%	S ₄	-0.9899	-0.983	0.7508	-0.8945	-0.9861	-0.8015
	S ₅	-0.9794	-0.9483	0.7206	-0.9123	-0.9903	-0.5887
	S ₆	-0.3879	-0.2793	0.4635	-0.5023	-0.4623	0.4033

Se obtiene que, los compuestos con un alto peso molecular pueden absorber a las partículas del suelo, en este caso los HAP, haciéndolos difíciles de remover, como es el caso del benzo(a)pireno y criseno, los cuales tienen pesos moleculares mayores, a diferencia de los demás hidrocarburos estudiados. Con dicho peso se relaciona el número de anillos. De acuerdo con la tendencia lineal (R) que siguen en cuanto a su comportamiento de remoción, los cajones con contenidos de agua de 30%, son mejores, con valores de 0.9.

La degradación de los HAP también depende de su solubilidad; esto es debido a la parte hidrofílica que presentan, teniendo que a mayor solubilidad, mayor será la remoción que se tenga, puesto que aumenta su biodisponibilidad hacia los microorganismos; y que una baja solubilidad contribuirá a que no se obtenga mineralización del compuesto, si es que se llegara a presentar. Este parámetro influye más en los cajones de mayor contenido de agua con adición de nutrientes y a los que además se les adicionó surfactante, con valores de R mayores a los de 15%, iguales a 0.7. La solubilidad se considera un parámetro importante ya que como parte del experimento se consideró que el contenido de agua es un factor relevante para la degradación.

Además de que de igual manera, la solubilidad (mg/L) que tiene cada compuesto corresponde de alguna forma al orden seguido por el número de anillos que tiene cada uno. De acuerdo con lo mencionado es que tanto por el número de anillos como por su solubilidad el HAP que en teoría debe ser degradado con mayor facilidad es aquel que presente mayor solubilidad y menor número de anillos, tal y como se indica a continuación:



El naftaleno que tiene menor número de anillos es más fácilmente biodegradado que el benzo(a)pireno; ya que como se explicó con anterioridad, mientras más grande sea la estructura, más difícil es para los microorganismos degradarlos.

Es importante tomar en cuenta la sinergia que se presenta en el suelo, puesto que en algunos de los casos se obtiene una mejor remoción de los hidrocarburos estando en conjunto con otros, tal y como es el caso del fenantreno, el cual tiene mejor comportamiento en cuanto a su remoción aún y estando presente en el mismo medio el naftaleno, importando de igual manera el acondicionamiento que se le dé al suelo. Como puede observarse en la tabla anterior, en cada uno de los cajones en que no se presentaba el fenantreno ni el naftaleno, con adición de nutrimentos, se tuvo una mejor eficiencia de remoción que cuando únicamente se encontró el fenantreno ($R=0.98$ y 0.87 respectivamente), ambos con 15% de contenido de agua y adición de nutrimentos.

En los cajones con el 30% de contenido de agua se obtuvieron mejores resultados, con R del 0.98 y 0.94 con suelo solo y con adición de nutrimentos, respectivamente, para este caso, lo que influyó en su tendencia de remoción en cuanto al número de

anillos de los HAP, fue que con la adición de nutrientes y surfactante, su R es mínima en comparación de los demás casos.

De acuerdo con las correlaciones de la tabla 7.7, la densidad de los HAP es un factor importante en la remoción de estos del suelo, favoreciendo así su biodegradación. Es importante tomar en cuenta que la bioacumulación o bioconcentración dependerá de la adsorción del hidrocarburo, ya que debido a ello, es más fácil de acumularse en el organismo, pues la adsorción del contaminante es generalmente constante en un amplio intervalo de suelos y sedimentos aunque de alguna manera en caso de encontrarse el contaminante en solución diluida, ésta estará en función de la solubilidad del soluto, como en este caso el contenido de agua mantenido en el suelo, ayudó a la remoción de los HAP.

El coeficiente de adsorción tiene relación con la solubilidad y el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}), el cual es otro parámetro importante para evaluar el potencial de la atenuación natural y biorremediación para la descontaminación del suelo, que a su vez se relaciona con el inverso de la solubilidad de un compuesto en agua, obteniendo buen resultado en la mayoría de los cajones, con R mayores de 0.8. Esto es lo que nos mide la concentración del equilibrio de un compuesto entre el octanol y el agua.

Con base en todo lo anterior es que se confirmó al final de la experimentación que mantener constante el contenido de agua es de gran importancia sí el objetivo es remover HAP, observando que mientras más alto sea el porcentaje de contenido de agua, mayor es la degradación, tal y como lo mencionan estudios realizados con anterioridad (Dragun, 2001). Donde se menciona que entre a mayor porcentaje de su capacidad de campo, es decir, a 33 y 44% de contenido de agua, incubando las muestras de suelo a una temperatura de 22°C, la degradación de los HAP es satisfactoria en un suelo limoso, enfocándose principalmente al

fenantreno y naftaleno obteniendo degradación de estos en periodos de aproximadamente 16-35 días y 2-4 días, respectivamente; removiendo aproximadamente el 80% y logrando la mineralización del 10% a los 66 días de incubación a mayores contenidos de agua. Lo anterior es posible debido a que la difusión de nutrientes y al movimiento microbiano, el cual llega a ser menos importante comparado con la aireación que se tenga para una mejor actividad microbiana con un alto contenido de agua en el suelo, pues dicho parámetro juega un papel importante en la población microbiana, la cual se incrementa conforme al contenido de agua que se tenga en el medio.

En resumen a mayor contenido de agua mayores eficiencias de remoción. Para el caso de los cajones con contenido de agua del 15%; S₁, S₂ y S₃ se obtuvieron menores remociones de HAP (90.31, 78.50 y 81.62%, respectivamente), lo cual no sucedió con los del 30%.

