

01177



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**EFICIENCIA DE LA BIOESTIMULACIÓN, BIOAUMENTACIÓN Y
ADICIÓN DE COMPOSTA VEGETAL PARA REMEDIAR UN SUELO
CONTAMINADO CON DIESEL**

T E S I S

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

P R E S E N T A :

BIOL. NORMA PÉREZ HERNÁNDEZ

Directora: Dra. Susana Saval Bohórquez

**UNAM
POSGRADO** 

MÉXICO D.F. 2005

m346537



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo y por la Beca otorgada.

A la Doctora Susana Saval Bohórquez, por todo el apoyo, enseñanzas y sobre todo su amistad, nunca podré agradecer toda su ayuda a lo largo de mi formación profesional y académica. Mil Gracias

DEDICATORIAS

A Dios

por acompañarme siempre y por enseñarme cual es el camino correcto en la vida

A mis padres Cristina y Alvaro, y a mi hermano Alvaro

Por todo el apoyo que siempre me han brindado y por todo el amor que me han dado

A mis abuelos

Por haber hecho hombres y mujeres de buena voluntad

A mi familia

Gracias por todo el apoyo y momentos maravillosos que siempre han regalado a mi vida, los quiero mucho a todos (Carmen, Diana, Sonia, Eva, Vera, Lyz, Fabi, Rosa, Alan, Margarita, Héctor, Raquel, Alejandro, Gandhi, Germán, Delia, y a la memoria de Henry, y todos los demás que nunca acabaría por mencionar)

A Balam

Por todos los momentos tan maravillosos pasados a su lado y por todo lo que me ha enseñado de la vida, lo cual me ha ayudado a ser más fuerte. Gracias.

TACTMC

A mis amigos de la maestría

Carlos, Tatiana y Jesica, por haber pasado los momentos más padres de esa etapa de mi vida con ellos, los quiero mucho.

INDICE

RESUMEN.....	I
LISTA DE TABLAS.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
INTRODUCCIÓN.....	V
OBJETIVOS.....	VII
ALCANCE.....	VIII
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Funciones del suelo y subsuelo.....	1
1.2. Contaminación de suelos con diesel en México.....	3
1.3. Características del diesel.....	6
1.3.1. Hidrocarburos presentes en el diesel.....	10
1.4. Biodegradación de hidrocarburos en suelo	11
1.5. Técnicas de remediación aplicadas a suelos contaminados con diesel.....	22
1.5.1 Bioaumentación o bioincremento.....	23
1.5.2. Bioestimulación.....	26
1.5.3. Biocomposteo.....	30
1.5.4. Atenuación natural.....	32
1.6. Técnicas de saneamiento más utilizadas en México y marco legal y normativo aplicable....	37
1.7. Estudios de biotratabilidad.....	41
1.8. Pruebas de demostración en campo.....	44
1.9. Adición de agentes tensoactivos.....	45
1.10. Tratamiento en biopilas.....	47
1.11. Diseño Experimental.....	49
1.11.1. Modelo al Azar de Efectos Fijos con 4 Niveles.....	53
2. METODOLOGÍA.....	57
2.1. Obtención y preparación del suelo contaminado.....	57
2.2. Caracterización inicial del suelo.....	58
2.3. Diseño y construcción de las biopilas.....	59
2.4. Tratamiento por Bioestimulación (Biopila BE).....	61
2.4.1. Adición de fertilizantes.....	61

2.5. Tratamiento de Bioaumentación (Biopila BA).....	62
2.5.1. Desarrollo del cultivo de bacterias degradadoras de diesel.....	62
2.6. Tratamiento con adición de composta vegetal (Biopila AC).....	64
2.6.1. Obtención y preparación de la composta.....	64
2.6.2. Caracterización de la composta.....	64
2.7. Tratamiento por atenuación natural (Biopila AN).....	65
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
3.1. Caracterización del suelo y de la composta antes del tratamiento.....	67
3.2. Características del cultivo de bacterias degradadoras.....	70
3.3. Comportamiento de los parámetros en las biopilas.....	71
3.3.1. Variación de la humedad.....	72
3.3.2. pH.....	75
3.3.3. Variación del nitrógeno total y los fosfatos.....	76
3.3.4. Variación de la temperatura.....	78
3.3.5. Porosidad.....	79
3.3.6. Contenido de bacterias degradadoras.....	79
3.3.7. Biodegradación del diesel.....	80
3.4. Análisis del diseño experimental.....	91
3.4.1. Comprobación de idoneidad del modelo.....	91
3.5. Crecimiento de especies vegetales.....	96
CONCLUSIONES.....	99
RECOMENDACIONES.....	100
BIBLIOGRAFÍA.....	101

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar simultáneamente la eficiencia de degradación alcanzada por 4 diferentes tratamientos de biorremediación en biopilas utilizando un suelo de uso industrial contaminado con diesel. El estudio se realizó a nivel de demostración en campo en donde se aplicaron la bioestimulación, bioaumentación, adición de composta vegetal y atenuación natural como técnicas de biorremediación en biopilas, cada una con 550 kg de suelo.

La biopila en donde aplicó la bioestimulación fue adicionada con fertilizantes agrícolas; la biopila que correspondía a bioaumentación se inoculó con un cultivo de bacterias degradadoras desarrollado en el laboratorio, con lo cual la población bacteriana se cuantificó en 1.81×10^5 ufc, a otra biopila se le adicionó composta vegetal y en la última biopila únicamente se dió seguimiento a la atenuación natural, que a su vez sirvió como testigo. El cultivo de bacterias degradadoras con el cual se inoculó la biopila con bioaumentación fue aclimatado en un medio mineral con concentraciones crecientes de diesel en transferencias sucesivas y se desarrolló a partir de una muestra del suelo contaminado. El cultivo se generó en un reactor semipiloto.

Se dió seguimiento a las diferentes biopilas mediante determinaciones de: humedad, temperatura, ortofosfatos, nitrógeno total, pH, población de bacterias heterótrofas y degradadoras cuantificables, así como la cuantificación de diesel residual. Esta última fue la variable de respuesta a partir de la cual se realizó la interpretación de resultados de manera estadística.

El diseño experimental aplicado fue un Modelo al Azar de Efectos Fijos con 4 Niveles, el cual mostró que estadísticamente el tratamiento más eficiente (ANOVA $0.05 \leq P$) fue el de bioestimulación alcanzando en 5 meses de tratamiento el 82.4% de la degradación del diesel, y siendo el único tratamiento que alcanzó valores por debajo del límite máximo permisible para un suelo de uso industrial según el PROY-NOM-138-ECOL-2002, la cual era la norma vigente cuando el trabajo fue desarrollado. Después siguieron en eficiencia la bioaumentación y la atenuación natural con 60.31 y 57.73%, respectivamente. La adición de composta por sí sola permitió únicamente un 23.45% de degradación de diesel, tal vez por la baja disponibilidad de los nutrientes. Para el caso de la bioaumentación y la atenuación natural se puede establecer que el reducido contenido de nutrientes naturales limitó la posibilidad de alcanzar mayores porcentajes de degradación. De esta forma se concluyó que la adición de nutrientes exógenos fue la opción que más contribuyó a la degradación de diesel durante la aplicación de la biorremediación.

LISTA DE TABLAS

Capítulo 1.

1.1. Algunas características del diesel.....	7
1.2. Mezcla de hidrocarburos obtenidos de la destilación fraccionada del petróleo.....	9
1.3. Algunas características de los hidrocarburos monoaromáticos (BTEX).....	12
1.4. Algunas características de los hidrocarburos poliaromáticos.....	13
1.5. Composición de la célula microbiana.....	27
1.6. Fuentes exógenas de nitrógeno y fósforo.....	28
1.7. Objetivos típicos de los estudios de biotratabilidad en biorremediación.....	42
1.8. Ventajas y desventajas del uso de las biopilas.....	48

Capítulo 3

3.1. Caracterización física, química y biológica del suelo y de la composta al inicio de los experimentos.....	68
3.2. Caracterización física, química y biológica de las biopilas.....	73
3.3. Caracterización física, química y biológica de las biopilas.....	74
3.4. Residuos ordenados y puntos de probabilidad para los datos de biodegradación de diesel...	92
3.5. Observaciones realizadas para cada tiempo.....	95
3.6. Análisis de variancia para los datos de diesel residual.....	95
3.7. Análisis de LSD (least significant difference) para diesel residual.....	96

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

1.1. Principales causas de degradación de lo suelos en México.....	3
1.2. Emergencias ambientales más frecuentes en México.....	4
1.3. Daños ambientales más frecuentes en México.....	5
1.4. Sustancias involucradas más frecuentemente durante las emergencias ambientales en México.....	5
1.5. Principales fracciones del crudo y sus usos.....	8
1.6. Integración de las rutas degradativas de algunos hidrocarburos aromáticos.....	19
1.7. Vías metabólicas de n-alcanos.....	20
1.8. Sistema de composteo.....	31
1.9. Tipo de tratamientos utilizados para el saneamiento de suelos contaminados en México.....	40
1.10. Esquema para evaluar la viabilidad de aplicar la biorremediación en biopilas.....	50

Capítulo 2

2.1. Vista de las biopilas.....	61
2.2. Procedimiento para la obtención del cultivo de bacterias degradadoras.....	63
2.3. Tratamientos aplicados en las biopilas.....	66

Capítulo 3

3.1. Variación del porcentaje de humedad durante la degradación de diesel.....	75
3.2. Variación del pH durante la degradación de diesel.....	76
3.3. Utilización del nitrógeno total durante la degradación.....	77
3.4. Utilización de fosfatos durante la degradación.....	77

3.5. Cuantificación de bacterias heterótrofas en las biopilas.....	80
3.6. Cuantificación de bacterias degradadoras en las biopilas.....	80
3.7. Degradación del diesel en las biopilas.....	82
3.8. Perfiles cromatográficos durante la degradación del diesel en la biopila BE.....	84
3.9. Perfiles cromatográficos durante la degradación del diesel en la biopila BA.....	85
3.10. Perfiles cromatográficos durante la degradación del diesel en la biopila AC.....	86
3.11. Perfiles cromatográficos durante la degradación del diesel en la biopila AN.....	87
3.12. Gráfica de probabilidad normal de los residuos para degradación del diesel.....	93
3.13 Gráfica de residuos contra el tiempo.....	94
3.14. Algunas especies vegetales creciendo en la biopila de atenuación natural (AN).....	97
3.15. Planta de frijol en la biopila de atenuación natural después de cinco meses de tratamiento.....	98

INTRODUCCIÓN

La economía del mundo actual se rige principalmente en el petróleo y sus derivados, los cuales serán la principal fuente de energía primaria durante los próximos años.

La gran producción de crudo por parte de PEMEX ha ubicado a México como el sexto productor de crudo en el mundo (IEA, 1999). La extracción y manejo de 3 523 000 de barriles diarios de hidrocarburos líquidos producidos en el año 2003 (PEMEX, 2003), así como su distribución y procesamiento han implicado graves problemas de contaminación y por lo tanto esfuerzos por parte de la paraestatal destinados a proteger el ambiente. En el 2002 la empresa destinó 18 mil millones de pesos a acciones en seguridad industrial y protección al ambiente (PEMEX, 2003). El contaminante de suelo más frecuente y causa de graves problemas de contaminación es el diesel, superado sólo por el crudo y el combustóleo (PROFEPA, 1999). Esto se debe a su gran demanda y amplio uso, tan solo en 1997, las ventas de diesel realizadas por la red comercial de PEMEX fueron en promedio 220 mil barriles por día (PEMEX, 2003).

Cuando ocurre un derrame de diesel en el suelo, este puede migrar desde la superficie hacia el subsuelo e incluso, alcanzar los mantos acuíferos, situación que puede llevar a la clausura de pozos cuando son de abastecimiento para evitar daños a la salud. Esto hace necesario implementar técnicas de remediación rápidas, eficientes y seguras. Los suelos afectados por derrames de hidrocarburos han sido sometidos a distintos tratamientos. En algunos casos el suelo puede ser excavado y llevado a otro sitio, para prevenir que la contaminación siga migrando hacia la profundidad. En otras ocasiones la excavación es indispensable cuando se requiere hacer algún trabajo subterráneo, como por ejemplo la reparación de fugas de ductos o de tanques subterráneos. En cualquier caso, los suelos contaminados deben ser sometidos a saneamiento por indicación de la autoridad ambiental y para esto lo más indicado es un tratamiento fuera del sitio (*off site*), en la mayoría de los casos.

Entre las técnicas que se han aplicado, la biorremediación ocupa el primer lugar en importancia, debido principalmente a que los constituyentes del diesel pueden ser fácilmente aprovechados como fuente de carbono y energía por diversas especies microbianas. Si se opta por llevar a cabo una biorremediación del suelo contaminado como alternativa de tratamiento los estudios de

biotratabilidad son necesarios para considerar principalmente la factibilidad de llevarla a escala real. Sin embargo, éstos no son considerados al aplicar alguna técnica de biorremediación. En algunas ocasiones se aplican varias opciones a la vez, sin conocer cual de ellas es la que está contribuyendo significativamente al saneamiento del suelo. Basado en lo anterior, se planteó como objetivo del presente trabajo, comparar a escala de demostración en campo cuatro técnicas diferentes de remediación utilizando un mismo lote de suelo contaminado, hecho que hasta la fecha no ha sido reportado en la literatura.

OBJETIVOS

General

- Comparar la eficiencia de la bioestimulación, la bioaumentación y la adición de composta vegetal como técnicas de biorremediación en biopilas a nivel de demostración en campo, utilizando un suelo contaminado con diesel de origen industrial.

Específicos

- Caracterizar física, química y biológicamente el suelo.
- Determinar si existen bacterias con capacidad degradadora en el suelo aplicando los distintos tratamientos.
- Determinar la tasa de degradación en cada una de las tecnologías utilizadas.
- Aplicar un modelo experimental que permita la selección del mejor tratamiento para la biorremediación del suelo.
- Observar si existe crecimiento de especies vegetales en el suelo después de haber reducido la concentración de diesel.

ALCANCES

- ✓ Definir la técnica de biorremediación más rápida y eficiente para el tipo de suelo a tratar, así como las condiciones de operación que más faciliten la aplicación en escala real
- ✓ Promover el saneamiento del suelo más allá del límite permisible aplicable al momento del estudio

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Funciones del suelo y subsuelo

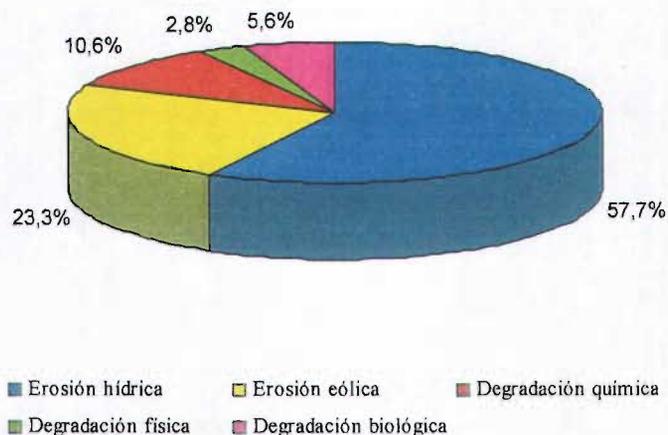
Para poder estudiar el suelo se necesita primeramente comprender su importancia dentro de la vida diaria. El suelo es el producto de la alteración, la remoción y de la organización de las capas superiores de la corteza terrestre bajo la acción de la vida, la atmósfera y de los cambios de temperatura que se manifiestan (Aguilar, 1995). Pero, ante todo, se debe considerar al suelo como un recurso natural no renovable, dado que la formación de una capa de 1 cm de espesor de suelo tarda miles de años, como menciona el trabajo realizado por Cano-Santana y Meave (1996). Estos autores reportan que en el área que cubrió el derrame de lava del Xitle en el Pedregal de San Ángel, D.F., la capa de suelo más profunda posee un promedio de 4.5 cm de profundidad y se tiene registro que el volcán hizo erupción hace 2000 años.

Al suelo se le pueden atribuir varias funciones y según Aguilar (1995), estas son:

- Como filtro regulador durante la recarga de acuíferos y protección de los mismos
- Sirve como medio para la producción de alimentos
- Es hábitat biológico y reserva genética
- Es el escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos y de la cadena alimentaria
- Sirve de base física para la construcción de edificaciones
- Es el albergue de la herencia cultural

Existen diferentes procesos por los cuales los suelos se degradan de manera natural y de éstos los más importantes son: erosión hídrica, erosión eólica, salinización, degradación física (compactación, cementación y encostramiento), degradación biológica (disminución de la materia orgánica del suelo) y degradación química (acidez del suelo). Estos procesos, en conjunto, afectan prácticamente a todo el país (figura 1.1). Además, algunas prácticas de manejo también inducen la degradación, entre las que se puede citar al sobrepastoreo y la sobreexplotación de los mantos freáticos, sobre todo en áreas agrícolas que demyan riego. Los problemas de contaminación en México no han sido cuantificados con precisión, pero entre ellos se incluyen a los que son causados por el uso de agroquímicos (fertilizantes y plaguicidas), así como a los provocados por derrames y fugas de combustibles, lo mismo que los ligados a actividades mineras (Estadísticas Ambientales, 2004).

De lo anterior se puede decir que la conservación y el aprovechamiento sustentable del suelo es necesario para evitar su deterioro y agotamiento, ya que es la base sobre la cual se sostienen la producción actual, la calidad de vida y el desarrollo y futuro del mundo.



Los porcentajes se refieren al total de la superficie afectada, 1 254 607.45 km², la cual representa el 64% de la superficie continental del país, estimada en 1 959 248 km², (INEGI, 1999).

Fuente: SEMARNAT, Subsecretaría de Recursos Naturales, 1999. INEGI, «Superficies continental e insular del territorio nacional», inédito, México, 1999.

Figura 1.1. Principales causas de degradación de los suelos en México

1.2. Contaminación de suelos con diesel en México

De acuerdo con las estadísticas de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA, 1999) las sustancias más frecuentemente encontradas en casos de emergencias o contingencias ambientales en orden de ocurrencia son:

- Petróleo crudo
- Combustóleo
- Diesel
- Gas LP
- Amoniaco
- Gasolina Nova
- Gasolina Magna
- Ácido sulfúrico
- Cloro

- Tolueno
- Aceites residuales
- Xilenos

En México se tienen reportadas más de 50 actividades industriales que emplean al diesel en alguna etapa de su proceso, entre ellas plantas generadoras de energía eléctrica, empleadas en distintas fábricas, hospitales, institutos de investigación y centros de cómputo, además de su uso en el transporte pesado. En el año 2002 se registraron en México 37 emergencias ambientales en las que el diesel estuvo involucrado (PROFEPA, 2003).

Por otro lado cabe señalar que en los últimos 10 años las emergencias ambientales reportadas a nivel nacional correspondieron en un 55% a derrames, 21% a fugas, 14% a incendios, 6% a explosión y 4% a otras causas (Figura 1.2). Los daños resultantes fueron 38% al suelo, 8% al agua, 39% al aire y en un 15% no hubo daño (figura 1.3). En cuanto a las sustancias involucradas el 19% correspondieron a gasolina, el 12% a diesel, 7% a gas LP, 2% a gas natural, 8% a otros hidrocarburos, 10% a amoniaco, 3% a ácido sulfúrico y 39% a otras sustancias y residuos (Figura 1.4). De la ubicación de las emergencias ambientales reportadas el 51% sucedieron dentro de las instalaciones, 42% durante el transporte de las sustancias y 7% en otros sitios o actividades (PROFEPA 2003).