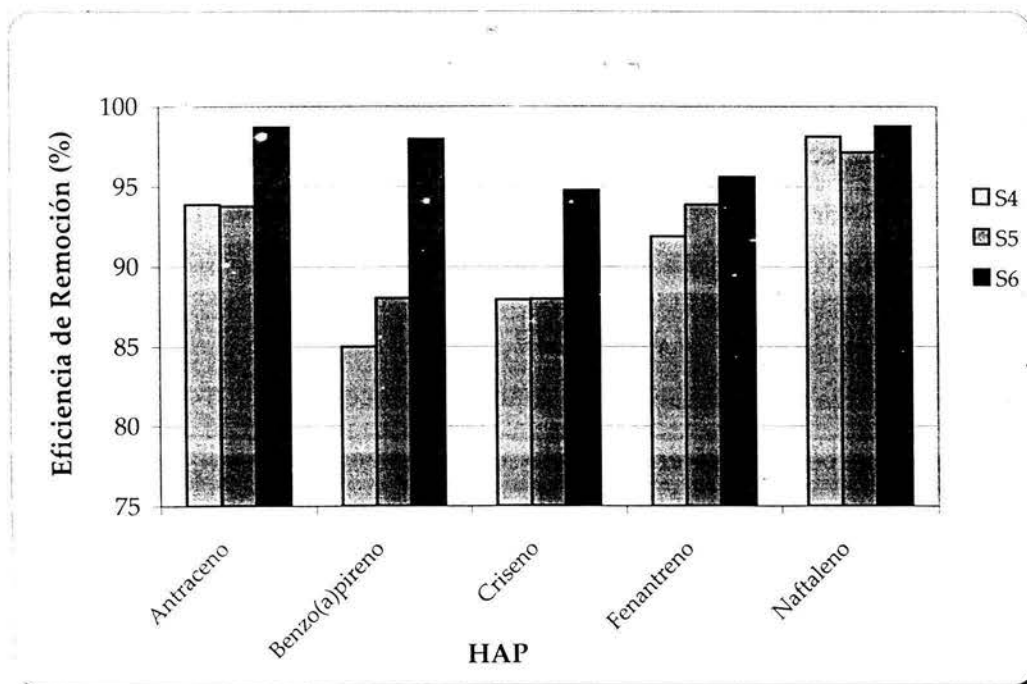


Figura 7.2 Eficiencias de remoción de los cajones con contenido de agua de 30%

Como pudo observarse, con base en la bibliografía y lo demostrado experimentalmente, el contenido de agua es un factor fundamental para la degradación de los hidrocarburos. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que dicho factor puede afectar la actividad microbiana y la biorremediación de los hidrocarburos del petróleo por influencia de la aireación, la difusión del contaminante y la movilidad de los microorganismos, factores importantes para la remoción (tal y como lo cita Dragun, 2001). Cuando los poros del suelo están saturados por el agua o por el aire, el contenido de los dos componentes es importante; pues en el caso de que no se mantenga un equilibrio entre el agua y el aire, la población microbiana se ve afectada y por consiguiente, no se logra la remoción de los contaminantes. El naftaleno fue el único caso en que no se logró observar diferencia entre eficiencias de remoción de los cajones con el 15% (S₁, S₂ y S₃) y los del 30% (S₄, S₅ y S₆), esto es debido a que desde el inicio y durante los tres meses de estudio no se detectó (ND) concentración en dichos cajones; sin embargo, para los cajones con el 30%, su eficiencia fue la mejor, siendo muy cercana a la remoción total; muy similar a la de los demás compuestos. De igual forma sucede con el fenantreno puesto que únicamente un cajón de los que tuvieron el 15% (S₃) es en el que se detectó concentración al inicio, obteniendo aún así una eficiencia de remoción satisfactoria.

El compuesto que resultó más afectado en cuanto a la remoción debido al número de anillos, como ya se mencionó y en cuanto al porcentaje de contenido de agua del 15%, fue el benzo(a)pireno puesto que presentó una diferencia entre el porcentaje de remoción de acuerdo a la variabilidad de contenidos de agua, del 19% de diferencia entre cajones.

Teniendo como consecuencia, de acuerdo a su solubilidad, número de anillos y contenido de agua, que el comportamiento de eficiencia de remoción sigue el que se mencionó inicialmente, es decir, que sigue presentando mejores resultados el

naftaleno, después el antraceno, fenantreno, criseno y benzo(a)pireno, con 30% de contenido de agua, esto es por que el alto contenido de agua debió haber aumentado la difusión de los nutrimentos y el movimiento microbiano, acelerando así la actividad microbiana y la degradación.

El control de los factores ambientales o suministrados al suelo son la causa principal para la degradación de los HAP. En cuanto al acondicionamiento que se le dio a los cajones se tuvieron dos cajones con atenuación (S_1 y S_4), dos cajones con adición de nutrimentos (S_2 y S_5) y dos cajones con adición de nutrimentos y surfactante (S_3 y S_6), controlando a cada uno el contenido de agua del 15 y 30%, respectivamente. Por lo cual era de esperarse que mientras mejor fuera el acondicionamiento en cada cajón, mejor serían los porcentajes de remoción de los compuestos; sin embargo, no se presenta de igual forma para todos los hidrocarburos, debido a la complejidad que existe en el suelo.

Contemplando únicamente el acondicionamiento en cuanto a las tres distintas características proporcionadas (suelo, suelo con adición de nutrimentos o suelo con adición de nutrimentos con surfactante) se tiene que para el caso del antraceno, se obtuvo una mejor remoción si se estimula a los microorganismos con adición de nutrimentos y surfactantes. La diferencia existente entre el mejor (suelo con adición de nutrimentos y surfactantes) y el de menor remoción (suelo solo) fue mínima.

Para el caso del benzo(a)pireno, criseno y naftaleno, se tiene que cuando se le adiciona al suelo sólo nutrimentos, los microorganismos no presentaron una mejor bioactividad, siendo mejor la que tienen sin adición de éste y ligeramente mejor con adición de nutrimentos y surfactante. A diferencia de los demás compuestos, el fenantreno presenta mejor porcentaje de remoción con adición de nutrimentos y menor en los cajones con nutrimentos y surfactante. Se tiene entonces que el suelo

(S₆) al que se le adicionó agua al 30%, nutrientes y un surfactante, con aireación diaria, fue el que se vio favorecido logrando gran disminución en todos los HAP, seguida del cajón (S₅) con las mismas características a excepción del surfactante; y finalmente, al cajón que únicamente se le mantuvo el 30% en contenido de agua fue en el que removió alta concentración, pero menor a los dos anteriores.

Los otros tres cajones con semejantes características que los anteriores, con contenido de agua del 15%, en todos los casos se comportan de manera distinta, y aunque sus eficiencias de remoción son buenas son menores a los cajones con mayor contenido de agua.

7.4 CUENTA BACTERIANA

El periodo entre cada muestreo para la determinación de UFC/g de suelo, fue de aproximadamente 30 días; esto fue así para tener una relación entre las concentraciones y las bacterias en el suelo, para finalmente poder analizar dicha relación, ya que ambas son función de la otra.

Para obtener los valores presentados en la siguiente tabla, se realizaron cuatro diluciones, de las cuales únicamente se consideró el promedio de las últimas tres diluciones realizadas (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) durante la técnica de Cuenta en Placa; esto se debe a que la primera dilución (10^{-1}) no alcanzaba el rango máximo (250 bacterias/caja) para la cuantificación de bacterias, de acuerdo a lo normado (NOM-110-SSA1-1994).

Tabla 7.8 Unidades formadoras de colonias obtenidas por la técnica de cuenta en placa

Valores de la cuenta en placa					
Contenido de agua	Cajón	UFC/g de suelo			
		Muestreo inicial	1er. Muestreo	2º. Muestreo	3er. Muestreo
15%	S ₁	2.0x10 ⁶	2.4x10 ⁶	5.7x10 ⁵	2.1x10 ⁶
	S _{1'}	2.0x10 ⁶	2.5x10 ⁶	3.1x10 ⁵	7.8x10 ⁵
	S ₂	2.0x10 ⁶	2.5x10 ⁶	6.2x10 ⁵	7.4x10 ⁵
	S _{2'}	2.0x10 ⁶	3x10 ⁵	6x10 ⁵	2.8x10 ⁵
	S ₃	2.0x10 ⁶	2.4x10 ⁵	3.7x10 ⁵	2.9x10 ⁵
	S _{3'}	2.0x10 ⁶	3.7x10 ⁵	3.9x10 ⁵	1.3x10 ⁶
30%	S ₄	2.0x10 ⁶	5.8x10 ⁵	7.7x10 ⁵	4.8x10 ⁵
	S _{4'}	2.0x10 ⁶	2.2x10 ⁶	2.5x10 ⁵	4.3x10 ⁵
	S ₅	2.0x10 ⁶	5.4x10 ⁵	4.6x10 ⁵	2.2x10 ⁵
	S _{5'}	2.0x10 ⁶	8.3x10 ⁵	8.4x10 ⁵	4.9x10 ⁵
	S ₆	2.0x10 ⁶	1.3x10 ⁶	5.3x10 ⁵	1.6x10 ⁶
	S _{6'}	2.0x10 ⁶	1.1x10 ⁶	6.5x10 ⁵	2.4x10 ⁶

De acuerdo al número de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo (UFC/g) determinadas por la técnica de cuenta en placa; de manera general, hubo disminución de la población microbiana en todos los cajones, exceptuando el cajón S₁, en el cual aumentó 1x10⁵ bacterias heterótrofas, lo que confirma una mayor tasa de respiración microbiana, seguido por el cajón S₆, aunque fue el cajón que disminuyó menormente, con un 4x10⁵ UFC/g, el cual presenta una mayor producción de CO₂ y mejores eficiencias de remoción para cada compuesto estudiado. En los demás casos (S₂, S₄, S₃ y S₅) disminuyó la población microbiana de 1.3 – 1.8x10⁶ UFC/g, respectivamente. Aunque los microorganismos presentes en el suelo hayan disminuido el número de UFC/g, aún se encuentra dentro del intervalo normal en cuanto a bacterias degradadoras se refiere; ya que se contempla que debido a que muchos de ellos no son capaces de asimilar al hidrocarburo como sustrato, se ve disminuida la población, sin llegar a la inhibición de la misma.

En la Figura 7.3 se observan las diferencias entre UFC/g de suelo en cada uno de los muestreos:

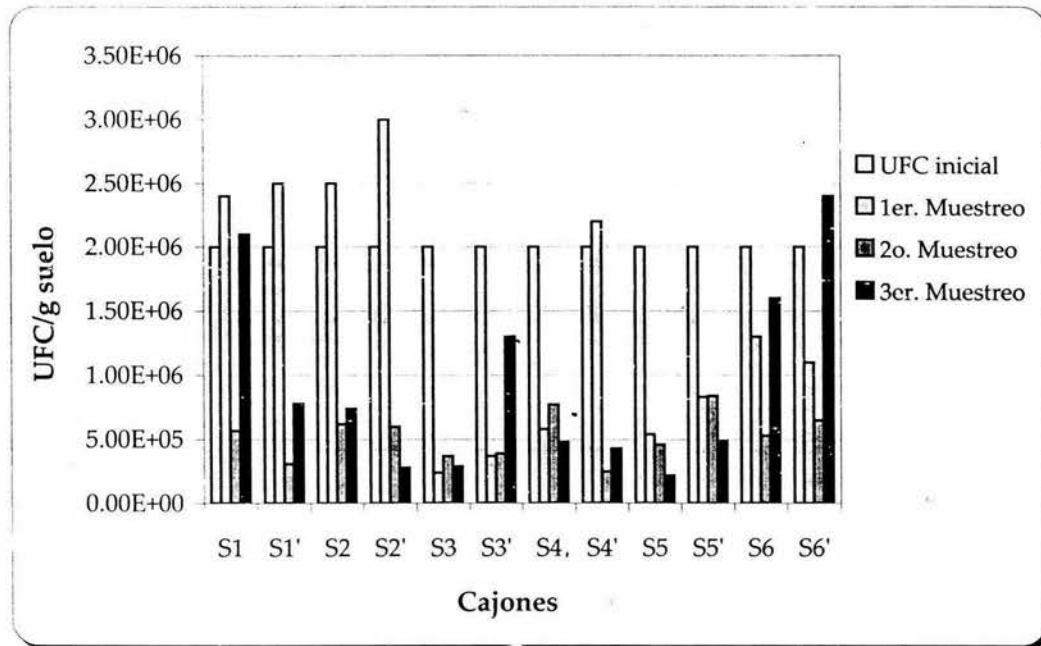


Figura 7.3 Unidades formadoras de colonias por gramo de suelo

Al inicio de la experimentación se observa la presencia de bacterias heterótrofas, en el intervalo promedio de bacterias presentes en un suelo contaminado con hidrocarburos (10^6 - 10^8); en el segundo muestreo se observó una disminución de las UFC/g en algunos cajones; en la última cuantificación de bacterias aerobias se obtuvo una disminución de las UFC en la mayoría de los casos; sin embargo, la disminución no alteró las concentraciones de los hidrocarburos, ya que aunque en algunos casos la concentración no disminuyó significativamente, las eficiencias de remoción obtenidas fueron satisfactorias, indicando la eficiente bioactividad de los microorganismos.

7.5 RESPIROMETRÍA

Para los procesos biológicos aerobios la presencia de poblaciones microbianas funcionando metabólicamente pueden ser evaluadas por la medición de la actividad microbiana. La actividad microbiana es diferente del conteo microbiano, pues este último es una indicación del número de microorganismos viables que están presentes en el suelo. El conteo de estos microorganismos no indica si estos están relacionados con la actividad metabólica de la degradación de los hidrocarburos y generalmente, confirman una estimación demasiado baja del tamaño de la población actual. En contraste, las mediciones de la actividad microbiana indican si los microorganismos son o no metabólicamente activos en el suelo.

Es por consiguiente que, conocer la tasa de respiración microbiana en el suelo (mg de CO₂/kg de suelo/tiempo de incubación), es de gran importancia, puesto que con ayuda de los resultados de las concentraciones, eficiencias de remoción y bacterias heterótrofas, puede tenerse un completo panorama para identificar el motivo por el cual se favoreció la degradación de los HAP.

Para esta parte, se realizaron pruebas de respirometría (Prueba de Jarras Cerradas) (Gauger, 1999), para conocer si la población microbiana estaba asimilando a los hidrocarburos como fuente de energía y con esto, la capacidad de degradarlos. Esta actividad microbiana se demuestra por la producción de CO₂ por parte de los microorganismos, lo que indica que al consumir los contaminantes están consumiendo oxígeno y lo liberan como CO₂. Para seleccionar los tiempos de incubación a los cuales fueron sometidas las muestras de suelo, se consideró que después de 72 horas la muestra es sometida a condiciones anaerobias, lo cual no es conveniente para este tipo de estudio en que intervienen las bacterias heterótrofas

aerobias. Por lo anterior, se consideraron tiempos de incubación de 6, 24 y 48 horas.