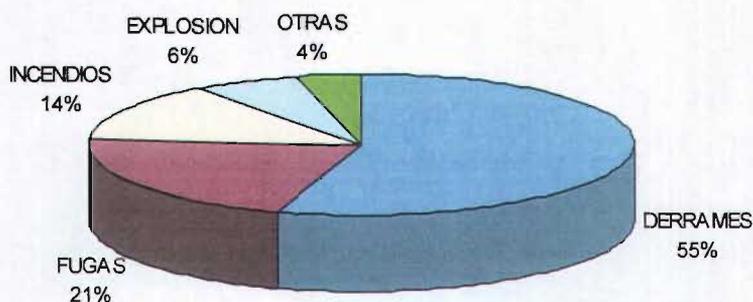


Figura 1.2. Emergencias ambientales más frecuentes en México

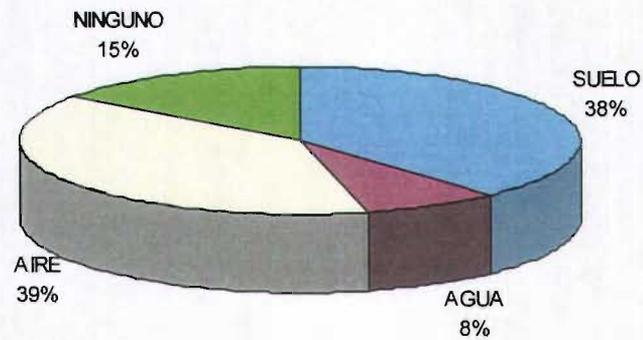


Figura 1.3. Afectaciones por emergencias ambientales en México

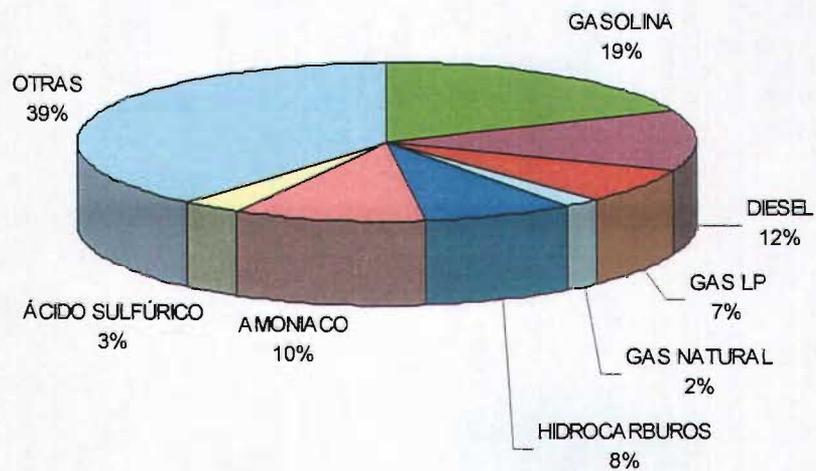


Figura 1.4. Sustancias involucradas más frecuentemente durante las emergencias ambientales en México

Debido a la urgente necesidad de atender las emergencias ambientales por derrames de hidrocarburos, se tuvo que trabajar más en la legislación ambiental mexicana. El 30 de marzo del 2005 se publicó en el Diario Oficial de la Federación la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 la cual establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, así como la caracterización del sitio y procedimientos para la restauración.

1.3. Características del diesel

El diesel es ampliamente usado en la industria como combustible para mover motores de gran tamaño por ejemplo plantas generadoras de energía eléctrica y en la industria del transporte por vías terrestre, marítima y fluvial.

Por definición estricta, el término “combustible diesel” se refiere solo a aceites combustibles que son aplicables a motores de ignición por compresión. Tales motores fueron inventados en Alemania en el siglo XIX por Rudolph Diesel y hacen uso del calor generado cuyo la mezcla de aire combustible es comprimida a 500 o 550 libras por pulgada cuadrada como única fuente de ignición (<http://inventors.about.com>).

La fuente básica para obtener el diesel es la destilación atmosférica del petróleo crudo posterior al proceso conocido como “cracking”, mediante la cual se separan las distintas fracciones según el intervalo de temperaturas. En México, la fracción que se obtiene por destilación entre 216 y 371 °C, es la que corresponde al diesel, algunas de sus especificaciones se reportan en la tabla 1.1 (PEMEX, 2004).

La separación de las distintas fracciones del petróleo se realiza en torres de fraccionamiento o de destilación primaria. Primero se calienta el crudo a 400 °C para que entre vaporizado a la torre de destilación, aquí los vapores suben a través de compartimentos y al ascender se van enfriando. Este enfriamiento ocasiona que se vayan condensando distintas fracciones en cada piso, cada una de las cuales posee una temperatura específica de licuefacción.

Tabla 1.1. Algunas características del diesel

Propiedad	Especificaciones PEMEX Diesel
Azufre % peso	0.021
Número de Cetano	53
Viscosidad cinemática a 40 °C	3.0
Densidad g/cm ³	0.83
Aromáticos totales (SFC) % vol	22
Temperatura de inflamación °C	80
Temperatura de escurrimiento °C	-9.0

Fuente: www.franquicia.pemex.com/octanaje/24DIESEL.htm
www.imiq.org/imiq/pt/Sec-Tec/JM6/JM6-2-T.PDF

El primer producto que se separa es la gasolina, la cual comienza a salir de la torre de fraccionamiento a los 125 °C, después la nafta y la kerosina a 175 °C, seguida de la turbosina y por último diesel y gasóleo a 275 °C aproximadamente. Todas las fracciones se envían a la torre de destilación en donde se condensan los gases para obtener los combustibles líquidos.

La fracción que está constituida por la gasolina virgen se compone de hidrocarburos de cuatro a nueve átomos de carbono, la mayoría de sus moléculas son lineales, mientras que otras forman ciclos de cinco y seis átomos de carbono. A este tipo de compuestos se les llama parafínicos y ciclo parafínicos, respectivamente.

La fracción que contiene de 10 a 14 átomos de carbono tiene una temperatura de ebullición de 174 a 228 °C y corresponde a la denominada kerosina, de la cual se extrae el combustible de los aviones de turbina llamado turbosina.

El gasóleo, tiene un intervalo de ebullición de 250 a 310 °C y contiene de 15 a 18 átomos de carbono, de aquí se obtiene el diesel. Este proceso se ilustra en la figura 1.5 en donde se engloban todos los destilados obtenidos posterior al proceso de “cracking” y fraccionamiento.

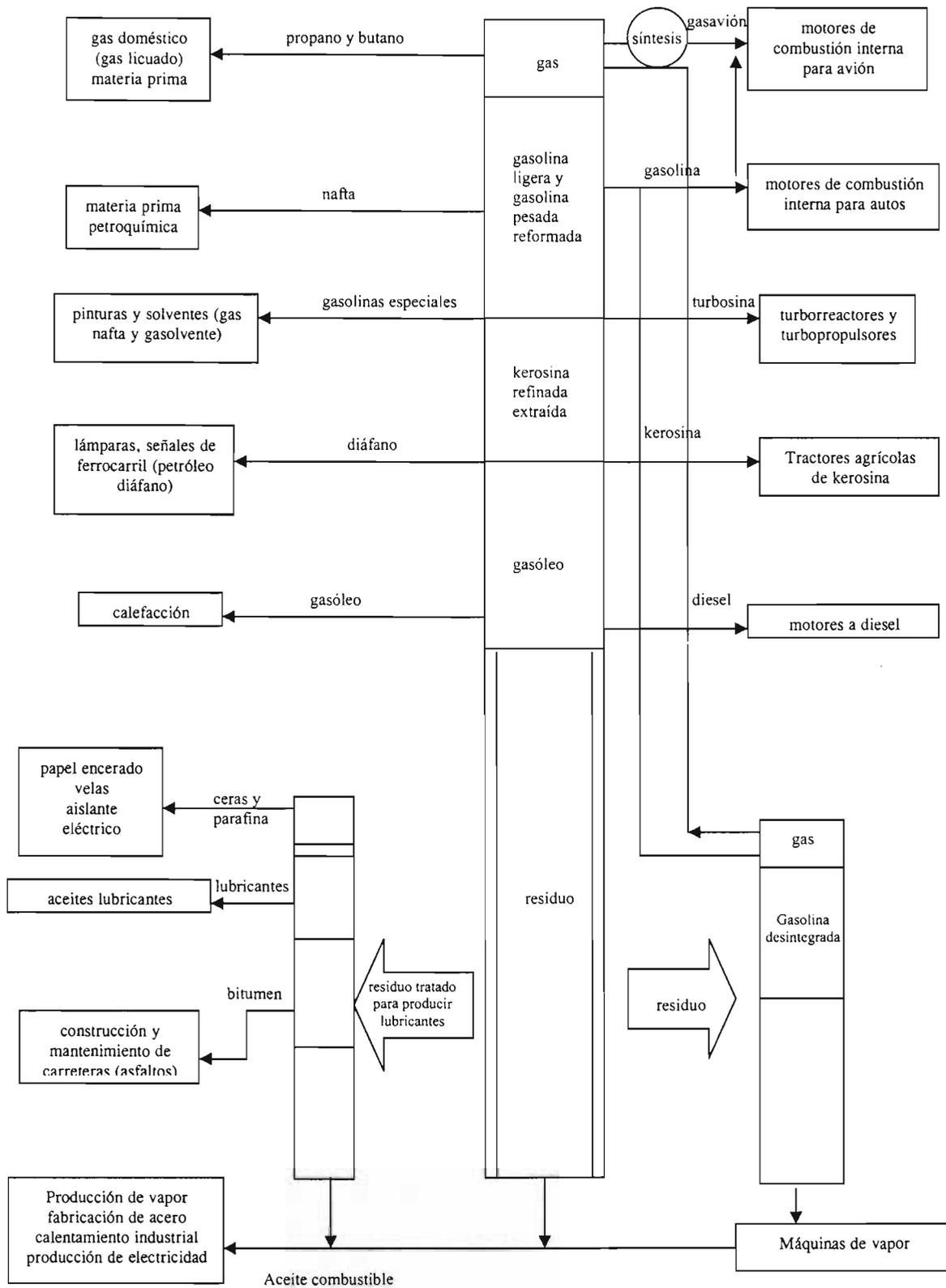


Figura 1.5. Principales fracciones del crudo y sus usos

La torre primaria de fraccionamiento destila a presión atmosférica, por lo tanto sólo se pueden separar sin descomponerse los hidrocarburos que contienen de 1 a 20 átomos de carbono. La tabla 1.2. describe aproximadamente el número de átomos de carbono que contienen las fracciones antes mencionadas. En este cuadro también se incluyen los gases incondensables y el gas licuado (LP) porque se encuentran disueltos en el crudo que entra a la destilación primaria, a pesar de que se trata de eliminar al máximo en las torres de despunte que se encuentran antes de precalentar el crudo de fraccionadores.

Tabla 1.2. Mezcla de hidrocarburos obtenidos de la destilación fraccionada del petróleo

Fracción	No. de átomos de carbono por molécula
gas incondensable	$C_1 - C_2$
gas licuado	$C_3 - C_4$
gasolina	$C_5 - C_9$
kerosina	$C_{10} - C_{14}$
gasóleo	$C_{15} - C_{23}$
lubricantes y parafinas	$C_{20} - C_{35}$
combustóleo pesado	$C_{25} - C_{35}$
asfaltos	$>C_{39}$

Fuente: http://omega.ilce.edu.mx:3000/sites/ciencia/volumen/ciencia2/39/html/SEC_9.html

Para poder recuperar más combustibles de los residuos de la destilación primaria es necesario pasarlos por otra torre de fraccionamiento que trabaje al alto vacío para evitar su descomposición térmica. En este tipo de torre se obtienen sólo dos fracciones una de destilados y otra de residuos.

De acuerdo con el tipo de crudo que se esté procesando, la primera fracción es la que contiene los hidrocarburos que constituyen los aceites lubricantes y las parafinas. Los residuos contienen los asfaltos y el combustóleo pesado, el cual se usa en las centrales termoeléctricas.

De los destilados obtenidos al vacío, aquellos que por sus características no se destinen a lubricantes se usarán como materia prima para convertirlos en combustibles ligeros como el gas licuado, la gasolina de alto octano, el diesel, la kerosina y el gasóleo.

El diesel SIN (bajo en azufre), proviene de la destilación de la fracción del petróleo crudo denominada gasóleo ligero primario. A diferencia de la gasolina, el mejor diesel es aquel que contiene un alto contenido en parafinas lineales y cicloparafinas, un bajo contenido de aromáticos y parafinas ramificadas. Este combustible es sometido a un proceso de hidrogenación catalítica denominado hidrotratamiento o hidrodesulfuración el cual tiene como finalidad principal eliminar o reducir los compuestos de azufre, nitrógeno y oxígeno, pero dado que las condiciones son más energéticas que para el caso de las gasolinas, entonces se logra también la reducción de una parte importante de los hidrocarburos aromáticos, por lo cual el diesel SIN que se utiliza en la actualidad presenta un contenido de azufre tan bajo como el 0.05% y está formado principalmente por parafinas entre un 65 y 70%, cumpliendo así con las normas de calidad más estrictas establecidas a nivel mundial. Por último, antes de salir al mercado se le añaden algunos aditivos como antioxidantes y estabilizantes entre otros (Palencia, 1997).

1.3.1. Hidrocarburos presentes en el diesel

La toxicidad del diesel como producto no ha sido investigada, pero sí se ha estudiado la toxicidad de algunos de sus componentes como los hidrocarburos monoaromáticos, ciertos alifáticos y los hidrocarburos poliaromáticos.

Aunque en el diesel los hidrocarburos monoaromáticos representan una proporción muy baja (de trazas hasta un 3%), se ha considerado su toxicidad por aquellos que pueden causar efectos nocivos a la salud a largo plazo, como son el benceno y los alquilbencenos que son depresivos del sistema nervioso central, el más peligroso es el benceno, el cual se ha demostrado ser carcinógeno a humanos, por las vías de exposición de inhalación e ingestión (EPA, 2004). Estos se encuentran en las listas de la EPA como materiales peligrosos y su relativa solubilidad en agua hace que en cualquier suelo afectado exista la amenaza de afectar también al agua subterránea.

Con respecto a los hidrocarburos poliaromáticos presentes en el diesel, su efecto se manifiesta a largo plazo, por ejemplo, el naftaleno, el cual constituye un porcentaje bajo del diesel, ha sido reportado como causante de anemia hemolítica independientemente del tiempo de exposición. Se sospecha que criseno y fenantreno causan tumores de la piel cuyo se ha estado en contacto directo con ellos. Otros constituyentes del diesel como benzo(a)antraceno y el benzo(a)pireno, que están presentes en concentraciones mínimas, como partes por millón, han demostrado ser carcinógenos en pruebas con animales de laboratorio (Block, 1991).

Algunas propiedades de los hidrocarburos monoaromáticos y poliaromáticos de preocupación potencial que son constituyentes del diesel, se presentan en las tablas 1. 3 y 1. 4.

El tema de toxicidad del diesel adquiere relevancia cuyo la exposición a sus componentes puede afectar la salud humana de manera masiva, por ejemplo, en un derrame el principal riesgo radica en la contaminación de los cuerpos de agua, donde ocurre la solubilización de sus componentes que poseen grupos funcionales polares y resonancia en su molécula, entre ellos están los monoaromáticos (BTEX) y los poliaromáticos, siendo los primeros más solubles que los segundos. Los hidrocarburos alifáticos son los componentes que se encuentran en mayor proporción en el diesel y prácticamente son insolubles en agua.

La vida media de los hidrocarburos poliaromáticos en suelo y agua subterránea, depende de las características de cada lugar y es función directa de factores como tipo de suelo, adsorción, absorción, solubilidad, fotooxidación y reacciones químicas que de manera natural ocurren en el sitio donde se encuentran. También se dice que el posible efecto cancerígeno de los hidrocarburos poliaromáticos se debe a que se encuentran en forma de mezcla (Roy, 1997).

1.4. Biodegradación de hidrocarburos en suelo

Los hidrocarburos en el suelo pueden ser degradados por acción de los microorganismos presentes. El metabolismo microbiano se puede clasificar según su fuente de carbono y energía de la siguiente manera (Bitton, 1999):

Fotótrofos. Estos microorganismos usan luz como fuente de energía y se dividen en fotoautótrofos y ftoheterótrofos. Los primeros usan CO₂ como fuente de carbono y H₂O, H₂ o H₂S como donadores de electrones, en cambio los ftoheterótrofos comprenden todos los heterótrofos facultativos que toman energía de la luz o de compuestos orgánicos que sirven como fuentes de carbono y donadores de electrones.