De acuerdo en los datos obtenidos en la prueba de respirometría, (Tabla 7.8 y como se observa en la Figura 7.4), en todos los cajones se obtuvo una producción de CO₂, a diferencia del blanco, en el cual se presentó liberación de CO₂ por parte de los microorganismos durante las primeras 24 horas, tiempo en el cual comienza a haber menor producción de CO₂, ocasionado por la falta de aireación en ese suelo.

Tabla 7.9 Producción de CO₂ en los cajones

Contenido de agua	Cajón	mg CO ₂ / kg suelo/tiempo de incubación		
		6 h	24 h	48 h
15%	S ₁	1.144	2.266	4.048
	S _{1'}	0.880	2.310	3.036
	S ₂	0.176	1.342	2.046
	S _{2'}	0.968	1.122	2.134
	S ₃	0.968	1.782	3.080
	S _{3'}	0.704	1.276	3.168
30%	S ₄	0.418	1.628	1.870
	S _{4'}	0.660	2.178	2.684
	S ₅	0.616	1.958	3.432
	S _{5'}	0.946	2.310	3.454
	S ₆	1.100	3.036	3.080
	S _{6'}	1.320	2.112	3.608
S _B		1.408	3.454	-

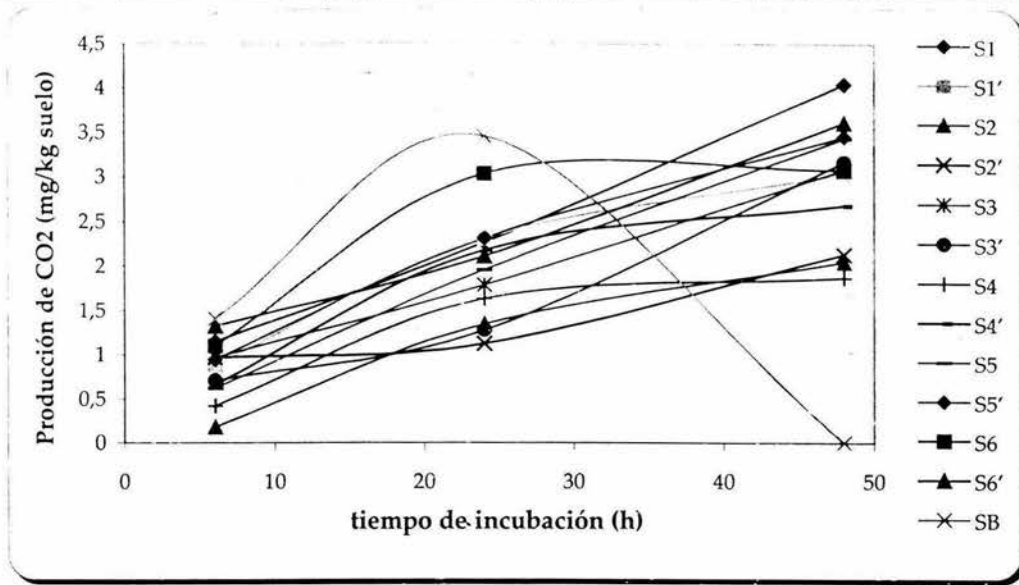


Figura 7.4 Respiración microbiana en el suelo

En la Figura 7.5 se aprecian los resultados de respirometría para los cajones analizados con mejor comportamiento.

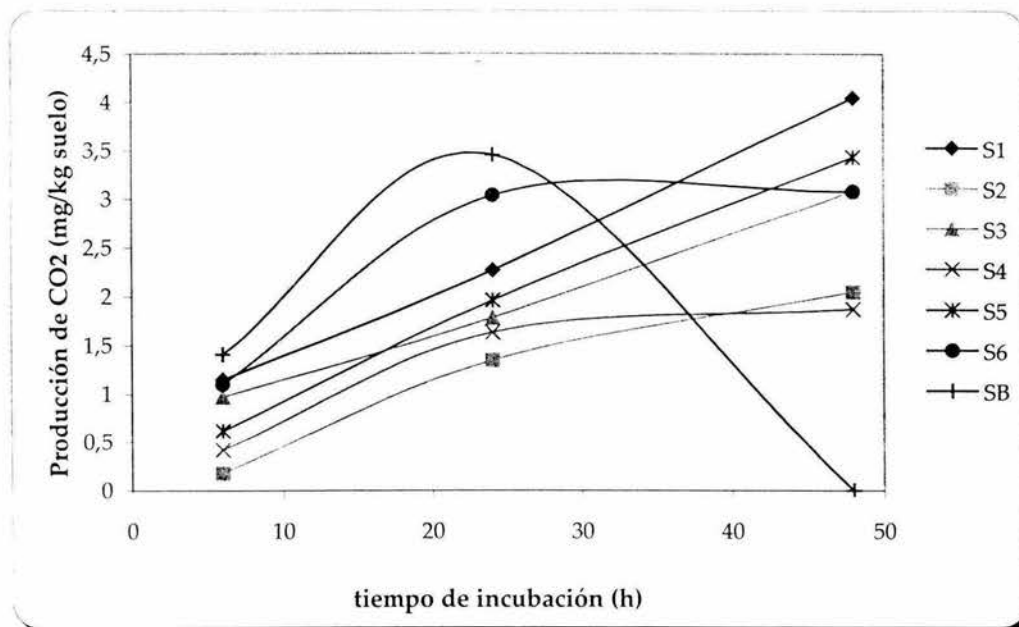


Figura 7.5 Respiración microbiana en el suelo de los cajones con mejor comportamiento

Puede observarse en la Figura anterior que la mayoría de los cajones tienen tendencia a producir CO₂ con respecto al tiempo, a excepción de los cajones S₄ y S₆, los cuales aumentaron en las primeras 24 h y en el periodo siguiente medido, de 24 a 48 h su tendencia es relativamente constante; siendo notoriamente menor en el cajón S₄. En los demás cajones, S₁, S₂, S₃, S₅ su tendencia va en aumento; sin embargo en este caso, los cajones con el 15% de contenido de agua son los que presentan mejor comportamiento en cuanto a la producción de CO₂, es decir, en cuanto a la actividad microbiana. En los cajones S₁ y S₃, con el menor contenido de agua se encuentran los microorganismos con mejor actividad metabólica y únicamente el cajón S₅, con contenido de agua de 30% fue uno de los tres mejores cajones en cuanto a las pruebas de respirometría realizadas.

En la Figura 7.6 puede observarse la producción de CO₂ a sus distintos tiempos de incubación, 6, 24 y 48 h.

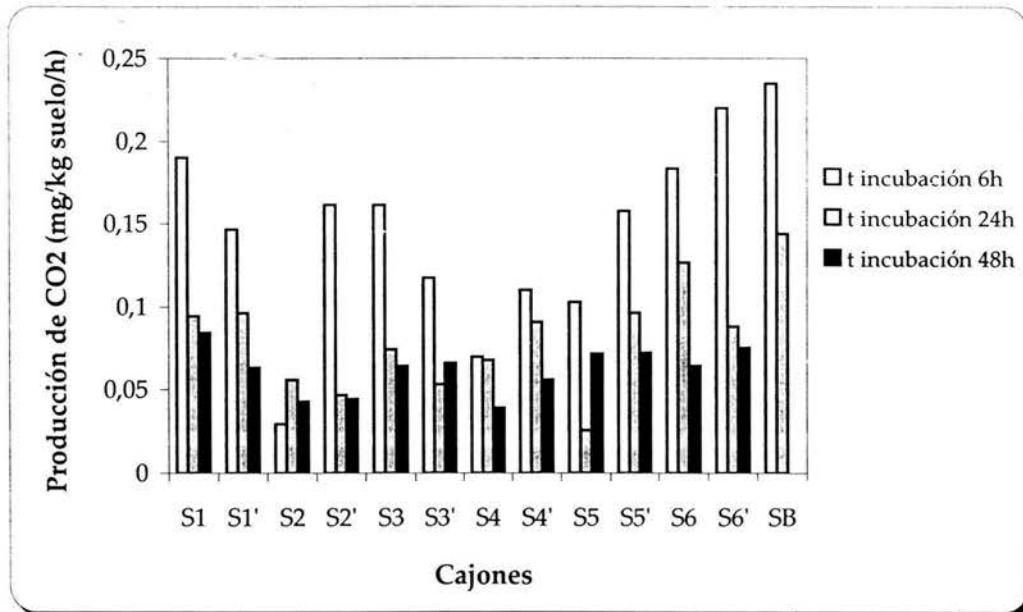


Figura 7.6 Tasa de respiración microbiana en el suelo

Debido a que las mayores eficiencias de remoción se presentan en los cajones con contenido de agua del 30%, es de suponerse que de igual manera la producción de CO₂ sea mayor con este contenido de agua; sin embargo, la tasa de respiración en el suelo fue muy variada pues a un tiempo de incubación de 6 h, los cajones S₁, S₆, S₃ y S₅ fueron los que tuvieron una mayor producción de CO₂ (de 0.1901-0.1027 mg/kg de suelo/tiempo de incubación) y los de menor producción, S₄ y S₂ (con 0.0697 y 0.0293 mg/kg de suelo/tiempo de incubación) respectivamente, de igual manera sucede a las 48 h, siendo menor el CO₂ producido que en las primeras horas.

Como puede observarse en la Figura 7.6 en todos los cajones de manera general, se tuvo una mejor producción a las primeras horas y conforme fue mayor el periodo menor es la actividad metabólica que presentan los microorganismos, presentando en promedio un mejor comportamiento el cajón S₆.

De manera muy similar sucede a las 24 h de incubación, cambiando únicamente S₂ y S₅ como los cajones de menor producción. Aunque en estos seis cajones se haya obtenido una mayor eficiencia de remoción, la diferencia entre los miligramos (mg) de CO₂ producido por kilogramo (kg) de suelo por tiempo de incubación (h), puede ser justificado por la población microbiana que habita en el suelo. No considerando por completo que la cantidad de microorganismos presentes en el suelo desempeñen una actividad metabólica favorecedora para la biodegradación de los HAP. Para lograr que hubiera producción de CO₂, diariamente se airearon cada uno de los cajones, para estimular a las bacterias heterótrofas presentes en el suelo, las cuales se encargan de la biodegradación de los compuestos de interés.

Debido a que la temperatura del suelo está relacionada con el contenido de agua en el suelo y el aire que tiene, ocasionando influencias sobre los microorganismos,

es importante saber que se requiere de un suelo bien aireado, es decir, un suelo donde los gases son aprovechables para el crecimiento de los microorganismos, siendo la cantidad suficiente y en adecuadas proporciones para lograr alcanzar coeficientes óptimos en los procesos metabólicos esenciales de dichos organismos.

Es por lo tanto, que las variaciones de agua que se tengan en el suelo controlan de alguna manera la cantidad de aire del espacio aprovechable en el suelo; por consiguiente, la reserva de oxígeno (O_2), gas constantemente usado por los microorganismos, debe ser renovado de manera continua. Este es un factor importante, ya que el aire del suelo no es continuo, puesto que se encuentra entre los poros separados por los sólidos del suelo; es por ello, que se presenta variabilidad en cuanto a la composición del aire, de un sitio a otro del suelo. Teniendo como consecuencia la falta de aireación, o en todo caso la variación de contenido y composición de aire por cambios rápidos, efectos en los microorganismos degradadores ya que la pobre aireación en el suelo sobre los procesos microbiológicos ocasiona la disminución del coeficiente de oxidación de la materia orgánica, en este caso, de los HAP.

Debido a que las bacterias que se cuantifican son organismos aerobios, es importante considerar que éstos son incapaces de actuar propiamente en ausencia de oxígeno gaseoso, causando afectación en los microorganismos.

Aunando a todo esto, la temperatura es otro factor importante para obtener la remoción de los contaminantes, pues como es sabido las actividades químicas y biológicas son una expresión de la energía; ya que la intensidad de ellas dependerá de la temperatura que se tenga en el medio, en este caso, el suelo contaminado. Este factor ambiental, no fue controlado ya que durante el periodo de experimentación se tuvo en promedio, la temperatura requerida para proveer el crecimiento favorable de los microorganismos; $27^{\circ}C$ o temperatura ambiente.

Sin embargo, en el caso de la degradación para desechos de refinería y petroquímicos, el rango establecido está entre los 10 y 30°C, pues a temperaturas mayores de los 30°C a 40°C, la degradación es afectada.

7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En casos donde se tiene un experimento factorial con dos factores, se tiene sólo una réplica, es decir, se tiene sólo una observación por celda; en este caso, existen tantos parámetros en el modelo de análisis de varianza como observaciones y los grados de libertad son cero; respuesta generada por el paquete utilizado.

Para este caso el análisis de varianza se realizó con el paquete Statgraphics. En la Tabla 8.9 se muestra el resumen del diseño creado, el cual estima el efecto de 2 factores. El diseño es un factorial estándar, que consiste de todas las combinaciones de los niveles de los factores, considerando como respuesta, las eficiencias de remoción de los HAP estudiados, antraceno, benzo(a)pireno, criseno, fenantreno y naftaleno.

En el diseño se tiene un total de 12 corridas.