Tabla 1.3. Algunas características de los hidrocarburos monoaromáticos (BTEX)

HIDROCARBURO	BENCENO	TOLUENO	ETILBENCENO	XILENOS
Fórmula condensada	C ₆ H ₆	C ₆ H ₅ CH ₃	C ₈ H ₁₀	C ₆ H ₁₀
Peso molecular	78.11	92.14	106.16	106.20
Estado físico y aspecto en estado puro	Líquido amarillo claro/ incoloro	Líquido incoloro	Líquido incoloro	Líquido claro
Densidad 20 °C (g/cm ³)	0.8765	0.8669	0.867	0.864
Punto de ebullición (°C)	80.1	110.6	136.2	140
Coefficiente de distribución octanol/agua (K _o /w)	2.13	2.73	3.13	3.20
Factor de retardo (min)	6.60	9.90	13.94	15.46
Constante Ley de Henry (atm·m ³ /mol)	4.35E-3	5.11E-3	6.60E-3	4.99 E-3
Solubilidad en agua (mg/l a 25 °C)	1740	500	152	134
Clasificación EPA en cuanto a carcinogenicidad	A	D	D	D
Límite aceptable basado en riesgo a la salud humana suelo industrial (mg/kg) suelo residencial (mg/kg)	1.0 E2 1.2 E1	4.1 E5 1.6 E4	2.0 E5 7.8 E3	4.1 E6 1.6 E5
Vida media en el Suelo (días)	5-16	4-22	6	-

A= Carcinógeno a humanos, D= no carcinógeno a humanos

Fuente:

www.epa.gov/reg3hwmd/risk/rbc0402.pdf

www.miliarium.com/paginas/prontu/Tablas/Quimica/Contaminantes.htm

www.chrom.tutms.tut.ac.jp

www.chem.agilent.com/cag/isa/hpi/fl119.htm

Tabla 1.4. Algunas características de los hidrocarburos poliaromáticos

HIDROCARBURO	NAFTALENO	ACENAFTILENO	ACENAFTENO	FLUORENO
Fórmula condensada	C ₁₀ H ₈	C ₁₂ H ₈	C ₁₂ H ₁₀	C ₁₃ H ₁₀
Peso molecular	128.1	152.2	154.21	166.21
Estado físico y aspecto en estado puro	Sólido, polvo de color blanco cristalino	-	Sólido de color blanco cristalino	Sólido, cristales de color blanco
Densidad 20 °C (g/cm ³)	1.15	0.899	1.042-1.069	1.203
Punto de ebullición (°C)	217.96	280	278	295
Coefficiente de distribución octanol/agua (K _o /w)	3.1	4.08	3.92	4.18
Factor de retardo	2.73	2.85	3.33	3.23
Constante Ley de Henry (atm·m ³ /mol)	1.1 E-3	1.13 E-5	2.4 E-4	3.29E-4
Solubilidad en agua (mg/l a 25 °C)	31.7	3.88-3.93	3.94	1.68-1.90
Clasificación EPA en cuanto a carcinogenicidad	D	D	D	D
Límite aceptable basado en riesgo a la salud humana				
suelo industrial (mg/kg)	4.1 E4	-	1.2 E5	8.2 E4
suelo residencial (mg/kg)	1.6 E3	-	4.7 E3	3.1 E3
Vida media en el suelo (días)	80	12-121	75	-

D= no carcinógeno a humanos

Fuente:

www.epa.gov/reg3hwmd/risk/rbc0402.pdf

www.miliarium.com/paginas/prontu/Tablas/Quimica/Contaminantes.htm

www.chrom.tutms.tut.ac.jp

<http://chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DATABASE/23acenaphthene.htm>

Tabla 1.4. Algunas características de los hidrocarburos poliaromáticos

HIDROCARBURO	FENANTRENO	ANTRACENO	FLUORANTENO	PIRENO	CRISENO
Fórmula condensada	C ₁₄ H ₁₀	C ₁₄ H ₁₀	C ₁₆ H ₁₀	C ₁₆ H ₁₀	C ₁₈ H ₁₂
Peso molecular	178.22	178.24	202.26	202.26	228.3
Estado físico y aspecto en estado puro	Sólido, cristales incoloros	Sólido, cristales incoloros o amarillo pálido	Sólido, cristales amarillo pálido	Sólido incoloro en estado puro, amarillento cuyo tiene impurezas	Sólido incoloro con fluorescencia roja-azulada
Densidad 20 °C (g/cm ³)	1.174	1.28	1.25	1.27	1.27
Punto de ebullición (°C)	340	340	375	393	448
Coefficiente de distribución octanol/agua (K _o /w)	4.57	4.45	4.7-6.5	4.45-6.7	5.61
Factor de retardo	3.29	3.39	3.75	4.06	4.46
Constante Ley de Henry (atm·m ³ /mol)	3.91E-5	2.72E-3	1.95 E-3	6.85 E-3	1.05E-6
Solubilidad en agua (mg/l a 25 °C)	1.18-1.65	0.043-0.075	0.265	0.032-1.56	0.002
Clasificación EPA en cuanto a carcinogenicidad	D	D	D	D	B2
Límite aceptable basado en riesgo a la salud humana	-	6.1 E5	8.2 E4	6.1 E4	7.8 E2
suelo industrial (mg/kg)	-	2.3 E4	3.1 E3	2.3 E3	8.7 E1
suelo residencial (mg/kg)	-				
Vida media en días: Suelo	1,280	3-139	200	500	5-328

D= no carcinógeno a humanos, B2= posible carcinógeno a humanos

Fuente:

www.epa.gov/reg3hwm/risk/rbc0402.pdf
www.miliarium.com/paginas/prontu/Tablas/Quimica/Contaminantes.htm
www.chrom.tutms.tut.ac.jp
www.nature.nps.gov/toxic/chysene.pdf
www.nature.nps.gov/toxic/phenanth.pdf
<http://chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DATABASE/18fluoranthene.htm>

Tabla 1.4. Algunas características de los hidrocarburos poliaromáticos

HIDROCARBURO	BENZO(a)ANTRACENO	BENZO(a)PIRENO	BENZO(b)FLUORANTENO	BENZO(k)FLUORANTENO
Fórmula condensada	C ₁₈ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂	C ₂₀ H ₁₂
Peso molecular	228.29	252.3	252.32	252.32
Estado físico y aspecto en estado puro	Sólido incoloro	Sólido, cristales amarillo pálido	Sólido incoloro	No reportada
Densidad 20 °C (g/cm ³)	1.27	1.35	No reportada	No reportada
Punto de ebullición (°C)	435	495	481	No reportada
Coefficiente de distribución octanol/agua (K _o /w)	5.61	6.1	5.8-6.5	6.5
Factor de retardo (min)	4.43	6.20	-	-
Constante Ley de Henry (atm·m ³ /mol)	9.99 E-7	2.7E-7	1.22 E-5	3.92 E-5
Solubilidad en agua (mg/l a 25 °C)	0.009-0.014	0.0038	0.014	0.0007-0.008
Clasificación EPA en cuanto a carcinogenicidad	B2	B2	B2	B2
Límite aceptable basado en riesgo a la salud humana				
suelo industrial (mg/kg)	7.8	7.8 E-1	7.8	7.8 E1
suelo residencial (mg/kg)	8.7 E-1	8.7 E-2	8.7 E-1	8.7
Vida media en días:				
Suelo	430	2-693	610	910-2140

B2= posible carcinógeno a humanos

Fuente:

www.epa.gov/reg3hwmd/risk/rbc0402.pdf
www.miliarium.com/paginas/prontu/Tablas/Quimica/Contaminantes.htm
www.state.nj.us/health/eoh/rtkweb/0139.pdf
www.speclab.com/compound/c206440.htm
www.state.nj.us/health/eoh/rtkweb/2958.pdf
www.chrom.tutms.tut.ac.jp
www.chrom.tutms.tut.ac.jp/JINNO/DATABASE/13benzo%5Ba%5Bpyrene.htm

Quimiótrofos. Estos microorganismos obtienen su energía vía oxidación de compuestos orgánicos e inorgánicos y se dividen en litótrofos (quimioautótrofos) y heterótrofos (organótrofos). Los primeros usan CO_2 como fuente de carbono (fijación del carbono) y obtienen su energía (ATP) de la oxidación de compuestos inorgánicos como NH_4^+ , NO_2^- , H_2S , Fe^{2+} , o H_2 . Muchos de ellos son aerobios. Los heterótrofos son el grupo nutricional más común e incluye a la mayoría de las bacterias, hongos y protozoarios. Estos obtienen su energía vía oxidación de materia orgánica y los compuestos orgánicos sirven como fuente de carbono y energía.

El fundamento de la degradación de los hidrocarburos en el suelo, por parte de la mayoría de los microorganismos, es que estos toman de su medio todas las sustancias que requieren para sobrevivir, especialmente para la síntesis de sus materiales celulares; y son capaces de degradar una extraordinaria variedad de compuestos orgánicos que pueden usar como principal fuente de carbono y energía. En la naturaleza las bacterias y los hongos son los responsables de oxidar la materia orgánica.

El carbono presente en los sustratos orgánicos entra a la ruta metabólica de obtención de energía y algunos microorganismos pueden usar un sólo compuesto orgánico para cubrir completamente sus necesidades nutricionales, otros en cambio son sumamente versátiles para degradar diferentes compuestos orgánicos y así obtener carbono. Por ejemplo, desde 1970 se sabía que el género de bacterias *Pseudomonas* podía usar por lo menos 90 diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía (Stainer, 1970), sin embargo, en la actualidad se citan más de 100 compuestos orgánicos que pueden ser utilizados para cubrir sus necesidades metabólicas, lo que les confiere una gran importancia en microbiología ambiental para degradar compuestos tóxicos entre ellos los hidrocarburos alifáticos y aromáticos (Timmis, 2002).

Los estudios ambientales han demostrado que existen bacterias o consorcios de microorganismos que de manera natural, pueden degradar contaminantes específicos o una gran variedad de estos. Estos estudios también revelan patrones de degradación esenciales en la vía de desintoxicación y mineralización (Jespersen, 1993). Los consorcios bacterianos quizá son los que juegan el papel más importante en la degradación de contaminantes, porque al ser una asociación de bacterias de

diferentes especies, utilizan distintos compuestos que serán degradados y utilizados mediante una sucesión metabólica.

En los últimos años, la facultad de usar diferentes compuestos orgánicos como fuente de carbono por las bacterias ha sido aprovechada por el hombre para tratar de eliminar del ambiente contaminantes que han producido un especial impacto en el suelo y acuíferos, como los hidrocarburos aromáticos de productos del petróleo (Fenestra y Cherry, 1988). El tratamiento biológico del suelo ha sido un método que ha tomado mucho auge a partir de esta versatilidad de las bacterias y ha sido muy utilizado recientemente para descontaminarlo de residuos del petróleo. Este es considerado como un buen método para tratamiento de suelos contaminados con diesel, gasolina y algunos constituyentes del petróleo crudo y aceite (Jespersen *et al.* 1993).

La biorremediación surge como una tecnología que precisamente hace uso de la capacidad metabólica de los microorganismos para que se lleve a cabo una biodegradación de los hidrocarburos los cuales utilizarán como fuente de carbono; sin embargo también se requiere de un aceptor de electrones y micronutrientes para que se lleve a cabo con éxito la biodegradación. Algunas veces puede ser necesario algún cosustrato para “disparar” la producción de enzimas necesarias para degradar un hidrocarburo, debido a que estas son sintetizadas solamente cuyo está presente la información genética específica para la degradación del sustrato de interés en este caso los hidrocarburos (Gibson y Subramanian, 1984).

Todos los organismos heterótrofos obtienen su energía de las reacciones de óxido-reducción, que son aquellas en donde los electrones son transferidos desde un compuesto que es el donador de electrones o agente reductor a un aceptor de electrones o agente oxidante. Los receptores de electrones pueden ser diferentes dependiendo de las especies microbianas. El oxígeno es el aceptor usado por las bacterias aerobias, mientras que las bacterias anaerobias pueden usar nitratos, sulfatos o CO₂. La vía metabólica preferida para la degradación de hidrocarburos es la aerobia, debido a que los hidrocarburos son compuestos no oxidados (Lim, 1998). Cualquiera que sea la ruta de biodegradación el fósforo y nitrógeno son requeridos como nutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento.

La ruta inicial por la cual los microorganismos comienzan el proceso de obtención de energía es la glicólisis, el cual transforma glucosa y otros azúcares a un intermediario como es el piruvato. Otros compuestos con características química diferentes (aminoácidos y ácidos grasos) tienen diferentes rutas de degradación, pero todas llegan a otro intermediario, acetil CoA. Cuyo el metabolismo es aerobio, se siguen tres rutas degradativas: el ciclo del ácido cítrico, la cadena de transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. La presencia de oxígeno molecular es necesaria para la fosforilación oxidativa que es el mecanismo más importante para la obtención de la energía para la actividad celular. Si el proceso llega hasta la producción de bióxido de carbono, es indicativo de una completa mineralización.

Las fases iniciales de las vías metabólicas son muy variadas, dependiendo del tipo de contaminante metabolizado. Sin embargo, las reacciones se orientan en una dirección tal que sólo se producen unos pocos intermediarios comunes, los cuales son entonces metabolizados por unos cuantos procesos semejantes. Los más comunes de estos intermediarios son el catecol, ácido protocatéquico, y en menos grado el ácido gentisínico. Estos compuestos son de un sólo anillo y son conocidos como sustratos iniciadores debido a que el catabolismo oxidativo se lleva a cabo únicamente después de que las moléculas aromáticas complejas han sido convertidas a formas más simples (Alexyer, 1981). El protocatecato y el catecol continúan su degradación hasta compuestos que pueden incorporarse al ciclo del ácido cítrico, como succinato, acetil-CoA y piruvato (figura 1.6).

El paso inicial para la degradación de los hidrocarburos alifáticos es la oxidación, durante la cual uno de los átomos de la molécula de oxígeno (O_2) se incorpora al hidrocarburo oxidado. Esta reacción es llevada por mono-oxigenasas y el producto final de la secuencia de reacciones es acetil-CoA. La oxidación inicial algunas veces no se realiza en el carbono terminal, sino que ocurre en el carbono β o en el ω por lo tanto las reacciones subsecuentes son diferentes, sin embargo, todas estas reacciones conducirán a la formación de Acetil CoA (figura 1.7). Los hidrocarburos alifáticos insaturados que tienen un doble enlace terminal pueden ser degradados por ciertas bacterias sulfato-reductoras y otras bacterias anaerobias (Lim, 1998).

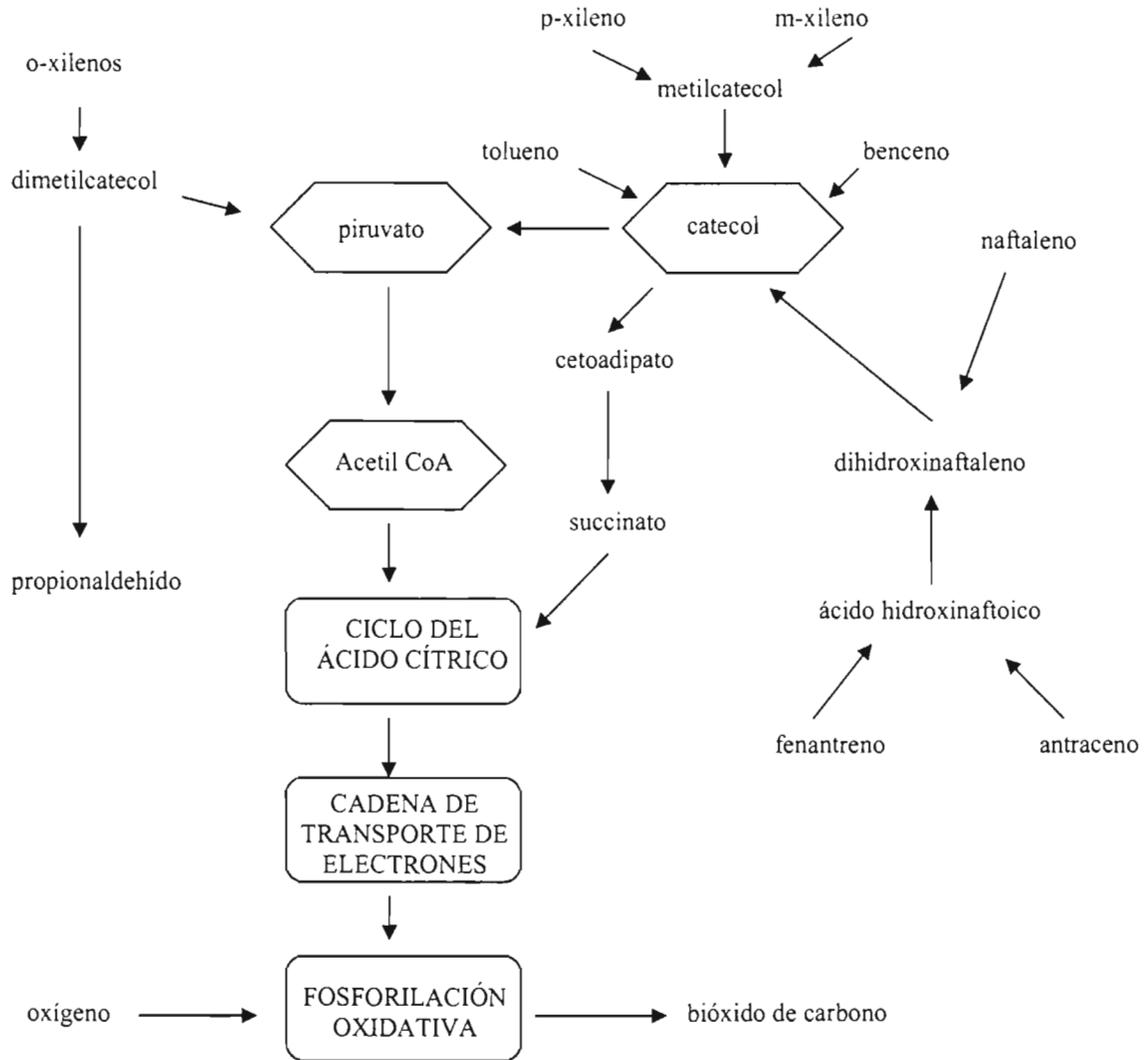


Figura 1.6. Integración de las rutas degradativas de algunos hidrocarburos aromáticos (Saval, 2000)

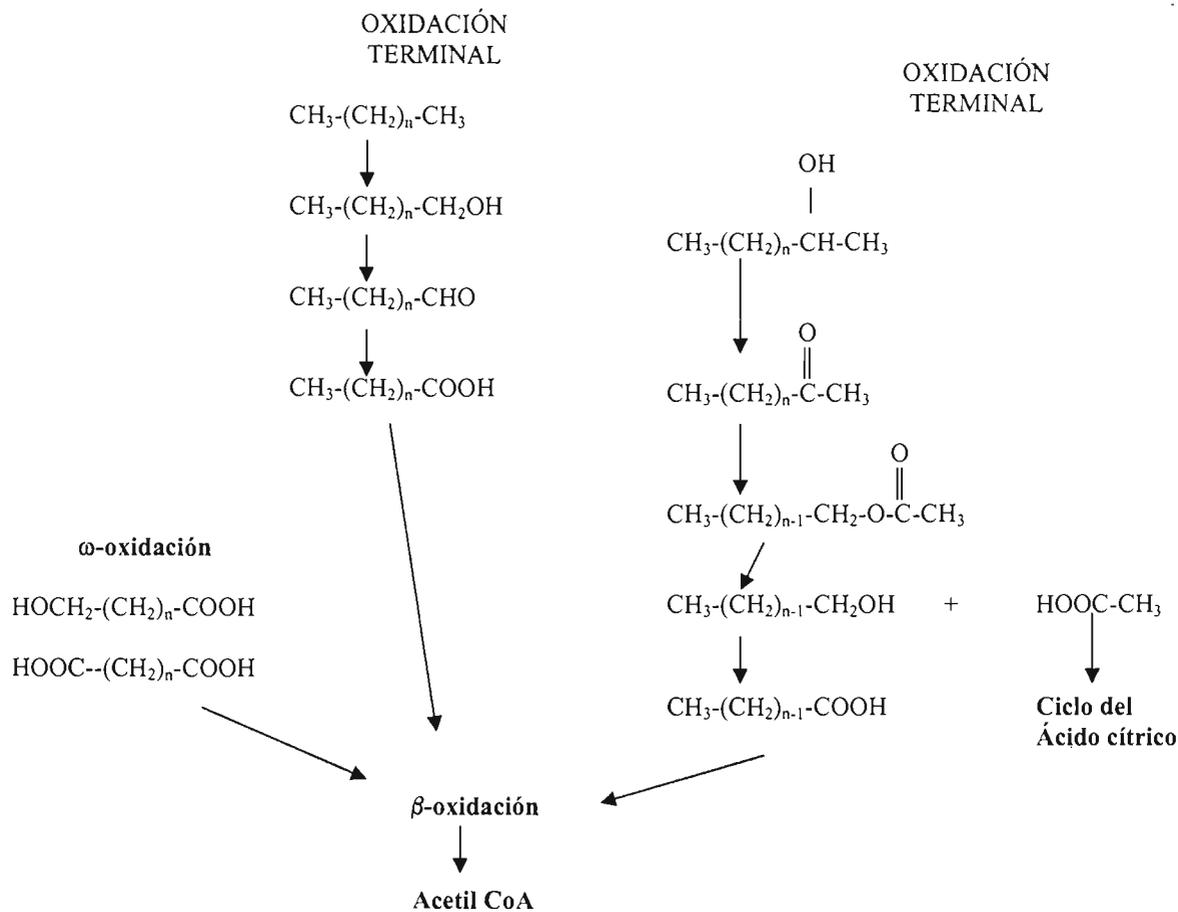


Figura 1.7. Vías metabólicas de n-alcanos (modificado de Britton, 1984)

Muchos hidrocarburos aromáticos pueden ser usados de manera aerobia por bacterias como donadores de electrones, de los cuales las bacterias del género *Pseudomonas* son las más estudiadas. El metabolismo de estos compuestos, frecuentemente se inicia, nuevamente, con la formación de protocatecol o catecol, dependiendo del compuesto. Todos los hidrocarburos aromáticos que se encuentran naturalmente y muchos que son sintetizados pueden ser metabolizados (Alexyer, 1981).

En un estudio realizado con suelo subyacente a canales de aguas residuales (Pérez, 1999), se observó que la concentración de bacterias que pueden mostrar una degradación de hidrocarburos aromáticos fluctúa entre 10^2 y 10^6 ufc/g de suelo dependiendo del microambiente en el cual habitan, además de que otros autores sostienen que algunos pasos del catabolismo de hidrocarburos aromáticos requieren de la acción de oxigenasas (Gibson y Subramanian, 1984; Lim, 1998).

El diesel como ya se mencionó posee una gran cantidad de hidrocarburos poliaromáticos (HPAs), y el primer paso en su degradación microbiológica lo realizan dioxigenasas que incorporan átomos de oxígeno a los átomos de carbono del anillo bencénico resultando en la formación del *cis*-dihidrodiol, el cual sufre una rearomatización por parte de dehidrogenasas para formar intermediarios dihidroxilados. Los intermediarios dihidroxilados subsecuentemente sufren una ruptura en el anillo y forman intermediarios que entran al ciclo del ácido cítrico (Sudip *et al.* 2002). En otras palabras, primero se adiciona un grupo hidroxilo al final de la cadena o dentro del anillo insaturado de los hidrocarburos poliaromáticos, formando un alcohol. La oxidación progresiva lleva a la formación de un aldehído y después a un ácido carboxílico que lleva posteriormente a la producción de dióxido de carbono, agua y biomasa.

Cuando el oxígeno es adicionado a los hidrocarburos, los compuestos se vuelven más polares y por lo tanto más solubles en agua, estos compuestos son más fácilmente biodegradables y por lo tanto menos tóxicos. Aunque los compuestos más polares entran más fácilmente a los cuerpos de agua, como resultado de la biodegradación es poco probable que causen un daño ambiental o efectos tóxicos a la biota cercana, debido a la dilución que alcanzan en el agua (EPA, 1999). Sin embargo, esto dependerá de las concentraciones que alcancen y las condiciones del medio donde se encuentren.

Existen condiciones que pueden disminuir o detener el proceso de biodegradación de compuestos orgánicos en el suelo. Estas condiciones son (Romantschuck *et al.*, 2000):

- Limitada biodegradabilidad de los contaminantes

-
- Baja biodisponibilidad de la fuente de energía y carbono, que deseablemente es el propio contaminante
 - La cantidad de microorganismos degradadores y que dichos organismos expresen suficientemente su actividad catabólica
 - La toxicidad del contaminante (mínima o nula)
 - pH adecuado en el suelo
 - Flujo ilimitado de elementos nutritivos (macronutrientes: N y P; micronutrientes: elementos traza, S) y de aceptores finales de electrones (oxígeno, nitratos, sulfatos)
 - Buena disponibilidad de agua
 - Condiciones de temperatura adecuadas
 - Ausencia de metales pesados que inhiban la actividad microbiana

Recopilaciones hechas por Leahy y Colwell (1990) muestran 25 géneros diferentes de bacterias y 31 de hongos degradadores de hidrocarburos. Entre los principales géneros de bacterias se citan: *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Anthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia* y *Pseudomonas*, mientras que los principales géneros de hongos son: *Aurogebasidium*, *Cyida*, *Rhodotorula* y *Sporobolomyces*. Esos mismos autores observaron que las bacterias participaron en un 82% en la degradación y los hongos con un 13%, esta relación depende del manejo de las condiciones microambientales.

1.5. Técnicas de remediación aplicadas a suelos contaminados con diesel

Las técnicas de remediación, que se aplican a suelos contaminados, se pueden dividir en cuatro grupos según la base de su tratamiento como se menciona a continuación:

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

Químicas: Los contaminantes pueden ser transformados en productos menos peligrosos, por ejemplo precipitación, neutralización, hidrólisis y oxidación química.

Térmicas: En este caso se emplea calor para transformar o separar los contaminantes. La degradación térmica se puede realizar a través de tres diferentes tipos de incineración, las cuales son (EPA, 1996):

- *Incineración por combustión*. Transforma los compuestos químicos por oxidación térmica controlada
- *Tratamiento térmico infrarrojo*. Transforma los materiales orgánicos con luz infrarroja
- *Incineración por pirólisis*. Es un proceso térmico que transforma los materiales orgánicos peligrosos en compuestos gaseosos y residuos sólidos (mezcla de carbón y cenizas), en ausencia de oxígeno

Biológicas: Consisten en la transformación o degradación de contaminantes mediante la acción de microorganismos o especies vegetales muchos de ellos presentes en el suelo. Reciben los nombres de biorremediación y fitorremediación, respectivamente. Esta última incluye la participación de los microorganismos asociados a las raíces de las plantas.

La biorremediación ha surgido como una alternativa viable y de bajo costo para sanear suelos contaminados con hidrocarburos. Se basa en la capacidad metabólica que poseen los microorganismos para transformar los compuestos orgánicos hasta CO₂ y agua.

Dentro de la biorremediación existen varias alternativas de aplicación que a continuación se describen y que son las mismas que se aplicaron en este estudio.

1.5.1. Bioaumentación o bioincremento

Cuyo la población de los microorganismos autóctonos del suelo es muy baja o éstos no tienen la capacidad metabólica para degradar los contaminantes, es necesario adicionar microorganismos exógenos vivos que hayan demostrado tener la capacidad metabólica deseada, con el fin de aumentar la biodegradación de los compuestos. La adición de bacterias exógenas al suelo es llamada bioaumentación o bioincremento (Wise y Trantolo, 1994).

Las características que deben poseer los microorganismos que se inoculan al suelo incluyen: viabilidad, capacidad metabólica para degradar contaminantes, desarrollo rápido, un alto grado y diversidad de actividades enzimáticas y su expresión en el ambiente contaminado, capacidad para competir con los microorganismos nativos, no ser patógenos y no producir metabolitos secundarios tóxicos.

En los últimos años han surgido en el mercado una gran variedad de productos microbianos para la biorremediación que se dice tienen la capacidad para degradar una gran cantidad de contaminantes. Estos productos están patentados y se venden como concentrados en polvo o líquidos. Sin embargo, en campo dichos productos no siempre funcionan, debido principalmente a que se carece del conocimiento de su manejo o los microorganismos no cumplen con las características mencionadas.

Por otra parte, se teme que muchas de las bacterias presentes en los concentrados sean microorganismos manipulados genéticamente (MMG). A pesar de las muchas investigaciones realizadas con MMG en el laboratorio, se conoce muy poco de la sobrevivencia, comportamiento y destino que estos puedan tener en el campo dado que las condiciones son muy diferentes a las que imperan a nivel laboratorio. Por ello, es conveniente evaluar el riesgo que implica su liberación al ambiente y se debe hacer énfasis en considerar los peligros que surgen al poner en contacto con la naturaleza a genes que nunca antes habían estado presentes (Milcic y Saval, 2000).

Para decidir la aplicación de la bioaumentación, previamente es importante saber si la flora nativa no posee la capacidad para degradar los contaminantes, porque de lo contrario la adición de flora exógena no sería necesaria. Asimismo, como cuyo el periodo de destrucción de los compuestos es muy reducida, se justifica la inoculación porque la población bacteriana del lugar puede multiplicarse y destruir los contaminantes, siempre que tenga la capacidad metabólica para hacerlo. Si los tiempos de saneamiento deben de ser cortos porque los hidrocarburos representan un riesgo a la salud o al ambiente, la inoculación de bacterias ayuda a que los tiempos de degradación se reduzcan. Por ejemplo en los trabajos realizados por Guzmán (2001) utilizo bioaumentación, se observó la degradación del diesel en un suelo contaminado, en sólo un mes y medio, lo cual demuestra que los tiempos de eliminación de contaminantes se pueden reducir

notablemente aplico esta técnica. Este fenómeno toma gran importancia cuyo se habla de gryes volúmenes de suelo contaminado a tratar.

La estrategia menos utilizada, a pesar de ser la más atinada, es la de aislar microorganismos del mismo suelo contaminado, cultivarlos en gran escala e inocularlos inmediatamente. Esta estrategia sólo da resultados siempre y cuyo los microorganismos hayan estado en contacto con los contaminantes durante muchos meses o años, porque gracias a esta presión selectiva podrán sintetizar las enzimas necesarias para la degradación. Una vez que han sido sintetizadas las enzimas, las bacterias se pueden aislar y así contar con un cultivo base para reproducirlas a gran escala e inocularlas en forma inmediata al suelo, antes de que pierdan la capacidad de degradar hidrocarburos.

El camino más común para reproducir una población bacteriana capaz de degradar los contaminantes es, obtener una población para su posterior inoculación en un cultivo enriquecido, el cual típicamente se hace con agua que contenga sales inorgánicas necesarias para el crecimiento bacteriano (generalmente fuentes de fósforo y de nitrógeno). La fuente de carbono es el propio contaminante, el pH se mantiene cercano a 7 y el cultivo es incubado en la oscuridad. Cuyo el crecimiento o el consumo de los contaminantes son evidentes, se realiza un subcultivo que se transfiere a un medio nuevo. Este procedimiento puede repetirse por varias ocasiones hasta que se incremente el número de bacterias, la densidad poblacional se comprueba mediante un conteo en placa.

Existen parámetros que afectan negativamente a las poblaciones bacterianas como son la temperatura, el pH y la salinidad. Es común que las bacterias utilizadas sean incubadas de 25 a 37°C. Tales temperaturas sólo se pueden alcanzar en ciertos lugares en condiciones naturales, sin embargo, la realidad es que la mayoría de los ambientes, están a temperaturas significativamente más bajas y además expuestas a la variación cíclica día-noche. Las especies microbianas que se reproducen bien a temperaturas controladas, dejan de multiplicarse a temperaturas diferentes a éstas, por lo que es recomendable que los cultivos bacterianos se desarrollen a la temperatura promedio que prevalece en el sitio de interés. Por otra parte los cultivos enriquecidos se mantienen a un pH cerca de la neutralidad, creciendo solo los microorganismos adaptados a valores cercanos a 7. No obstante los ambientes naturales tienen generalmente valores diferentes

y los microorganismos no son capaces de consumir los compuestos orgánicos simplemente porque el pH es diferente, de aquí que es recomendable mantener el cultivo al pH prevaeciente en el sitio contaminado para así asegurar que las bacterias cultivadas serán capaces de desarrollarse bajo esas condiciones.

Algunos suelos y sedimentos, generalmente de manglares o estuarios, son ricos en sales, en esos casos la salinidad debe mantenerse igual en los cultivos, ya que muy probablemente las bacterias no funcionarán en ambientes con concentraciones diferentes de sales. Como ejemplo de ello está el hecho de que los cultivos aislados de habitats salobres, no degradan en agua dulce o en suelos bajos en sales (Alexyer, 1994).

Inocular con bacterias degradadoras un suelo contaminado, muchas veces no es suficiente para que se lleve a cabo la degradación, ya que los microorganismos requieren de nutrientes esenciales como fósforo, nitrógeno, oxígeno, y posiblemente factores de crecimiento que son menores que la demya en el ambiente al que son introducidas, entonces su crecimiento se vuelve más lento, además de que entran en competencia por los nutrientes con las especies nativas que se encuentran en el suelo (Alexyer, 1994). De aquí parte la importancia de una caracterización previa del suelo.

1.5.2. Bioestimulación

Los hidrocarburos en el suelo pueden estar disponibles como fuente de carbono y energía para los microorganismos autóctonos, sin embargo, la degradación se limita por la escasez de otros nutrimentos básicos como el nitrógeno, fósforo, azufre y oxígeno. Para estimular o aumentar la biodegradación es indispensable la adición de nutrientes exógenos en una forma fácilmente asimilable y que no vayan a causar efectos negativos en el ambiente. Se debe tener mucho cuidado al elegir los fertilizantes a adicionar y observar que estos no sean tóxicos para otros seres vivos.

Cuyo un suelo ha sido contaminado con hidrocarburos, la bioestimulación es viable siempre y cuando los microorganismos autóctonos tengan la capacidad para degradar los contaminantes y únicamente se requiera de la adición de nutrientes para estimular su capacidad metabólica.

Los requerimientos nutricionales para los microorganismos son aproximadamente los mismos que los de su composición celular (tabla 1.5). La estructura química de las bacterias puede ser expresada como $C_5H_7O_2N$, sólo una minoría presenta trazas de otros átomos. El carbono es suministrado por compuestos orgánicos, el hidrógeno y el oxígeno lo obtienen del agua, en cambio nitrógeno, fósforo y azufre generalmente deben ser suministrados a nivel de campo en forma de fertilizantes (tabla 1.6), esta práctica ha tenido mucho éxito.

Tabla 1.5. Composición de la célula microbiana (Coochson, 1995)

Elemento	% de peso seco
Carbono	50
Oxígeno	20
Nitrógeno	14
Hidrógeno	8
Fósforo	3
Azufre	1
Potasio	1
Sodio	1
Calcio	0.5
Magnesio	0.5
Metales	0.2
Otros	0.8

Tabla 1.6. Fuentes exógenas de nitrógeno y fósforo (Cookson, 1995)

Sulfato de amonio
Fosfato de amonio
Fosfato de Sodio
Fosfato monosodico
Urea
Monofosfato de potasio
Sales ortofosfóricas
Ácidos fosfóricos
Sales Polifosfatadas:
Pirofosfato
Tripolifosfato
Trimetafosfato

Un derrame de hidrocarburos representa una enorme cantidad de carbono dentro del ambiente susceptible de ser degradado por acción microbiana. El carbono constituye un componente estructural básico de todos los seres vivos por ello los microorganismos pueden transformar los hidrocarburos, pero requieren más nitrógeno y fósforo de la cantidad que comúnmente se encuentra presente en el suelo, debido a que son esenciales para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, componentes principales de los organismos vivos. El principal reto asociado con la bioestimulación es mantener óptima la concentración de nutrientes, porque de no ser así el crecimiento bacteriano sería limitado (USEPA, 1999). Esta condición esta basada en la ley de Liebig's del mínimo: el constituyente esencial que está presente en cantidades relativamente pequeñas para los requerimientos nutricionales de los microorganismos será el factor limitante para su crecimiento (Cookson, 1995).

Para que sea efectiva la biorremediación por bioestimulación, se requiere que los nutrientes y los microorganismos estén en contacto directo y constante con el material contaminado, con la finalidad de que las bacterias degradadoras soporten la tasa máxima del crecimiento durante el proceso de saneamiento. En suelos contaminados, la técnica de bioestimulación ha sido usada por

años utilizo el mismo principio: mantener un adecuado suministro de nutrientes limitantes y aceptores finales de electrones y asegurar el contacto con las poblaciones de bacterias degradadoras durante todo el tiempo que dure el periodo de tratamiento.

Existen estudios de laboratorio que demuestran un mejoramiento o aumento de la tasa de biodegradación con adición de nutrientes, pero también, existen algunos datos en campo que muestran efectos mínimos. Por ejemplo, en este mismo grupo de trabajo se llevó a cabo un experimento en donde se adicionaron fertilizantes inorgánicos a un suelo contaminado con diesel, los cuales no favorecieron la degradación después de 80 días (Domínguez, 2001), no obstante, en otro experimento al adicionar los fertilizantes inorgánicos a otro suelo contaminado de diferente origen, se favoreció la degradación del diesel y gasolina después de 4 meses (Guzmán, 2001). Dicho fenómeno puede tener sus causas en una inadecuada distribución o aplicación de los nutrientes cuyo se escala a nivel de campo, o quizá se deba a otros parámetros limitantes de la degradación, por ejemplo el oxígeno que aumenta la tasa de biodegradación podría ser un factor limitante (Cookson, 1995).

El aprovechamiento de nutrientes se lleva a cabo de manera óptima en un suelo contaminado, en condiciones en donde existe un adecuado suministro de oxígeno. Este puede ser proporcionado a partir del aire, en forma pura o disuelto en el agua; otra fuente es la adición de agentes químicos que pueden ser convertidos a oxígeno molecular tal como el peróxido de hidrógeno en mínimas cantidades. Al elegir una fuente de oxígeno se debe tomar en cuenta:

- La demya de oxígeno necesaria para la carga de hidrocarburos presentes en el suelo contaminado
- La tasa de degradación de los hidrocarburos para establecer la tasa de consumo de oxígeno
- El método adecuado para suministrar el oxígeno dependiendo de la tasa de transferencia
- El manejo fácil y seguro de las fuentes de oxígeno
- El costo de la fuente de oxígeno y de la forma de suministrarlo

Es importante conocer la demya de oxígeno necesaria para soportar la biodegradación, porque de ello dependerá el tiempo de biorremediación. Una limitación de oxígeno provoca tiempos de

remediación largos, y en caso contrario, un suministro de oxígeno excesivo es innecesario y aumenta los costos. Por tal motivo es importante evaluar siempre el costo-beneficio del sistema contra los tiempos de saneamiento. Por otra parte, de la tasa de consumo de oxígeno para la degradación dependerá el tipo de suministro de oxígeno, el cual puede ser:

- Captación del oxígeno del aire ambiente
- Incorporación del oxígeno del aire ambiente a través de extracción de gases, mediante vacío
- Inyección de aire por difusores o tubos ranurados
- Inyección de peróxido de hidrógeno en dosis controladas
- Inyección de compuestos liberadores de oxígeno, existentes en el mercado

Si el suelo que es tratado es superficial, el oxígeno del aire ambiente llega a una profundidad de 38 a 50 cm (USEPA, 1999) en función del tipo de suelo. El utilizar oxígeno puro aumenta 5 veces más su concentración en el ambiente, pero también los costos aumentan (Coockson, 1995) y esto podría no ser efectivo. Otros factores que deben ser tomados en cuenta en el suministro de oxígeno son la proporción del espacio poroso, el tamaño de los poros y la textura del suelo. Una cantidad excesiva de agua puede disminuir el espacio poroso disponible con la inminente reducción del oxígeno en el suelo (Wise y Trantolo, 1994). Los agentes químicos, en cambio, pueden elevar los costos e implican un riesgo adicional.

Niveles de oxígeno mayores o iguales al 2% son usualmente suficientes para soportar la remediación aerobia. Aunque algunos trabajos recomiendan que el contenido de oxígeno en el suelo sea del 10%, se ha visto que la biodegradación no aumenta significativamente si el oxígeno está por arriba del 2% (Wise y Trantolo, 1994).