Tabla 7.11 Resumen del diseño factorial

Resumen del Diseño		
Tipo de Diseño: Categoría Multi-factor		
Base del Diseño		
Número de factores experimentales: 2		
Número de respuestas: 5		
Número de corridas: 12		Grados de libertad de Error: 6
Aleatorizado: No		
Factores	Niveles	Unidades
Tratamientos	3	
Contenido de Agua	2	%

Respuestas	Unidades
Antraceno	%
Benzo(a)pireno	%
Criseno	%
Fenantreno	%
Naftaleno	%

Dentro del análisis estadístico, se realizó un análisis de varianza para los HAP, en el cual se descompone la variabilidad de los HAP sobre las contribuciones debido a varios factores. Desde el Tipo III de suma de cuadrados (el error) se escogió la aportación de cada factor la cual se midió eliminando los efectos de cualquier otro factor, que para este experimento no se haya considerado.

La elaboración de pruebas y gráficas fue para determinar cuales factores presentaron un efecto significativo estadísticamente en la degradación de los hidrocarburos.

La prueba F permitió identificar los factores importantes; obteniendo la gráfica de medias y la de interacción que ayudan a interpretar los efectos importantes entre los factores. Para cada factor significativo, la prueba de rangos múltiples indica cuales medias fueron significativamente diferentes de otras.

De acuerdo a los valores obtenidos en la prueba F con un intervalo de confianza del 95%, se tuvo que ninguno de los factores establecidos (contenido de agua o tratamiento) tienen un efecto estadístico significativo sobre el antraceno, benzo(a)pireno y criseno; lo que indican las grandes eficiencias de remoción. Sin embargo, el fenantreno y naftaleno, presentan un efecto en la degradación de los HAP ocasionando en alguno de estos casos eficiencias menores, con respecto al tratamiento dado en los cajones:

1. Suelo contaminado solo (S)
2. Suelo contaminado + Nutrientos (S+N)
3. Suelo contaminado + Nutrientos + Surfactante (S+N+Surf)

Considerando por separado los factores, como puede observarse en la Tabla 8.10 de manera general, el contenido de agua del 30% fue el que presentó en todos los cajones mejores eficiencias de remoción, de acuerdo a las medias obtenidas en el análisis de variancia. En el caso del tratamiento, adicionar nutrientes y un surfactante al suelo contaminado, es la mejor opción para remover HAP, presentándose la degradación de éstos de acuerdo a la estructura que tiene cada uno de ellos.

Tabla 7.12 Medias estándar por mínimos cuadrados para los HAP

HAP	Medias estándar				
	Contenido de agua		Tratamientos		
	15%	30%	S	S+N	S+N+Surf
Antraceno	63.38	85.28	66.74	70.09	86.17
Benzo(a)pireno	53.80	65.26	63.55	39.85	75.18
Criseno	47.59	72.32	71.15	33.19	75.52
Fenantreno	41.54	53.69	0.0014	60.33	82.51
Naftaleno	27.53	56.49	0.0008	35.44	90.58

Con base en la prueba de rangos múltiples, las diferencias entre contenidos de agua y tratamientos del antraceno, benzo(a)pireno y criseno no fueron significativas; sin embargo, en el caso del fenantreno y naftaleno las diferencias entre tratamientos del suelo contaminado (S) con respecto al que tiene nutrientes (S+N) y con el que tiene adición de nutrientes y surfactante (S+N+Surf), fueron estadísticamente significativas. Este efecto se debió a la no detección de dichos hidrocarburos desde el inicio del experimento, contemplando para el análisis estadístico el nulo porcentaje de remoción en los cajones con 15% de contenido de agua, ocasionando una media menor al de los demás casos.

Finalmente, puede decirse que el conjunto de los dos factores, contenido de agua y tratamientos (S, S+N, S+N+Surf) hacen que se logre la degradación de los HAP con eficiencias de remoción satisfactorias, presentando mejores resultados el controlar un contenido de agua del 30%, adicionando nutrimentos y surfactante.

CAPÍTULO VIII

Conclusiones y Recomendaciones

8.1 CONCLUSIONES

1. La caracterización física, química y biológica del suelo es fundamental para conocer si la atenuación natural y biorremediación es viable como técnica de saneamiento, ya que ésta parte de la perspectiva microbiológica, es decir, del esencial conocimiento del habitat natural de las poblaciones microbianas degradadoras de hidrocarburos.
2. La adición de un surfactante sirvió como coadyuvante a los microorganismos del suelo ya que facilita la solubilidad y movilización del hidrocarburo en el suelo, degradando los HAP presentes; siempre y cuando la dosis suministrada al suelo no altere la preferencia del hidrocarburo como sustrato al microorganismo, o en todo caso los inhiba.
3. En general se obtuvo el 90% de degradación en los hidrocarburos de interés (HAP), siendo el alto contenido de agua un factor importante para favorecer la tasa de degradación en un periodo menor; esto es debido a que en condiciones de alto contenido de agua el crecimiento de microorganismos aumenta. Teniendo que para un suelo arenoso el

contenido de agua constante de 30% presentó mejores eficiencias de remoción que un 15%.

4. Experimentalmente, el cajón S₁ con 15% de contenido de agua es el que presentó la mejor eficiencia de remoción para todos los compuestos, principalmente el naftaleno.
5. De los experimentos en cajones con el 30% de contenido de agua el que presentó una eficiencia de remoción mejor es el S₆, con la adición de nutrimentos y el surfactante.
6. Se elimina la posibilidad de que la alta concentración en los tres primeros cajones con el 15% de contenido de agua, haya sido tóxica para los microorganismos, puesto que en promedio, las concentraciones presentes al inicio del proceso fueron muy similares en todos los cajones.
7. Se comprobó que mientras más compleja sea la estructura del hidrocarburo aromático policíclico, la eficiencia de remoción es menor, si bien es satisfactoria como para el caso del benzo(a)pireno, no sucedió lo mismo para el naftaleno y el antraceno, los cuales presentan menor número de anillos.
8. Las gráficas de respirometría evidencian la importancia que hay entre la actividad microbiana y la aireación, comprobando experimentalmente en el suelo que se tomó como blanco (S_B), que después de las 24 horas ya no hubo producción de CO₂, indicando que hay presencia de bacterias heterótrofas degradadoras de hidrocarburos, pero después de cierto tiempo la actividad microbiana disminuyó, debido a que las bacterias no tienen su principal aceptor de electrones, el O₂.

9. Los cajones con el 30% produjeron mayor cantidad de CO₂ liberado por la actividad microbiana, siendo en todos los casos mayor el número de bacterias presentes en el suelo y a su vez mayor su remoción a diferencia de los cajones con el 15%.

10. El análisis estadístico confirma el efecto producido entre los factores contemplados (contenido de agua y tratamientos), en cuanto a la degradación de los HAP; confirmando que los cajones con mayor contenido de agua, adición de nutrimentos y surfactante son los que presentaron mayor remoción.

11. Asumiendo que la respiración es un indicador de la actividad microbiana bajo condiciones aerobias, se determinó que la atenuación natural y la biorremediación son una opción viable y efectiva en suelos arenosos contaminados con HAP, debido a la poca inversión que requiere; lo cual dependerá de las concentraciones y el tipo de contaminante, pues esto determinará la rapidez y la eficiencia que se obtenga; cumpliendo así el objetivo de la tesis.