1.5.3. Biocomposteo

El composteo es un proceso que se usa para estabilizar los desechos orgánicos, tales como el estiércol, lodos de plantas de tratamiento y desechos municipales. El producto final estabilizado,

llamado composta, es frecuentemente usado como un mejorador para la estructura de suelos arcillosos y/o para aumentar el contenido de materia orgánica, proveer nutrientes a las plantas, aumentar la capacidad de retención de agua en suelos arenosos y para facilitar la reforestación de suelos erosionados.

El composteo es un proceso controlado que aprovecha la actividad microbiana para degradar materiales orgánicos y su producto final es relativamente estable, reducido en volumen y libre de malos olores. Todos los métodos de composteo tienen características similares en el proceso, inicialmente una alta actividad microbiana y la producción de calor creyó condiciones termófilas, es decir, alrededor de 50 °C o más (USEPA, 1998).

En los casos de suelos contaminados que van a ser tratados en biopilas, éstas se cubren para evitar pérdida de calor y humedad, y periódicamente se remueve la capa superficial para favorecer la aireación (Saval, 1995). Generalmente un sistema de biopilas es estático, en ocasiones el suelo contaminado se mezcla con composta, o algún agente abultante, se apila y si tienen una altura mayor a 0.80 m se acondiciona con un sistema de aireación en la parte central. Las emisiones de volátiles se pueden controlar mediante un sistema de captación de gases. La recolección de lixiviados se realiza mediante canales dispuestos alrededor de la pila para posteriormente reincorporarlos a las biopilas (figura 1.8). La técnica de biopilas ha sido muy utilizada en biorremediación para sanear suelos contaminados con hidrocarburos (Wise y Trantolo, 1994).

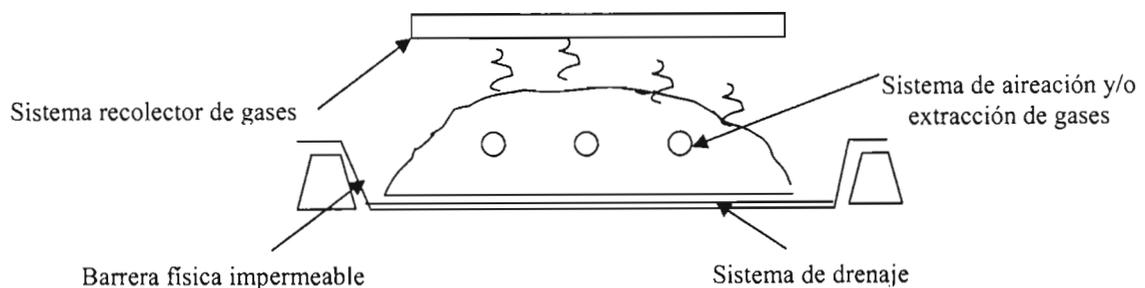


Figura 1.8. Sistema de composteo

La adición de composta a un suelo contaminado puede intensificar la degradación de hidrocarburos, incrementa la biodisponibilidad, retiene ciertos compuestos volátiles y los nutrimentos vegetales que contiene sirven como fertilizante. Por ejemplo, los hidrocarburos volátiles se retienen en la composta evityo así su emisión a la atmósfera, inclusive se ha utilizado para la fabricación de biofiltros. Cole (1998) indica que la adición de composta madura a suelos, generalmente resulta más económica que el composteo mismo.

Existen un gran número de hidrocarburos que se degradan rápidamente durante el composteo o en otros procesos basados en está técnica. También funciona como activador de mecanismos de degradación cometabólica de compuestos complejos, especialmente de hidrocarburos poliaromáticos de alto peso molecular cuyas rutas metabólicas no son aún conocidas (Kästner y Mahro, 1996).

La adición de composta madura al suelo a ser tratado con biolabranza o en biopilas, puede disminuir notablemente los tiempos de saneamiento (Biddlestone y Gray, 1994) debido al incremento de la población bacteriana y de su actividad (Cole, 1994). El aporte de nutrientes como nitrógeno y fósforo que van implícitos en la composta contribuyen en gran medida a la degradación de los hidrocarburos. Kästner *et al.* (1996) y Domínguez (2001) demostraron en estudios realizados con suelos contaminados con diesel que la actividad biológica de la composta favorece la degradación de los hidrocarburos.

La biorremediación por medio de la adición de composta es una de las técnicas más baratas, comparada con otras técnicas que implica la incineración y la solidificación. (USEPA, 1998).

1.5.4. Atenuación natural

Los suelos que han permanecido contaminados durante varios meses o incluso años, poseen bacterias capaces de multiplicarse y metabolizar muchas clases de hidrocarburos, de aquí que la persistencia de contaminantes biodegradables, no es consecuencia de la ausencia de organismos, sino que las condiciones no son adecuadas para que las especies nativas puedan actuar sobre

ellos. También debe considerarse que la producción de enzimas degradadoras o la expresión de los genes para su síntesis, pueden tomar mucho tiempo.

La atenuación natural en los suelos de la zona no-saturada, involucra una interacción muy compleja entre las propiedades químicas, físicas y biológicas del sitio y de los contaminantes. Requiere de una evaluación detallada de las características del sitio, como son la geología, química del suelo, microbiología, incluyendo la densidad poblacional microbiana, capacidad metabólica para la degradación de contaminantes y tasas de degradación; además de las características de los contaminantes, como son: toxicidad, volatilidad y degradabilidad, los cuales se evalúan por medio de estudios de biotratabilidad.

Los mecanismos de atenuación natural son aquellos que reducen la concentración y la movilidad de los contaminantes por adsorción, o bien, cambian los contaminantes a formas menos peligrosas. En este caso, la biodegradación juega un papel importante en la transformación de compuestos orgánicos.

La viabilidad de la atenuación natural depende de las interrelaciones entre los contaminantes y los factores que afectan su movilidad, así como su degradación.

Los contaminantes en la zona no-saturada pueden estar presentes en el agua intersticial, prácticamente absorbida y su movilidad varía de acuerdo con sus características fisicoquímicas, el tipo de suelo, existencia de infiltraciones desde la superficie y otros factores asociados. Si la movilidad de los contaminantes es baja, de modo que no representa un riesgo a los receptores, entonces se pueden aplicar otros mecanismos de atenuación para reducir la concentración de contaminantes o bajar sus niveles, y después permitir que la atenuación natural continúe la remediación. La movilidad de contaminantes se puede estimar mediante modelos matemáticos aplicables a la zona no-saturada.

Las características óptimas de suelos y sedimentos para que se lleve a cabo una remediación por atenuación natural, son aquellas que favorecen las condiciones aerobias en el lugar, ya que en la zona no-saturada éste es el proceso más importante.

Como ya se mencionó anteriormente, todos los organismos heterótrofos obtienen su energía de las reacciones en donde los electrones son transferidos desde un compuesto donador de electrones (agente reductor) a un aceptor de electrones (agente oxidante). Los microorganismos catalizan muchas de las reacciones de oxido-reducción que se llevan a cabo en la naturaleza y juegan un papel importante al mantener el balance de electrones en los ecosistemas. Para que un contaminante pueda ser utilizado en las reacciones redox, debe de ser capaz de servir como un donador o aceptor de electrones y esto dependerá de sus características químicas. Por ejemplo muchos compuestos orgánicos halogenados pueden ser relativamente más oxidados que sus formas no halogenadas. Los compuestos halogenados pueden competir con otros aceptores de electrones fisiológicos y ser incorporados dentro del ciclo de energía microbiano.

Muchos compuestos orgánicos encontrados en el petróleo crudo y en los combustibles refinados del petróleo se degradan utilizo al oxígeno como aceptor de electrones (respiración aerobia). No obstante, en investigaciones recientes se ha demostrado que la biodegradación de muchos compuestos aromáticos comunes en dichos hidrocarburos pueden ocurrir en condiciones anaerobias, no solamente usyo NO_3^- como aceptor de electrones, sino también SO_4^{2-} y Fe^{+3} (Godsy, 1994).

El potencial redox (E_h) es muy importante en la biotransformación de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Usualmente en los sitios altamente contaminados prevalecen condiciones anóxicas porque la respiración de las bacterias ha agotado todo el oxígeno disponible en el lugar. Las condiciones anóxicas favorecen la existencia de otros aceptores de electrones, y los compuestos más oxidados (alto E_h) comienzan a utilizarse primero. El resultado es la utilización del nitrato (NO_3^-) después del agotamiento del oxígeno, seguida de la del hierro (Fe^{3+}), posteriormente la del sulfato (SO_4^{2-}) y finalmente la reducción del CO_2 a metano. Como resultado de esta sucesión de aceptores de electrones las poblaciones bacterianas tienen variaciones en los valores de potencial redox para la degradación (Godsy, 1994).

Un potencial oxido-reducción (redox) de 400 a 800 mV indica oxígeno abundante, pero si es menor a 100 mV será necesario suministrar oxígeno, 50 mV es considerado el mínimo para la oxidación en condiciones aerobias. En algunos suelos, el color puede ser indicativo de las

condiciones redox: los suelos de color rojo, amarillo o café indican condiciones oxidantes, los de color gris o azul indican condiciones reductoras y los suelos de aspecto moteado indican una variabilidad espacial de las condiciones redox.

Debido a que la transferencia del ion hidrógeno está comúnmente ligada con el transporte de electrones, el pH y el potencial redox son interdependientes. El pH del suelo es un parámetro que además influye en gran manera en la actividad biológica, disponibilidad de nutrientes y comportamiento de algunos contaminantes. Generalmente un pH de 5 a 9 es aceptable para la biorremediación.

El contenido de agua es otro parámetro que está estrechamente ligado a la actividad biológica, si este es bajo, la actividad biológica también lo será, debido a que el agua está directamente relacionada con la solubilidad de los nutrientes, las reacciones metabólicas con los contaminantes y por lo tanto con las funciones básicas de las células microbianas.

Para conocer la disponibilidad de agua en el suelo se realizan determinaciones como *Capacidad de Campo* (CC) y *Punto de Marchitez Permanente* (PMP). Estos valores se obtienen al someter una muestra de suelo a presiones de 1/3 de bar y 15 bares, respectivamente y posteriormente medir el porcentaje de humedad retenido. La CC es la máxima cantidad de agua que el suelo puede retener después que el suelo ha drenado y la óptima en biorremediación es entre 50 y 80%, en función del tipo de suelo. El PMP representa el nivel de humedad en que las plantas no pueden absorber más agua desde el suelo y este valor es más utilizado en agronomía. La diferencia entre los porcentajes retenidos a estas dos presiones nos indica el porcentaje de *Humedad Aprovechable* (HA) de un suelo en particular.

El agua se puede retener en el suelo gracias a los enlaces de hidrógeno formados entre sus moléculas y sus minerales. También existen fuerzas como la de la presión osmótica que intervienen para que el agua del suelo posea diferentes energías potenciales. Estas diferencias de estados de energía se expresan como potencial de agua y son expresadas con unidades de energía por unidad de agua, es decir, si la cantidad de agua es masa entonces el potencial es expresado como J/kg. Un valor potencial positivo indica que el suelo está saturado y que el agua drenará espontáneamente. Si el suelo no está saturado entonces el potencial es negativo y se tendrá que

realizar trabajo para mover el agua (Wise y Trantolo, 1994). En los últimos años se ha hecho más énfasis en medir la cantidad de agua en el suelo por medio del potencial de agua, ya que la información obtenida de este valor es más precisa para conocer la cantidad de agua disponible.

Otra manera de medir la cantidad máxima de agua que puede retener un suelo es por una simple determinación de humedad, la cual es igual a su porosidad que generalmente es del 40%, sin embargo, esto puede variar según la textura del suelo (Wise y Trantolo, 1994).

Como ya se mencionó con más detalle en el apartado de bioestimulación, los microorganismos requieren nutrientes básicos o esenciales como el fósforo y el nitrógeno para su actividad metabólica. Según USEPA (1996), el intervalo de nutrientes óptimo para la atenuación natural es de 150 a 200 ppm nitrógeno y 25 a 35 ppm de fósforo; aunque también se maneja una relación de C:N:P de 120-300:10:1. Estas proporciones se basan en las relaciones de estos elementos en el interior de las células.

Los microorganismos incorporan a sus estructuras celulares el carbono de los contaminantes junto con el nitrógeno y fósforo inorgánicos del suelo. La mayor parte de los nutrientes existe en materiales minerales y orgánicos y son aprovechables hasta que son sometidos a la intemperización o la descomposición microbiana (Foth, 1980).

La temperatura es otro parámetro que está fuertemente relacionado con la actividad microbiana y las tasas de biodegradación. Generalmente las tasas de actividad enzimática son óptimas desde los 10 °C hasta alcanzar temperaturas de inhibición las cuales son de 40 a 50 °C para la mayoría de las bacterias (Godsy, 1994). Para atenuación natural, la biodegradación esencialmente es nula a los 0 °C y las tasas de degradación más altas se registran entre los 20 y 25 °C (USEPA, 1996).

La atenuación natural es un proceso que se lleva a cabo cuando los microorganismos del suelo han estado en contacto con los contaminantes durante mucho tiempo y contienen la información para llevar cabo la degradación (Milcic-Terzic *et al.* 2000). Una vez que han sido sintetizadas las enzimas que intervienen en el proceso de degradación, las bacterias son capaces metabólicamente de usar los contaminantes para cubrir sus necesidades fisiológicas, de no ser así, las bacterias

podrían ser solamente tolerantes a los niveles de contaminación, sin que necesariamente utilicen los contaminantes para incorporarlos a sus ciclos de obtención de energía.

1.6. Técnicas de saneamiento más utilizadas en México y marco legal y normativo aplicable

Las actividades de remediación de suelos contaminados con residuos peligrosos en México por myato de las autoridades ambientales federales se iniciaron al comienzo de la década de 1990 en respuesta a situaciones que ocasionaron protestas públicas y presión hacia el gobierno para que se dictaran medidas al respecto, principalmente en sitios contaminados con hidrocarburos y metales pesados. En 1998 aparecieron los “Criterios Interinos de Limpieza” establecidos por la Procuraduría de Protección al Ambiente (PROFEPA), pero carecían de valor legal. Fue hasta el 2002 que se publicó la Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-138-ECOL-2002, la cual tuvo como objetivo principal establecer los límites máximos permisibles de contaminación en suelos. Dicha norma se apoyó en las modificaciones hechas a la Ley General de Protección al Ambiente y Equilibrio Ecológico la cual obliga a reparar el daño ambiental mediante la publicación de los siguientes apartados:

- La realización de obras públicas o privadas que por sí mismas puedan provocar deterioro severo de los suelos, deben incluir acciones equivalentes de regeneración y restablecimiento de su vocación natural.
- Quien realice obras o actividades que afecten o puedan afectar el ambiente está obligado a prevenir, minimizar o revertir la contaminación y daños que cause al suelo, por acumulación, depósito o infiltración de materiales, residuos peligrosos e hidrocarburos, así como asumir los costos que dicha afectación implique.

La norma mencionada por tener carácter de emergencia tuvo únicamente vigencia de un año, concluyendo el 19 de agosto del 2003, siendo sustituida por la PROY-NOM-138-SEMARNAT-2003, que se publicó en Marzo del 2004 para consulta pública. El 30 de marzo del 2005 se publicó en el diario oficial de la federación la NOM-138-SEMARNAT/SSA-2003, la cual se

pretende sea el documento oficial definitivo para todos los trabajos de caracterización y remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

La SEMARNAT en el 2004 publicó un documento que describe los procesos de restauración de suelos contaminados con materiales peligrosos (SEMARNAT, 2004). En dicho documento *“se definen las tecnologías de restauración/tratamiento con operaciones y procesos unitarios que se aplican a suelos contaminados para alterar la composición de la sustancia peligrosa o contaminante por medios químicos, biológicos y físicos, con objeto de ajustarse a los límites máximos permisibles establecidos en la normatividad vigente. Cada suelo a tratar representa un caso, no obstante pueden analizarse en base a características fundamentales que proporcionan soluciones efectivas”*. Además plantea que los procesos de restauración/tratamiento dependen de cuatro consideraciones generales, las cuales son:

1. Contaminante: El tipo de contaminante y sus características físicas y químicas determinan si un suelo requiere ser restaurado o no y la manera en la que el contaminante debe tratarse. Además dichas propiedades determinan el movimiento del contaminante y si éste es o no persistente en el ambiente.
2. Tipo de suelo: Las características naturales del suelo a menudo determinan las particularidades de los procesos de tratamiento. Los componentes del mismo tales como arcilla, arenas, gravas y rocas entre otras, intervienen en la selección del tipo de tecnología.
3. Localización y uso de suelo: Estos factores fundamentalmente inciden en la meta de limpieza y los métodos que pueden emplearse para alcanzarla. Es importante describir en forma detallada los siguientes aspectos; ubicación geográfica y uso del suelo, origen de la contaminación, magnitud y distribución de la pluma del o los contaminantes, acceso al sitio, ubicación de asentamientos humanos, cuerpos de agua, características topográficas, hidrológicas, hidrogeológicas, geológicas, edafológicas y clima.
4. Selección de la tecnología: Las tecnologías de restauración pueden actuar disminuyendo la concentración del contaminante, separarlo del suelo o transformarlo el

contaminante. El uso de alguna tecnología en particular depende además de los factores mencionados, de su disponibilidad, fiabilidad, estado de desarrollo y de su costo.

Debido a la gran diversidad de alternativas que existen para el saneamiento de suelos contaminados es importante evaluar y analizar las diferentes tecnologías que pueden aplicarse. Roldan (2001) menciona que la autoridad ambiental lleva un Registro de Restauraciones en donde se incluyen las siguientes técnicas:

- Excavación y confinamiento
- Extracción de vapores
- Lavado de suelos
- Tratamiento térmico (desorción, incineración y pozos térmicos)
- Neutralización
- Oxidación
- Ozonación
- Estabilización/solidificación
- Biolabranza
- Bioestimulación/degradación
- Biopilas

En México operan desde hace varios años una gran cantidad de empresas prestadoras de servicios que ofrecen diferentes tecnologías para restaurar suelos contaminados. Sin embargo, fue a partir de 1997 que las Autoridades Ambientales en turno establecieron un programa de verificación de este tipo de empresas, de las cuales se formó un registro de prestadores de servicios (SEMARNAT, 2004).

La SEMARNAT (2004) reportó cifras que muestran la preferencia de aplicación de los diferentes tipos de tecnologías donde resalta que los tratamientos biológicos ocupan el primer lugar de importancia (figura 1.9).

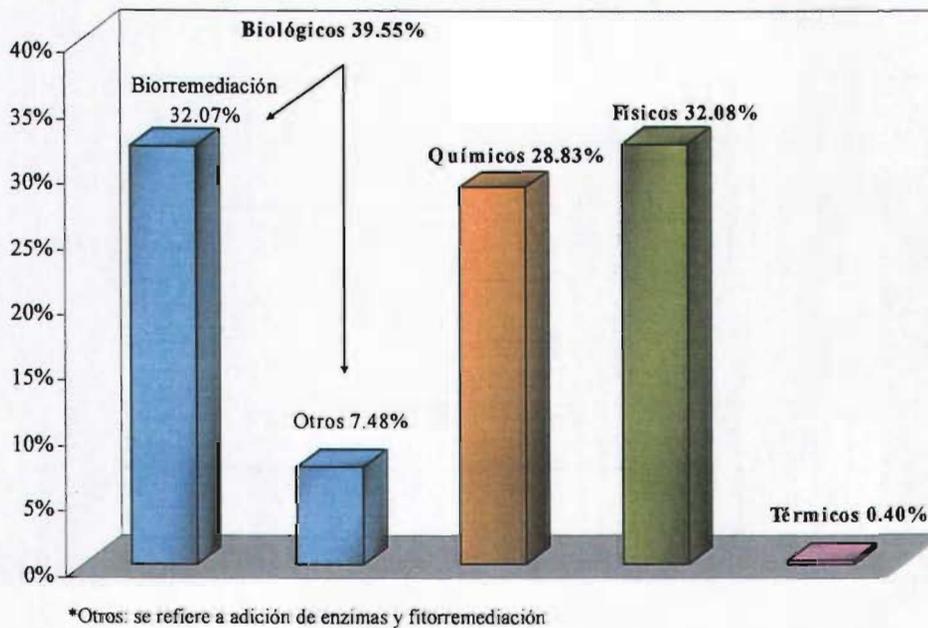


Figura 1.9. Tipo de tratamientos utilizados para el saneamiento de suelos contaminados en México

De acuerdo con los criterios de la SEMARNAT (2004) las tecnologías de restauración se clasifican en los siguientes grupos:

1. Por la estrategia de restauración
 - Destrucción o alteración de la estructura química de los contaminantes
 - Extracción o separación. Los contaminantes se extraen y/o separan aprovechando sus propiedades físicas o químicas
 - Aislamiento o inmovilización de contaminantes

2. Por el lugar de aplicación
 - Tratamiento *in situ* (en el sitio). La tecnología se aplica en el mismo sitio contaminado, no se requiere excavación
 - Tratamiento *on site*. Se aplica cuando el suelo contaminado se excava y se traslada a un lado de la excavación

-
- Tratamiento ex situ (fuera del sitio). La operación se realiza fuera del sitio contaminado. Se aplica cuyo el suelo contaminado se excava y se transporta a una instalación fija y distante para ser sometido a tratamiento.

3. Por el tipo de tratamiento

- Biológicos
- Físicos
- Químicos
- Térmicos

La legislación en materia de contaminación de suelos en México ha sido un gran avance para la aplicación de las acciones correctivas y reparar los daños causados por derrames de hidrocarburos. Debido a esto, se han tratado de implementar algunas técnicas de biorremediación de manera rápida, sin saber en su mayoría si la técnica funcionará, debido a la falta de estudios previos en laboratorio y a escala de demostración en campo. Esto a su vez ha llevado a aplicar simultáneamente varias técnicas en el mismo suelo, gastando más recursos sin tener la certeza de saber cuál de ellas es la más eficiente.

1.7. Estudios de Biotratibilidad

Antes de aplicar en campo una técnica de biorremediación es conveniente llevar a cabo estudios de biotratibilidad a escala de laboratorio o de demostración en campo, los cuales tienen como finalidad determinar uno o varios de los aspectos observados en la tabla 1.7.

Existen dos factores que determinan el programa a seguir y que dependen entre sí. Uno es el objetivo del estudio de biotratibilidad y el otro es la planeación del diseño experimental. Es muy importante determinar si el objetivo se establece para obtener información básica o para simular todo o parte del programa de campo.

Tabla 1.7. Objetivos típicos de los estudios de biotratibilidad en biorremediación

- El potencial que tienen los microorganismos nativos para degradar los contaminantes
- La necesidad de nutrientes específicos
- Los niveles máximos de limpieza que se pueden alcanzar
- La detección de algún compuesto tóxico que pueda inhibir la actividad microbiana
- Las condiciones microambientales óptimas para la biorremediación
- La factibilidad del proceso en general
- Evaluar la capacidad de los microorganismos nativos para degradar compuestos específicos
- Evaluar la capacidad de microorganismos exógenos
- Evaluar el intervalo óptimo de los principales parámetros ambientales: humedad, pH y nutrientes
- Evaluar la necesidad y efecto de los sustratos suplementarios y aceptores de electrones
- Determinar la alimentación y periodos de ayuno para sustratos primarios
- Evaluar la necesidad de proveer donadores de electrones complementarios
- Evaluar la tasa de degradación de compuestos específicos en condiciones de laboratorio o modificar para imitar las condiciones de campo
- Evaluar la duración del proyecto de biorremediación
- Determinar los niveles de limpieza a alcanzar en el sitio
- Evaluar los posibles cambios de toxicidad cuyo se mezclan agentes químicos ajenos
- Evaluar el grado de volatilización
- Determinar el costo-beneficio del proceso de optimización
- Evaluar la frecuencia del monitoreo para el control del proceso
- Evaluar los límites de operación en el proceso
- Los criterios de diseño para el proceso a escala real
- Los costos de operación del proceso
- La optimización del proceso, los parámetros de control y sus limitantes
- La estrategia y el equipo a utilizar a escala real
- El comportamiento del proceso en campo y el destino final de los contaminantes
- Los posibles problemas en el proceso

Una vez establecidos los objetivos del estudio de biotratibilidad, se deben definir las estrategias para diseñar los experimentos, para lo cual se deben considerar:

- Los objetivos del cliente

- Los aspectos legales, normativos y regulatorios
- Los riesgos implicados en la contaminación
- Elementos del ambiente involucrados en el propio sitio contaminado
- El grado de flexibilidad en los tiempos programados
- El grado de flexibilidad del presupuesto programado
- La confidencialidad del estudio
- La viabilidad de desarrollar el experimento en condiciones de laboratorio para después llevar a escala de campo
- Establecer si los datos serán colectados para que sean estadísticamente significativos y el modelo que se aplicará para comprobarlo
- Los protocolos analíticos aplicados para la obtención de datos

Los estudios de biotratibilidad pueden ser realizados en una sola etapa o ser divididos en dos o más etapas, con la desventaja de que entre más etapas tenga, mayor será el tiempo invertido. Cuyo un estudio es conducido por petición de algún cliente, el programa de biotratibilidad se compone de una sola fase debido a la eficiencia, costos y tiempo que se deben de emplear. Sin embargo, cada situación es única para las necesidades de cada cliente y para cada sitio. El objetivo es diseñar el mejor programa de estudio de biotratibilidad, proveer de los datos esenciales para el éxito del proyecto y operación; así como mantener el programa y presupuesto.

Las pruebas de biotratibilidad son necesarias para conocer cuales son las posibilidades de aplicar una técnica de biorremediación en un suelo en particular porque pocos, o si no es que ningún sitio contaminado es idéntico a otro, por lo tanto las estrategias por aplicar deben ser distintas.

En cuanto a los tiempos, los estudios de biotratibilidad que se realizan a nivel de laboratorio, pueden durar desde una semana, para obtener información del potencial de biodegradación; pero los estudios piloto operados en campo en el mismo sitio contaminado, o en reactores; considero diseño, costos y desarrollo del estudio pueden durar varios meses de operación.

Existen en la actualidad muchas alternativas de biorremediación que son aplicadas al mismo tiempo en un mismo suelo y por lo tanto no se sabe con exactitud su contribución de manera

particular al saneamiento del lugar, por esto es necesario aplicar estudios de biotratibilidad que pueden tener varios objetivos experimentales con pruebas específicas diseñadas para alcanzar cada objetivo. Si la habilidad del sistema biológico para degradar los contaminantes o los límites de limpieza que pueden alcanzar son desconocidos, es recomendable evaluar cada una de las alternativas biológicas por aplicar (Cookson, 1994).

Muchas variables deben tomar en cuenta en un proyecto de biorremediación, algunas no solo están en función de los contaminantes, sino que también de la variabilidad genética de las especies microbianas. Es por esto que es necesario conocer la capacidad de degradación de los microorganismos, que depende a su vez, de las características del suelo. La capacidad degradadora de los microorganismos se realiza mediante estudios de cinéticas de biodegradación del contaminante. Así, los estudios de biotratibilidad proporcionan información valiosa para ahorrar recursos y optimizar tiempos que serán requeridos para una escala mayor.

1.8. Pruebas de demostración en campo

En biorremediación es necesario llevar los estudios de laboratorio a nivel de campo para evaluar el desarrollo de los microorganismos en condiciones reales y conocer las limitaciones, o extrapolar las consecuencias en la complejidad ecológica de un ambiente natural. En 1980 los Estados Unidos de Norte América encaminaron sus investigaciones en biorremediación a los contaminantes implicados en los sitios contaminados y su comportamiento, a través del Superfund Program, el cual tuvo entre otras funciones localizar, investigar y limpiar los sitios contaminados.

La base de datos del Superfund reveló que los hidrocarburos derivados del petróleo son las sustancias más comunmente encontradas, seguidas por los preservadores de la madera. De los sitios que conformaron la Lista Nacional de Prioridades (NPL), el 20% están contaminados con hidrocarburos. Asimismo, se establece que el suelo y los acuíferos son los recursos más frecuentemente tratados con tecnologías de biorremediación. Los sitios contaminados son sometidos a distintos tratamientos entre los cuales los más comunes son la biolabranza, el bioviento, uso de biorreactores, bioestimulación o la combinación de otras (EPA, 2004)).

Entre los aciertos que tuvo el Superfund en Estados Unidos fue el de probar a nivel de campo las tecnologías de remediación que se desarrollaron para suelos. En 1999 de todas las pruebas que se demostraron en campo el 15.06% correspondieron a tecnologías de biorremediación (EPA, 2004). Los sitios se distribuyeron principalmente en la zona 9 (California y Nevada), seguido de la zona 5 (Minnesota, Wisconsin, Michigan, Ohio, Indiana e Illinois).

Las pruebas de biorremediación en campo pueden incluir métodos microbiológicos, moleculares y ecológicos estableciendo su evaluación de riesgo y programa de monitoreo correspondientes. Las investigaciones de riesgo en campo adquieren mayor importancia cuando se pretende trabajar con organismos manipulados genéticamente, porque será necesario monitorear su persistencia y movilidad en el ambiente, su estabilidad genética, transferencia de genes, su efectividad ante la comunidad microbiana nativa del suelo y efectos en el ecosistema como resultado de las interacciones con otros organismos (Sikdar y Irvine, 1998).

1.9. Adición de agentes tensoactivos

Existen productos químicos que promueven la formación de agregados coloidales en solución en concentraciones molares muy bajas. A estos materiales se les ha dado el nombre general de agentes de superficie activa o tensoactivos, llamados también surfactantes (SEINET-FQ, 2003).

Un agente tensoactivo es una molécula que consta de una porción hidrofóbica (insoluble en agua) unida a una parte hidrofílica (soluble en agua), la cual puede ser de naturaleza aniónica, catiónica o no iónica. Dada la naturaleza bipolar de dichas moléculas, los agentes tensoactivos tienden a congregarse entre dos fases inmiscibles separadas por una tensión superficial particular. Estos compuestos tienen la capacidad de alterar las propiedades del fluido en las interfases.

La parte hidrofóbica tiene una cadena de hidrocarburos que contiene doce o más átomos de carbono y sus fuentes son normalmente grasas y aceites naturales, fracciones del petróleo, polímeros sintéticos o alcoholes sintéticos de un peso molecular relativamente alto, mientras que la parte hidrofílica es iónica o polar. Los surfactantes incrementan drásticamente la solubilidad de

los contaminantes orgánicos hidrofóbicos y/o pueden aumentar significativamente la movilidad de los contaminantes reduciendo la tensión superficial entre estos y el agua, debido a que el contaminante se agrega dentro del núcleo hidrofóbico de las micelas del surfactante (Orantes, 2002).

Los agentes surfactantes se clasifican según su disociación electrolítica y la carga que presenta el ión tensoactivo como sigue (SEINET-FQ, 2003):

Tensoactivo iónico. Se disocia fácilmente en agua, a su vez éstos se clasifican en aniónicos y catiónicos. Los aniónicos reciben su nombre porque el extremo polar de la molécula es un anión. Están constituidos por una cadena alquílica lineal o ramificada que consta generalmente de 10 a 14 átomos de carbono. En cambio, los surfactantes catiónicos son compuestos cuaternarios de amonio, o una amina grasa en medio ácido.

Tensoactivo no iónico. Se disuelven pero no se disocian en agua. Esta clase de surfactantes posee propiedades hidrófilas que dependen de los grupos polifuncionales que forman enlaces de puente de hidrógeno. Los surfactantes no iónicos son el resultado de la agregación de una o varias moléculas de óxido de etileno a un alcohol graso, o al fenol.

Tensoactivo anfotérico. Estos actúan dependiendo del medio en que se encuentren, en medio básico son aniónicos y en medio ácido son catiónicos.

La biodegradabilidad de una sustancia es la susceptibilidad a ser descompuesta por microorganismos, más específicamente, es la velocidad a la cual las bacterias y/o factores naturales del ambiente pueden descomponerla químicamente.

Un tensoactivo puede ser altamente biodegradable según la constitución química de su ramificación. Si tiene una ramificación demasiado larga con terminación química de tipo alquílica (isoalquilos), puede ser tan biodegradable como los conocidos productos derivados de los alquilos normales o alcoholes grasos lineales sulfonados (Cueroamérica, 2003).

Según la EPA (1999) en los últimos años los surfactantes han sido utilizados intensamente como dispersantes en derrames de hidrocarburos para descontaminación de suelos y acuíferos, por ejemplo en el lavado de suelos (*washing soil*), inyección y extracción (*flushing soil*), para emulsionar los hidrocarburos con el agua. Sin embargo, la investigación sobre las consecuencias de su aplicación en el ambiente es escasa, por lo que es recomendable tener precaución con el tipo de tensoactivo a utilizar y su cantidad.

1.10. Tratamiento en biopilas

El tratamiento de suelo en biopilas constituye una técnica de biorremediación *fuera del sitio* y se refiere al apilamiento del material para ser adicionado con microorganismos, nutrientes, agua y/o aire. Las biopilas generalmente son estáticas con instalación de tuberías intermedias para aireación cuyo tienen una altura superior a 0.80 m, pero también se puede voltear el suelo mecánicamente, o bien adicionar agentes abultantes, como fibra de coco, aserrín o algún otro material orgánico, según sea necesario. Si el material orgánico es adicionado, entonces se le llama biocomposteo (Jorgensen *et al.*, 2000).

Las biopilas son conocidas también como biomontículos, esta tecnología se ha demostrado exitosamente en campo para la degradación de hidrocarburos, clorofenoles y compuestos nitroaromáticos (Jorgensen *et al.*, 2000).

Para evitar el paso de lixiviados al suelo superficial limpio, o al subsuelo, las biopilas se deben construir sobre una capa impermeable y se deben acondicionar colectores que capturen los lixiviados para que estos puedan ser tratados en un reactor o reincorporados a la biopila. Los parámetros que deben controlarse para aumentar la biodegradación son: humedad, nutrientes esenciales (nitrógeno, fósforo), oxígeno y pH. El tiempo de operación de las biopilas puede ser de 6 meses a 2 años aproximadamente (Cookson, 1997) en función del tipo de contaminante y de su concentración inicial de contaminantes.

Los compuestos volátiles (COV's) tienden a volatilizarse durante el proceso de degradación, por lo que, si la gasolina es el producto contaminante su degradación microbiana será menos perceptible (Roldán, 2001), en cambio, con el diesel que contiene un menor porcentaje de compuestos volátiles, su biodegradación es más significativa que su volatilización (Siebe, 1998; EPA, 1994). Dependiendo de las regulaciones existentes para las emisiones a la atmósfera de COVs, se puede instalar un sistema de control de emisiones.

Una vez construidas las biopilas, es recomendable cubrirlas con un plástico para evitar la volatilización de los hidrocarburos de menor peso molecular, la pérdida de calor y humedad, así como para protegerlas de la erosión por viento o la lluvia.

La altura de la biopila puede variar entre 0.8 y 3.0 m, aunque por lo general se construyen de 1.5, ya que a alturas mayores no se asegura una buena aireación. Para el largo y ancho de la biopila no existe restricción, a menos que la aireación se haga por volteo mecánico, el ancho de la pila no debe ser mayor a 2.4 m (Cookson, 1997).

La técnica de biopilas también presenta limitantes, por lo que éstas se deben de evaluar antes de proceder a su aplicación; así como las ventajas y las desventajas (tabla 1.8) que presentan a comparación de otras tecnologías *fuera del sitio*.

Tabla 1.8. Ventajas y desventajas del uso de las biopilas (USEPA, 1994).

Ventajas	Desventajas
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Relativamente simple de diseñar e implementar ❖ Tiempos de tratamiento cortos: de 6 meses a 2 años en condiciones óptimas ❖ Costos competitivos ❖ Efectiva para compuestos orgánicos con tasas de biodegradación bajas ❖ Requiere de áreas menores que una biolabranza ❖ Puede ser diseñado como un sistema cerrado y controlar las emisiones de gases ❖ Puede adaptarse y ser efectivo para muchos sitios y productos del petróleo 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ No pueden ser eficientes con altas concentraciones de contaminantes (mayores a 50,000 mg/kg) ❖ Eficiencias mayores al 95% son difíciles de alcanzar ❖ Presencia o concentraciones altas de metales pesados (mayores a 2,500 mg/kg) pueden inhibir el crecimiento microbiano ❖ Los constituyentes volátiles tienden a volatilizarse involuntariamente ❖ La generación de gases en caso de aireación puede requerir de su tratamiento antes de descarga a la atmósfera ❖ Puede requerir de un sistema de tratamiento para lixiviados ❖ No pueden ser aplicadas cuyo el suelo tiene baja permeabilidad

Según la USEPA (1994), la tecnología de biopilas puede aplicarse tomyo en cuenta; que el suelo esté contaminado con hidrocarburos, que la concentración de compuestos clorados y/o recalcitrantes sea mínima o nula, que la concentración de metales pesados sea menor a 2 500 mg/kg y que el volumen de suelo a tratar sea mayor a 200 m³.

Existen algunos factores que pueden afectar la viabilidad de aplicación de la técnica de biopilas y que deben tomarse en consideración, como son los costos de excavación del suelo y de los estudios de tratabilidad, sin embargo, para evaluar la posibilidad de aplicar una biorremediación en biopilas, es necesario seguir un proceso que se divide en tres pasos (adaptado de USEPA, 1994), los cuales se describen en la figura 1.10.

El primer paso consiste en evaluar la efectividad de la biopila y es necesario identificar el tipo de suelo y los factores climatológicos, que pudieran afectar su buen funcionamiento; el segundo evalúa el diseño de la biopila para saber si se consideraron todos los parámetros y si el estudio de costo-beneficio es adecuado, mientras que el tercer paso evalúa los planes de operación y monitoreo para confirmar que los periodos de monitoreo son suficientes y adecuados.