8.2 RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar un monitoreo periódico para evaluar si los HAP con mayor número de anillos (criseno y benzo(a)pireno) alcanzan la remoción requerida, teniendo un mayor control en cuanto a los factores ambientales (aireación, contenido de agua y temperatura) que se encuentran involucrados para obtener las mejores eficiencias de remoción.

2. Enfocarse al estudio de HAP con número de anillos mayor o igual que el benzo(a)pireno de acuerdo en su toxicidad en cuanto a lo establecido en la legislación, tal como es el caso del benzo(a)antraceno y pireno.
3. Probar porcentajes de contenido de agua tomando como referencia mínima el 30%, considerando que del 50 al 80% de la capacidad de campo del suelo es la óptima para los microorganismos.
4. Establecer temperaturas específicas dentro del intervalo considerado como óptimo para identificar en cual los microorganismos presentan una mejor bioactividad en un suelo del mismo tipo, arenoso.
5. Adicionarle nutrimentos al suelo periódicamente, correspondiendo al tiempo de muestreo y observar el efecto que presenta en los microorganismos.
6. Introducir microorganismos exógenos al suelo considerados como degradadores de hidrocarburos, para observar la diferencia entre remociones con microorganismos nativos.

CAPÍTULO IX

Referencias

- ✓ Acevedo Sandoval, Otilio A., 2000. *Informe: Degradación y Contaminación de los Suelos del Estado de Hidalgo*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- ✓ Adams Schroeder, R.H., Domínguez Rodríguez, V.I. y Vinalay Carrillo, L., 2002. *Evaluation of Microbial Respiration and Ecotoxicity in Contaminated Soils representative of the Petroleum-Producing Region of Southeastern México*. Terra: 20, 253-265. México.
- ✓ Alef, K., Nannipieri, P., 1995. *Methods in applied soil microbiology*. Academic Press, Great Britain.
- ✓ American Society for Testing and Materials (ASTM). 1995. *Standard Guide for Risk-Based corrective Action Applied at Petroleum Release*. ASTM Designation: D 4972-89.
- ✓ American Society for Testing and Materials (ASTM). 1995. *Standard Guide for Risk-Based corrective Action Applied at Petroleum Release*. ASTM Designation: D 854-83.
- ✓ American Society for Testing and Materials (ASTM). 1997. *Standard Guide for Remediation of Groundwater by Natural Attenuation at Petroleum Release Sites*. Draft, Philadelphia.

- Blumer, M., 1975 *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils and Recent Sediments*. Science: 188.
- Brookes, P.C., Kragt, J.F., Powlson, D.S., and Jenkinson, D.S., 1985. *Chloroform fumigation and the release soil nitrogen: the effects of fumigation time and temperature*. Soil Biology and Biochemistry.
- Buckman, Harry D., 1991. *Naturaleza y Propiedades de los Suelos*. Limusa, México.
- Domínguez R., Aguilera H., 1990. *Metodología de Análisis Físico-Químicos de Suelos*. Técnicas de Laboratorio. Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Budavari, Susan, 1989. *The Index Merck: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biological*. USA.
- Dragun, J., 2001. *Soil & Sediment Contamination*. Volume 10/Issue 1. CRC PRESS, USA. 633-658.
- FitzPatrick E.A, 1980 *Suelos. Su Formación, Clasificación y Distribución*. Compañía Editorial Continental. México.
- Environmental Protection Agency (EPA), 1985. *Método de Cromatografía para HAP's, número 8310*.
- Freijer, Jan I, 1996. *Mineralization of Hydrocarbons in Soils under Decreasing Oxygen Availability*. Environmental Qual. 25. 296-304.
- Freijer, Jan I, H. de Jonge, W. Bouten and J.M, Verstraten, 1996. *Assessing Mineralization Rates of Petroleum Hydrocarbons in Soils in relation to environmental factors and experimental scale*. Biodegradation: 7. 487-500.
- G.F. White, T.P. Higgins and D.M. John, 1997. *Multiple Mechanisms for Biodegradation of Non-Ionic Surfactants in Bacteria*. International Symposium Environmental Biotechnology, Oostende. 265-274.
- Gauger W.K., 1999. *Pruebas de Biotratibilidad para el Suelo*. Radian Corporation, Texas.
- Ginn, Jon S., Sims, Ronald C. y Murarka, Ishwar P., 1995. *In Situ Bioremediation (Natural Attenuation) at a Gas Plant Waste Site*. Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium, Columbus, Ohio.

- ✓ Hawly, Gessner G., 1993. *Diccionario de Química y de Productos Químicos*. Ediciones Omega, Barcelona.
- ✓ Hinchee, Robert., 1997. *Biorremediation Journal*. Volume 1/Issue1. CRC PRESS, USA.
- ✓ Iturbe Argüelles, Rosario., 1998. *Técnicas de Rehabilitación de Suelos y Acuíferos*. Instituto de Ingeniería. UNAM, México.
- ✓ Iturbe Argüelles, Rosario., 2000. *Informe: Aplicación de Técnicas de Saneamiento Mediante Pruebas Piloto en la Refinería Francisco I. Madero, Evaluación de la Atenuación Natural y de los Drenajes Pluvial y Aceitoso*. Instituto de Ingeniería, UNAM. México.
- ✓ Iturbe, A. R., Orantes, J. L., Torres, L. G., 2002. *Biodegradation of two Anionic Surfactants employed for oil-contaminated-soils in situ-flushing*. Environmental Geosciences.
- ✓ Iturbe, A. Rosario, Flores, Carlos; Torres, Luis G., 2003. *Design and Operation of a 27m³ Biopile for Treatment of Soil Contaminated with Petroleum Fractions*. The Second International Bioremediation Symposium, IMP.
- ✓ J. Calabrese, Edward; T. Kostecki, Paul., 1991. *Hydrocarbon Contaminated Soil*. Volume 1. USA.
- ✓ John, G.F. White, 1998. *Mecanism for Biotransformation of Nonylphenol Polyethoxilates in Pseudomonas putida*. Journal of Bacteriology, 4332-4338.
- ✓ J. Calabrese, Edward; T. Kostecki, Paul., 1993. *Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils*. USA.
- ✓ Juárez Badillo, Rico Rodríguez. 1977. *Mecánica de Suelos. Fundamentos de la Mecánica de Suelos*. Tomo I, 3a. Edición, Limusa, México.
- ✓ K.H. Head, 1992. *Manual of Soil Laboratory Testing*. Vol. I. Soil classification and compaction test. Second Edition, Halsted Press Wiley, Great Britain.
- ✓ K, Nyer, Evan., 1993. *Practical Techniques for Groundwater and Soil Remediation*. USA.