1.11. Diseño Experimental

Un diseño experimental permite definir cuántas condiciones (factores) se varían dentro de los experimentos, en que tratamientos, en que combinaciones y cómo se asignan las unidades experimentales. A cada diseño le corresponde un modelo y éste a su vez determina el análisis estadístico a realizar (Box *et al.*, 1999). Visto de otra forma, un diseño experimental es la configuración de puntos en el espacio de los tratamientos (es decir, los niveles de los factores) y el orden en el cual se realizan las observaciones en el tiempo y/o en el espacio (Méndez, 1976).

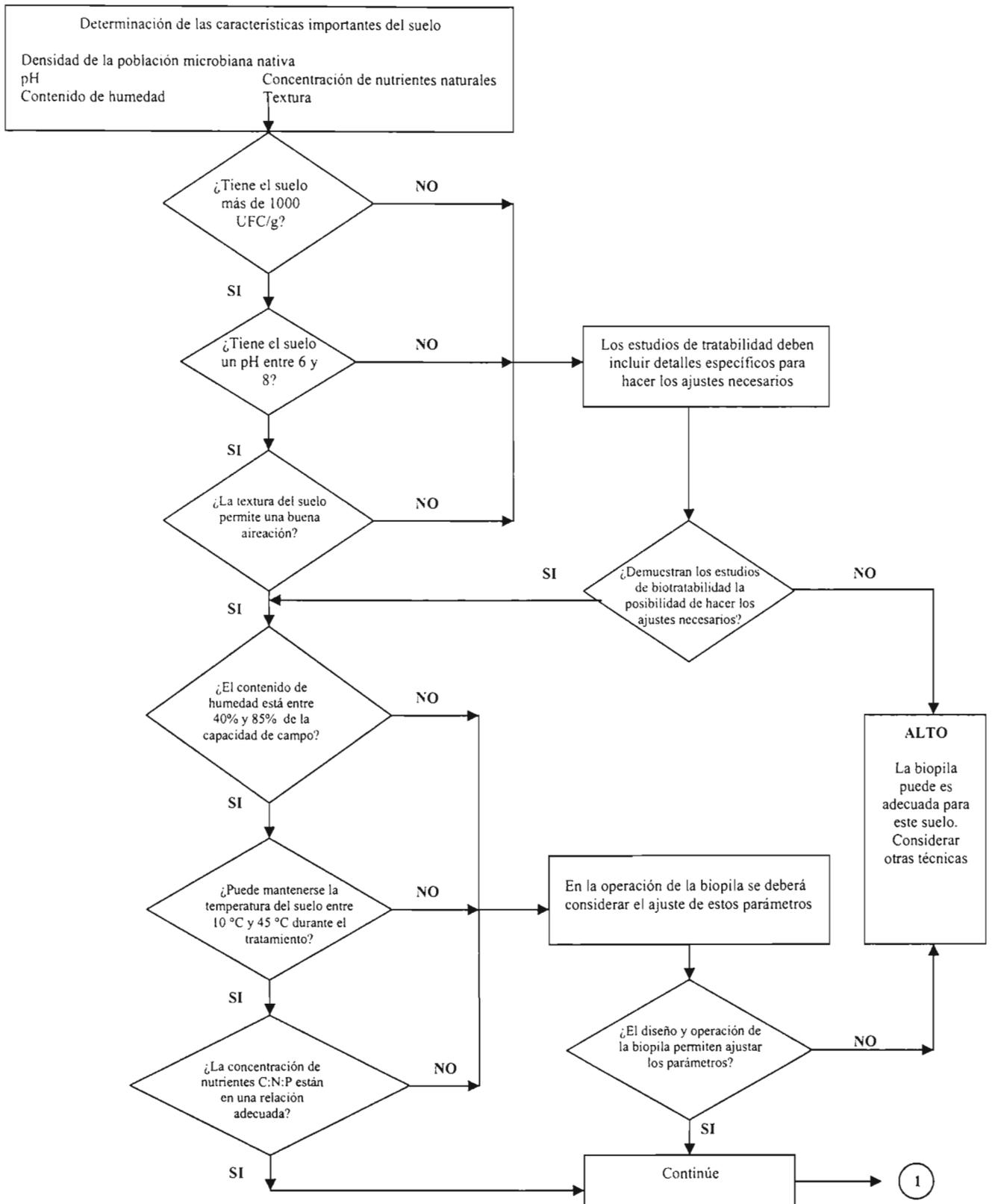


Figura 1.10. Esquema para evaluar la viabilidad de aplicar la biorremediación en biopilas (hoja 1 de 3).

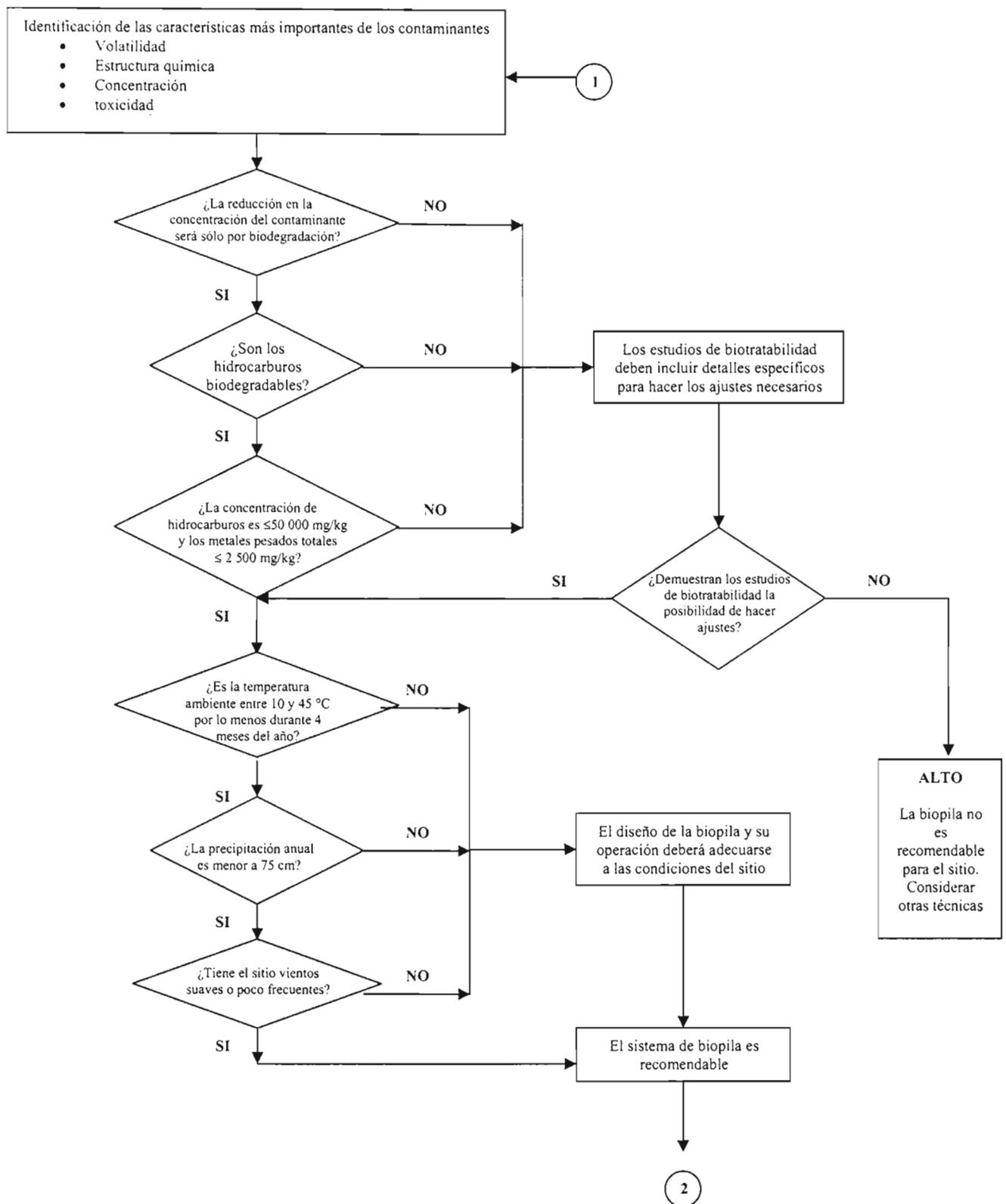


Figura 1.10. Esquema para evaluar la viabilidad de aplicar la biorremediación en biopilas (hoja 2 de 3).

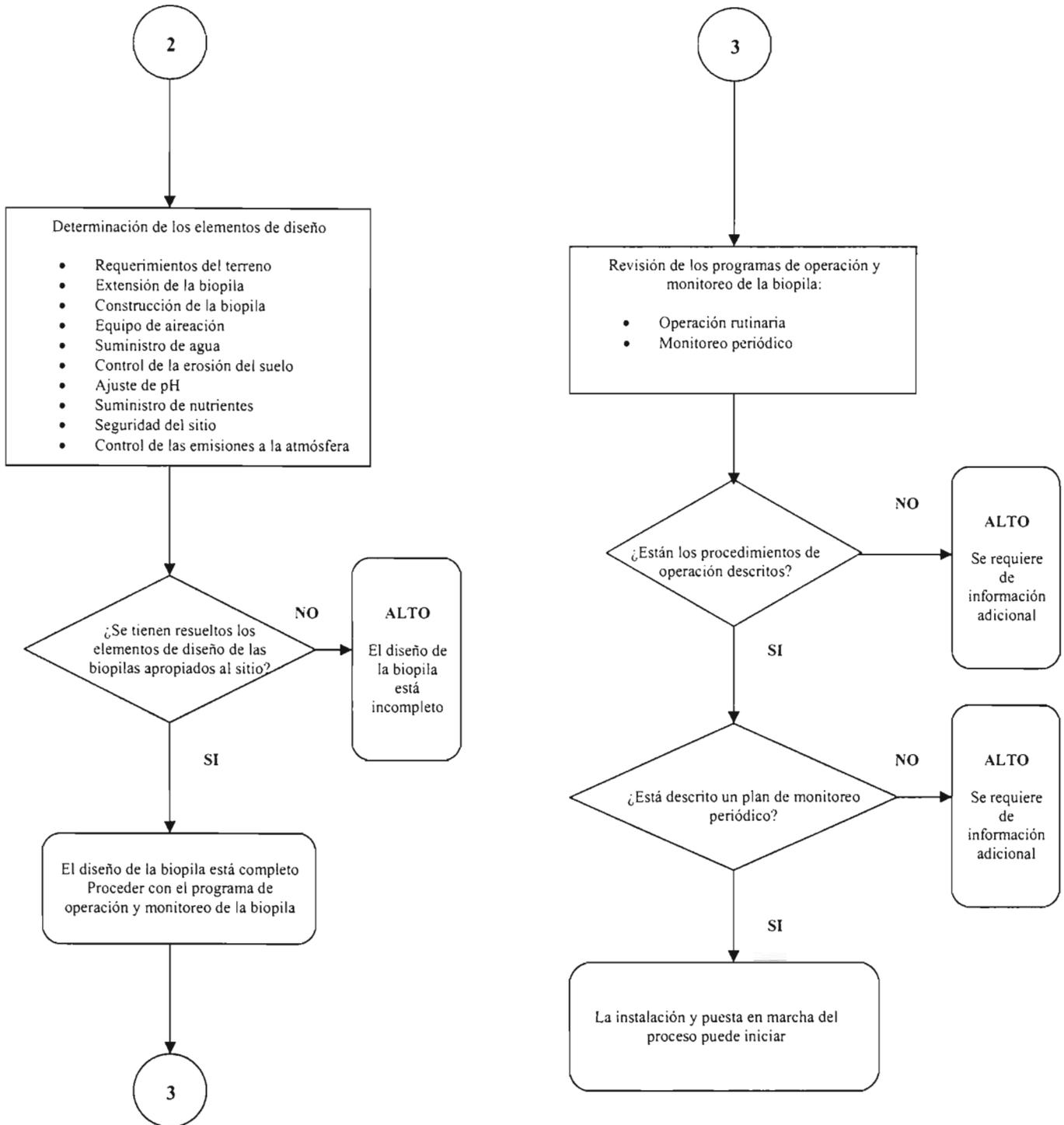


Figura 1.10. Esquema para evaluar el diseño y operación de las biopilas (hoja 3 de 3).

Al aplicar un diseño experimental, se incrementa la validez de los resultados, lo cual es un elemento deseable de un experimento bien planeado. Incluso si no se detectan interacciones en el experimento los resultados son determinantes, puesto que se ha demostrado que los efectos principales de los tratamientos se mantienen para un rango más amplio de condiciones (Little y Hills, 1983).

Cuyo se realiza un experimento, es conveniente definir previamente el diseño experimental que se aplicará. Existen diversos diseños experimentales cuya diferencia principal radica en la forma en que se agrupan o clasifican las unidades experimentales. En todos los diseños las unidades experimentales se clasifican por tratamientos; pero en algunos, éstos se clasifican preferentemente en bloques, filas, parcelas principales y otras modalidades. Sin embargo, sea cual fuese el diseño elegido, el análisis estadístico de los resultados debe responder con certeza las preguntas básicas del experimento planeado y basarse en el modelo teórico que se cree es el más adecuado para representar los cambios dados en las poblaciones estudiadas.

Uno de los principales indicadores de un buen análisis estadístico es el análisis de varianza, el cual utiliza las medias de los agrupamientos, denominadas fuente de variación para conocer si hubo o no diferencia significativa entre los tratamientos. En esto radica la importancia de aplicar un diseño experimental adecuado.

1.11.1. Modelo al Azar de Efectos Fijos con 4 Niveles

Para el presente trabajo se aplicó un diseño experimental factorial, el cual se consideró como un Modelo al Azar de Efectos Fijos con 4 Niveles. Este diseño se realiza completamente al azar sobre las unidades experimentales, por lo que se considera un diseño completamente aleatorizado. Se considera factor de efectos fijos porque los niveles (tratamientos) han sido seleccionados por el experimentador.

De acuerdo con Villarreal y Soler (1996), para un diseño factorial se selecciona un número fijo de “niveles” para cada una de un conjunto de variables (factores). Este modelo se usa para comparar

tratamientos o métodos diferentes de producción, en el cual se pretende probar estadísticamente la hipótesis nula (H_0) que sugiere que todas las medias de los tratamientos o métodos son iguales (no existe diferencia entre los tratamientos), por lo que se expresa:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$$

En este diseño experimental el modelo que describe los valores de los datos u observaciones es:

$$y_{ijk} = \mu + \gamma_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

y_{ij} = observación tomada para cada tratamiento

μ = es la media de global de los tratamientos

γ_i = desviación de la media μ_i de cada tratamiento con respecto a la media común μ

es decir

$$\gamma_i = \mu_i - \mu$$

ε_{ij} = error aleatorio implícito en todo valor y_{ij}

Variable de respuesta: Diesel residual

Para aplicar el diseño experimental se probaron cuatro niveles diferentes que corresponden cada uno a los distintos tratamientos: biostimulación, bioaumentación, adición de composta y atenuación natural, el factor “biodegradación del contaminante”, que es lo que se desea comparar, se evaluó a través de la variable de respuesta que es el diesel residual.

Para que se cumplan las condiciones de un diseño completamente aleatorizado y que los valores observados para cada tratamiento correspondan a valores de una variable aleatoria, se asignan los tratamientos aleatoriamente a cada biopila. Además, de que en los muestreos de suelo, las muestras se deben tomar en orden aleatorio en cada una de las biopilas. Los datos se ordenaron en una tabla como sigue:

TRATAMIENTOS	OBSERVACIONES							
Testigo (atenuación natural)	y_{11}	y_{12}	y_{13}	y_{14}	y_{15}	y_{16}	y_{17}	y_{18}
Bioaumentación	y_{21}	y_{22}	y_{23}	y_{24}	y_{25}	y_{26}	y_{27}	y_{28}
Bioestimulación	y_{31}	y_{32}	y_{33}	y_{34}	y_{35}	y_{36}	y_{37}	y_{38}
Adición de composta	y_{41}	y_{42}	y_{43}	y_{44}	y_{45}	y_{46}	y_{47}	y_{48}

↓ $i = 1, 2, \dots, k$
→ $j = 1, 2, \dots, n$

Cada elemento de la tabla representa el resultado u observación (j) de cada tratamiento (i), por ejemplo y_{21} representa el primer resultado (primer muestreo) $j= 1$, que corresponde al tratamiento dos ($i= 2$). Dentro del experimento el número de datos que se generen será el mismo para cada tratamiento. Los análisis estadísticos correspondientes, se realizan tomyo las varianzas y la suma se cuadrados entre los tratamientos y dentro de los tratamientos, con el fin de aceptar o rechazar la hipótesis nula.

Para la comprobación de la idoneidad del modelo e independencia de datos, las suposiciones que fundamentan el análisis de varianza requieren que los datos estén descritos de manera adecuada por el modelo $y_{ijk} = \mu + \gamma_i + \epsilon_{ij}$ que los errores sean independientes y que estén distribuidos normalmente con media cero y variancia constante σ^2 . En el modelo de efectos fijos se hace la suposición adicional de que las derivaciones de la media (γ_i) son independientes y están distribuidas normalmente con media cero y variancia σ^2 y además de que γ_i y el error aleatorio (ϵ_{ij}) son independientes.

Las herramientas principales para el diagnóstico están basadas en los *residuos* y en el modelo unidireccional de los residuos que es:

$$\epsilon_{ij} = y_{ij} - \hat{y}_{ij}$$

Para la comprobación de la idoneidad del modelo y la normalidad de los datos se construye una gráfica de probabilidad normal de los residuos. De la misma forma, se grafican los residuos contra el orden del tiempo en el que se recopilaron los datos para detectar una correlación entre ellos (Montgomery, 1991).

En el capítulo de Resultados se presentarán los detalles de la aplicación del modelo y los valores obtenidos, a partir de los cuales se llegó a las conclusiones del estudio.

2. METODOLOGÍA

2.1. Obtención y preparación del suelo contaminado

El suelo contaminado con diesel que fue utilizado para este estudio constituye el recorte de perforación de varios pozos de monitoreo hasta 4.5 m de profundidad que fueron construidos en una instalación industrial, la cual almacena y distribuye combustibles. Dicho suelo fue almacenado en tambos para su traslado al Instituto de Ingeniería, lugar donde se llevó a cabo la experimentación.

El suelo fue homogenizado antes de su tratamiento, se eliminaron piedras y otros materiales ajenos a este. Se tomó una muestra por el método de cuarteo para realizar la caracterización inicial, posteriormente se depositó en charolas de fibra de vidrio de 2.40 x 2.40 m de base por 0.5 m de altura que fueron construidas para tal fin. Estas fueron colocadas previamente sobre una

plancha de concreto para prevenir los efectos de una posible migración de los lixiviados generados hacia el terreno natural.

2.2. Caracterización inicial del suelo

Caracterización física y química del suelo

Se aplicaron las técnicas descritas en la NOM-021-RECNAT-2000, las determinaciones consideradas fueron: nitrógeno total, fosfatos, textura, densidad real, densidad aparente, porosidad, materia orgánica, pH, capacidad de intercambio catiónico y capacidad de retención de agua.

Concentración de hidrocarburos fracción diesel

Las muestras de suelo fueron sometidas a extracción de acuerdo con el método EPA 3015, posteriormente en el extracto se cuantificó la concentración de hidrocarburos base diesel tomyo como referencia el método EPA 8015. Estas determinaciones fueron realizadas por un laboratorio privado.