- Kerr, J.M, McMillen, S.J. Magaw, R.I, Melton, H.R, Naughton, G., 2001. *Risk-Based Soil Screening Levels for Crude Oil: The Role of Polyaromatic Hydrocarbons*. The Petroleum Environmental Research Forum, USA.
- Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA). Disposiciones Complementarias, 1996. Porrúa, México.
- Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA), (y disposiciones complementarias), 2000. Edición XIX, Porrúa, México.
- Lide, David R., 1999. *Handbook of Chemistry and Physics*. 80 th Edition. CRC Press. USA.
- Liu, Baozhi; Banks, M.Kathy and Schwab, Paul, 2001. *Effects of Soil Water Content on Biodegradation of Phenanthrene in a Mixture of Organic Contaminants*. Soil and Sediment Contamination, An International Journal. Volumen 10, Issue 6.
- McAllister, Paul M., Chiang, Chan Yu; Salanitro, Joseph P., Dortch, Ira J., Williams, Patty, 1995. *Enhanced Aerobic Bioremediation of Residual Hydrocarbons Source*. Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium, Columbus, Ohio.
- Montgomery, Douglas C., 1991. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Gpo. Editorial Iberoamericana, México.
- Montgomery, Douglas C., Runger, George C., 1996. *Probabilidad y Estadística aplicadas a la Ingeniería*. McGraw-Hill, México.
- Montgomery, John H., 1990. *Groundwater Chemicals Desk Reference*. Lewis Publishers, USA.
- National Research Council (NRC). 2000. *Natural Attenuation for Groundwater Remediation*. National Academy Press, Washington, D.C.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. *Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. Diario Oficial, México.
- Norma Oficial Mexicana: NOM-110-SSA1-1994. Bienes y Servicios. *Preparación y Dilución de las muestras para su análisis microbiológico*. Diario Oficial, México.

- ✓ Norma Oficial Mexicana. NOM-021-RECNAT-2000. *Especificaciones de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos. Estudios, Muestras y Análisis*. Diario Oficial, México.
- ✓ Norma Oficial Mexicana: NOM-EM-138-ECOL-2002. *Límites Máximos Permisibles de Contaminación en Suelos afectados por hidrocarburos, la caracterización del sitio y procedimiento para la Restauración*. Diario Oficial, México.
- ✓ Orantes Gómez, José Luis, 2002. *Tesis: Aplicación de Surfactantes en Suelos Contaminados con Hidrocarburos*, México.
- ✓ PEMEX, 2003. *Análisis Estadístico de Petróleos Mexicanos*. Informe Anual, Revista Expansión.
- ✓ PROFEPA, 1999. *Restauración de Suelos Contaminados*. Restauración de Suelos Contaminados. México.
- ✓ Proyecto de Norma Oficial Mexicana: PROY-NOM-138-SEMARNAT-2003. *Límites Máximos Permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y restauración*. Diario Oficial, México.
- ✓ Reddi, Lakshmi; Inyang, Hilary., 2000. *Geoenvironmental Engineering, Principles and Applications*. Editorial Marcel Dekker, USA.
- ✓ Reyes Jaramillo, Irma., 1999. *Fundamentos Teórico-Prácticos de Temas Selectos de la Ciencia del Suelo*. Parte I. Publicaciones UAM, Iztapalapa. México.
- ✓ Riser Ever., 1992. *Bioremediation of Petroleum Contaminated Sites*. Editorial C. K. Smoley, USA.
- ✓ Saval, B.S., 1995. *Acciones para la Remediación de Suelos en México*. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM, México.
- ✓ Schulze, S., Barczewski, B., Klaas, N., Ebner, R., Birkle, M., Tiehm, A., 2001. *Natural Attenuation in a PAH/BTEX Plume: The Impact of Microbiological Processes*. The Sixth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium, San Diego, California.

- ✓ Smith, J. Michael; Lethbridge, Gordon; Burns, Richard; 1997. *Bioavailability and Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soils*. FEMS Microbiology Letters 152, 141-147. Elsevier Science B.V.
- ✓ Smith, J. Michael; Lethbridge, Gordon; Burns, Richard; 1999. *Fate of Phenanthrene, pyrene and benzo(a)pyrene during Biodegradation of Crude Oil added to two Soils*. FEMS Microbiology Letters 173, 445-452. Elsevier Science B.V.
- ✓ Sudip K. Samanta, Om V. Singh and Rakesh K. Jain, 2002. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Environmental Pollution and Bioremediation*. Trends in Biotechnology, Volumen 20, No. 6. 243-248.
- ✓ Suthersan, Suthan S., 2002. *Natural and Enhanced Remediation Systems*. Lewis Publishers, USA.
- ✓ Testa, Stephen M., Winegarden, Duane L., 1991. *Restoration of Petroleum-Contaminated Aquifers*. Lewis Publishers, USA.
- ✓ Torres, Luis G., Mijailova, Petia y Möeller, Gabriela. *Uso de Cepas Adaptadas a la Degradación de Compuestos Orgánicos Recalcitrantes y Tóxicos*. Ingeniería Hidráulica en México. Vol. XII, Núm. 3, Mexico, 1997. 15-25.
- ✓ Troy, Marlen A., Baker, Catherine H., Herson, Diane S., 1995. *Evaluating Natural Attenuation of Petroleum Hydrocarbons Spills*. Third International In Situ and On-Site Bioreclamation Symposium, Columbus, Ohio.
- ✓ U.S. Army Science Board, 1995. *Infrastructure and Environmental Issue Group, Remediation of Contaminated Army Sites: Utility of Natural Attenuation*. Draft Report, Department of the Army, Washington, D.C.
- ✓ United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1999. *Use of Monitored Natural Attenuation at Superfund, RCRA Corrective Action and Underground Storage Tank Sites*. Directive Number 9200, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, D.C.
- ✓ United States Environmental Protection Agency (USEPA), 2001. *Innovative Remediation and Site Characterization Technologies Resources*. USA.

- ↖ United States Environmental Protection Agency (USEPA), *Risk Assessment Guidance for Superfund*. Volumen 1. Human Health Evaluation Manual. Washington, D.C.
- ↖ Wiedermeier, T., et al., 1995. *Technical Protocol for Implementing Intrinsic Remediation with Long Term Monitoring for Natural Attenuation or Fuel Contamination Dissolved in Groundwater*. Vols 1 y 2, Air Force Center for Environmental Excellence, Brooks Air Force Base. San Antonio, Texas.
- ↖ Zamudio, R. Cedeño, J.A, 1998. *Biorremediación de Recortes de Perforación de Pozos Petroleros*. Boletín Ambiental, Contaminación del Suelo. Volumen 3, Ejemplar 8. México.

Páginas web consultadas (2004):

Características de los Hidrocarburos

- ↖ www.ai.org.mx
- ↖ www.elagrisa.es
- ↖ www.uam.es

Información de Suelos Contaminados con Hidrocarburos:

- ↖ www.fao.org
- ↖ www.profepa.org.mx
- ↖ www.rcrisat.org/text/research/nrmp/oned/Properties.htm

Normas Oficiales Mexicanas:

- ↖ www.astm.org
- ↖ www.epa.gov
- ↖ www.se.gob.mx/normas