Concentración de hidrocarburos aromáticos polinucleares

Las muestras de suelo fueron sometidas a extracción de acuerdo con el método EPA 3015, posteriormente en el extracto se cuantificó la concentración de hidrocarburos poliaromáticos tomyo como referencia el método EPA 8310. Los hidrocarburos considerados fueron: Dibenzo(a,h)antraceno, Fenantreno, Fluoranteno, Fluoreno, Pireno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Naftaleno, Antraceno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(a)antraceno, Benzo(a)pireno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(g,h,i)perileno y Criseno. Estas determinaciones fueron realizadas por un laboratorio privado.

Conteo de bacterias heterótrofas

Se realizó por medio de conteo en placa en un medio comercial PYG (peptona, glucosa y extracto de levadura) marca MERK, su preparación se realizó según las especificaciones del mismo fabricante.

Conteo de bacterias degradadoras.

La cuantificación de bacterias degradadoras de diesel se realizó en medio mineral sólido cuya composición fue:

KH ₂ PO ₄	1.0 g/L
Na ₂ HPO ₄	1.42 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.38 g/l
Agar bacteriológico.....	15 g/L
Diesel.....	15 μL

2.3. Diseño y construcción de las biopilas

Las dimensiones de las biopilas se definieron con base en las ecuaciones que se describen a continuación.

Según Roldán (2001) las pendientes óptimas de los taludes de las biopilas deben tener una proporción 1.25:1, ya que con esto se disminuye la probabilidad de deslaves y se facilita la formación de la pila. El ángulo de inclinación de los taludes fue:

$$\text{sen } \alpha = \frac{\text{cat}_{op}}{\text{hip}}$$

$$\text{sen } \alpha = \frac{1}{1.25} = 0.8 \Rightarrow \text{arc sen} (\text{sen } \alpha) = \alpha$$

$$\alpha = 53.13^\circ$$

Las alturas óptimas de los taludes de las biopilas se obtuvieron mediante la ecuación:

$$h^2 + a^2 = m^2$$

despejo a:

$$a = 0.75 h$$

Si $h = 0.50 \text{ m}$

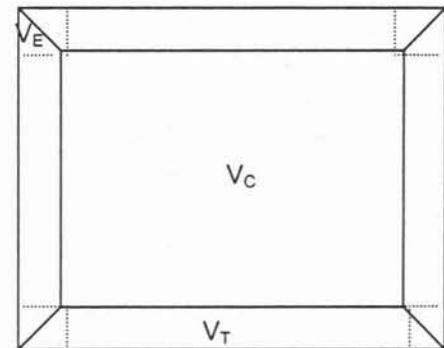
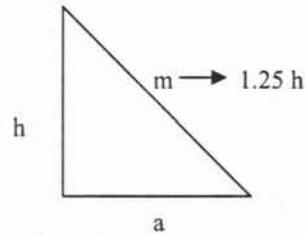
entonces el área de los taludes fue:

$$m = 0.625$$

$$a = 0.375$$

$$V_T = L \left(\frac{a \times h}{2} \right)$$

$$V_T = 0.7 \text{ m} \left(\frac{0.375 \text{ m} \times 0.625 \text{ m}}{2} \right) = 0.082 \text{ m}^3$$



Para los cuatro taludes

$$V_T = 0.328 \text{ m}^3$$

Área de las esquinas

$$V_E = 4 \frac{l \times l}{4} (h) \Rightarrow V = 4 \frac{(0.375 \text{ m}) \times (0.375 \text{ m})}{4} (0.5 \text{ m})$$

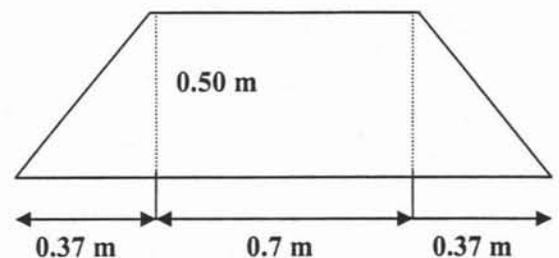
entonces:

$$V_E = 0.0703 \text{ m}^3$$

Para el cuerpo de la pila:

$$V_C = l \times l \times h \Rightarrow V = 0.70 \text{ m} \times 0.70 \text{ m} \times 0.5 \text{ m}$$

$$V_C = 0.245 \text{ m}^3$$



Volumen total de cada biopilas

$$V = 0.328 \text{ m}^3 + 0.0703 \text{ m}^3 + 0.245 \text{ m}^3 = 0.64 \text{ m}^3$$

Debido a que el modelo experimental aplicado fue al azar, se procedió a realizar un sorteo para asignar los tratamientos correspondientes a las biopilas. De esta forma, antes de la construcción de cada una de las biopilas se asignaron los tratamientos como sigue: en la biopila 1 se aplicó la bioestimulación (BE), en la biopila 2 la bioaumentación (BA), la biopila 3 adición de composta vegetal (AC) y a la biopila 4 se asignó atenuación natural (AT). Cada biopila se constituyó con 554 kg de suelo, tomyo como base los valores de densidad de suelo obtenidos en el laboratorio.

Los experimentos se realizaron a escala de demostración en campo, por ello fue necesario protegerlas contra las inclemencias del tiempo, así para prevenir el deslave por lluvia, se colocó un armazón metálico para sostener un toldo (figura 2.1). Cada biopila a su vez se cubrió con un toldo de plástico negro de alta densidad para evitar la pérdida de agua por evaporación, la liberación de compuestos orgánicos volátiles hacia la atmósfera y la erosión del suelo por el viento. Las particularidades de cada tratamiento se describen a continuación:



Figura 2.1. Vista de las biopilas

2.4. Tratamiento por bioestimulación (Biopila BE)

2.4.1. Adición de Fertilizantes

La adición de fertilizantes tuvo como objetivo estimular la actividad de los microorganismos nativos a través de la adición de fertilizantes agrícolas, específicamente sulfato de amonio y fosfato tricálcico, manteniendo una relación de 100:10:0.5 de carbono, nitrógeno y fósforo, respectivamente.

El ajuste de nutrimentos (anexo 2) se realizó tomando como base la concentración inicial de carbono orgánico que presentó el suelo de 49 700 mg/kg. Se agregaron 11.0 kg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0.680 kg de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ al suelo de la biopila uno.

Después de adicionar los fertilizantes, el suelo se homogenizó por medio con ayuda de una pala de albañil, asimismo se agregó agua con una regadera de jardín para tratar de llevar la humedad entre el 30% y 40%, igual que para todas las biopilas.

2.5. Tratamiento de bioaugmentación (Biopila BA)

2.5.1. Desarrollo del cultivo de bacterias degradadoras de diesel

Previo al inicio del tratamiento de la biopila fue necesario desarrollar el cultivo de bacterias degradadoras. Como punto de partida se utilizó un cultivo aislado en el laboratorio a partir de otros suelos contaminados con hidrocarburos que corresponden a pasivos ambientales, en los cuales se ha preservado la actividad degradadora.

Para reactivar el cultivo se inoculó en frascos de vidrio con tapa metálica y contratapa de teflón conteniendo 100 ml de medio mineral líquido, cuya composición es la misma descrita ya en la página 59, exceptuando el agar bacteriológico, y con diesel como única fuente de carbono. Asimismo, se adicionó una pequeña cantidad de surfactante no iónico (un alcohol graso etoxilado) para reducir la tensión superficial. Los frascos se incubaron a 26 °C con agitación constante. Se realizaron transferencias consecutivas con cantidades crecientes de medio mineral, diesel y surfactante (figura 2.2). Entre cada transferencia se permitió una semana de incubación.

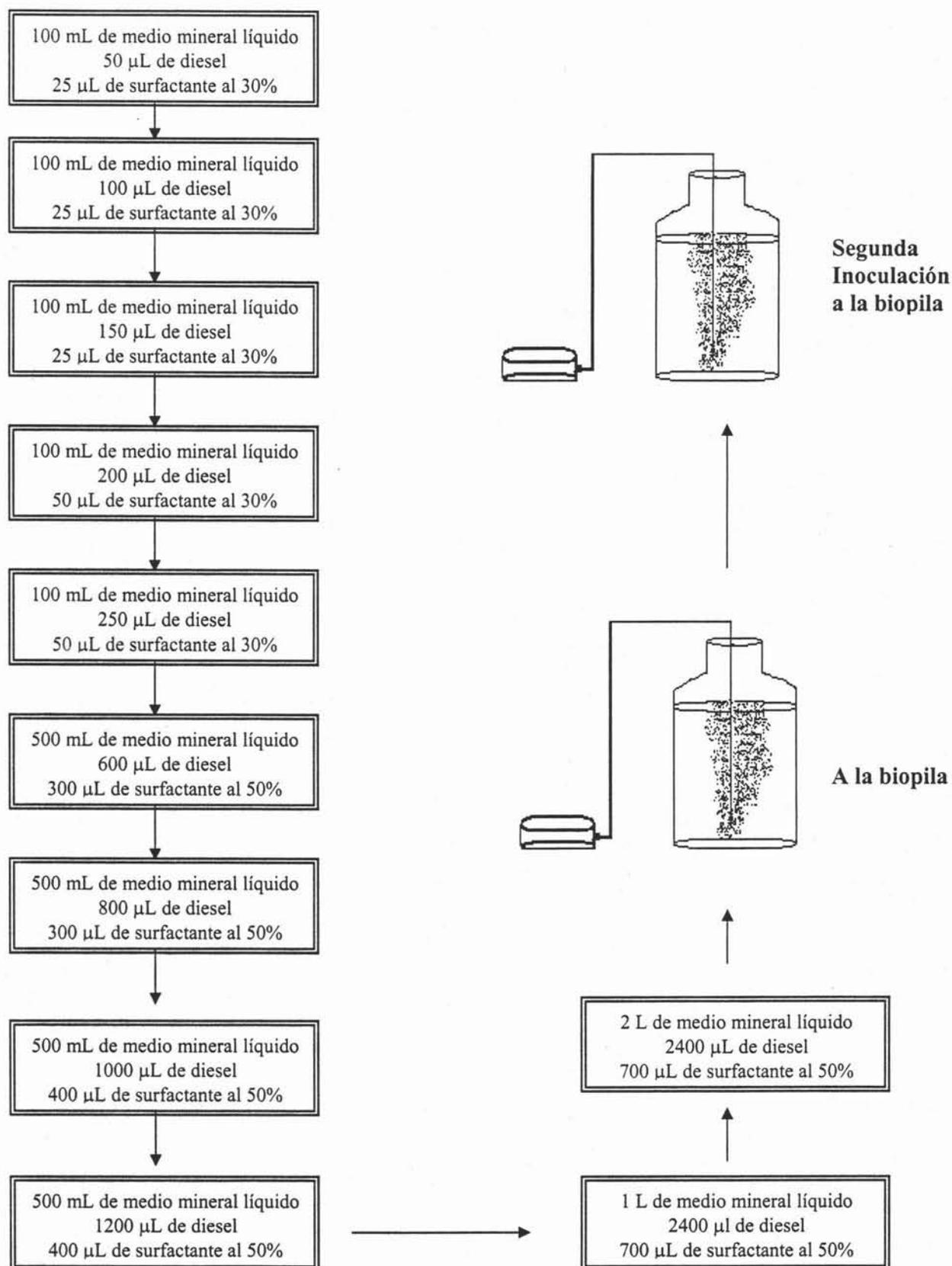


Figura 2.2. Procedimiento para la obtención del cultivo de bacterias degradadoras

El cultivo se llevó hasta un biorreactor a nivel piloto de 20 L de capacidad, conteniendo 17 L de medio mineral líquido, 43.2 ml de diesel y 18 ml de surfactante diluido al 50%, el suministro de oxígeno se hizo por medio de una bomba para pecera. El biorreactor se cubrió con plástico negro para evitar el posible crecimiento de algas, se mantuvo a temperatura ambiente.

La biopila se inoculó en dos ocasiones, una al inicio y la otra a 45 días después de haber iniciado el experimento. La inoculación de la biopila se realizó con ayuda de una regadera de jardín y la posterior homogenización manual del suelo por medio de una pala.

Conviene mencionar que al comenzar la reactivación de los cultivos degradadores se observó un lento desarrollo, por ello se decidió agregar surfactante al 30 y al 50%, para reducir la tensión superficial diesel-agua y permitir con ello la homogeneidad del medio. El surfactante fue de tipo no iónico, la concentración utilizada fue la mínima necesaria para emulsionar completamente al diesel y que no interfiriera con la actividad microbiana, para lo cual se tomó como base lo descrito en los trabajos realizados por Ruíz (2002).

2.6. Tratamiento con adición de composta vegetal (Biopila AC)

2.6.1. Obtención y preparación de la composta

En la biopila 3 se adicionó composta proveniente de la Planta de Composta de la UNAM que está preparada a partir de desechos de jardinería del campus de Ciudad Universitaria. La composta utilizada en este trabajo se tomó de un lote que según el encargado de la planta, estaba lista para su aplicación en jardinería.

Previamente la composta se tamizó con una malla de alambre de 2 cm de diámetro con el fin de quitar trozos de madera y otro material ajeno. La proporción suelo-composta utilizada fue de 3:1, siguiendo las recomendaciones de Jorgensen *et al.*, (2000), o sea 554 kg de suelo:173 kg de composta.

2.6.2. Caracterización de la composta

Para la caracterización física y química de la composta se aplicaron las técnicas de la NOM-021-RECNAT-2000, debido a que no existen procedimientos específicos para la caracterización de composta. El procedimiento y las determinaciones realizadas fueron las mismas que se aplicaron para el suelo, descritas en el inciso 2.2.

2.7. Tratamiento por atenuación natural (Biopila AT)

La biopila 4 en la que se permitió la atenuación natural, realmente sirvió como testigo porque en ella únicamente se llevó el control de humedad de la misma manera que se hizo para las otras biopilas, tratyó de mantener la humedad entre 30 y 40%, mediante la adición de agua por medio de una regadera de jardín.

De todas las biopilas se obtuvieron muestras inalteradas, lo cual significa que se tomaron con una pala cavadora colocándose en frascos de vidrio con tapa hermética y contratapa de teflón, y almacenándose inmediatamente de la toma en refrigeración a 4 °C hasta su análisis. Cada dos semanas se muestreo para realizar los análisis de seguimiento, con excepción de los dos últimos muestreos que se realizaron cada mes. Para el muestreo del suelo en cada biopila se utilizó la técnica de cuarteo con el fin de que fueran representativas y estadísticamente significativas.

La figura 2.3. ilustra de forma general la operación de cada una de las biopilas, con sus respectivos tratamientos.

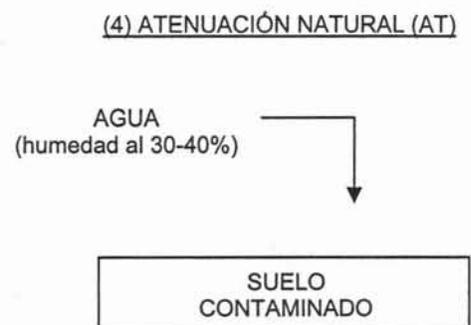
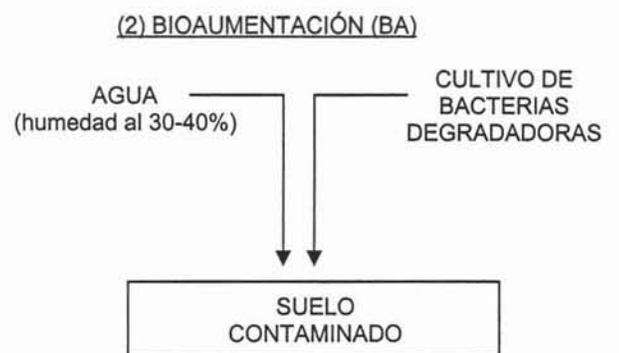
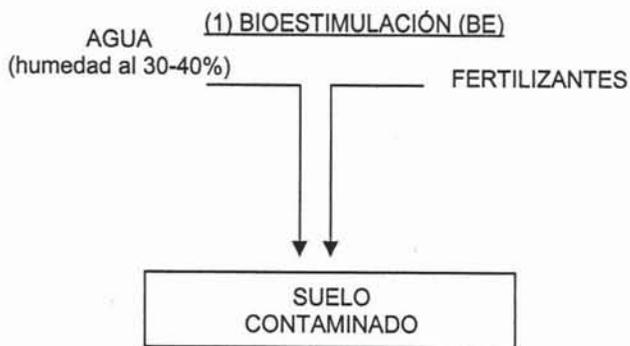
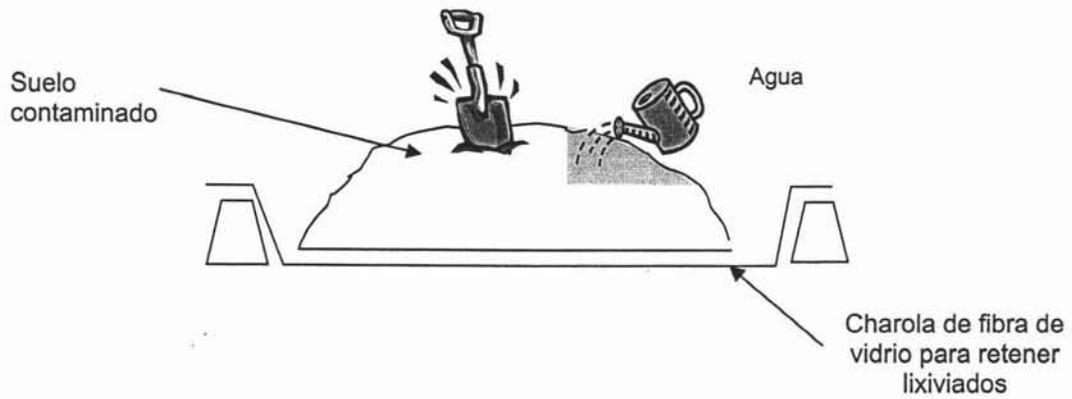


Figura 2.3. Tratamientos aplicados en las biopilas

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización del suelo y de la composta antes del tratamiento

El subsuelo del sitio del cual proviene el suelo utilizado está constituido por una serie de capas y lentes que presentan una granulometría preferentemente fina. Hacia la superficie se distinguen arenas arcillosas y arcillas, mientras que hacia los 3 metros de profundidad los horizontes tienden a ser de una granulometría más arenosa.

Lo anterior explica la textura del suelo que correspondió a un suelo de tipo migajón-arcillo-limoso. Lo que caracteriza a este tipo de suelo es que cuando está seco puede parecer terroso, pero los terrones pueden romperse con facilidad y al pulverizarse dan una sensación arenosa. Cuando está húmedo fácilmente se cementa; ya sea seco o húmedo forma molduras que pueden manejarse fácilmente sin quebrarse (Aguilera, 1989). Generalmente el contenido de nutrientes en este tipo de suelo es bajo, en cuanto al contenido de carbono orgánico depende de la proporción de arcilla en su estructura.

Con la finalidad de conocer las propiedades originales del suelo y de la composta, así como el contenido de nutrientes naturales, se realizó su caracterización química, física y biológica. Los resultados de esta caracterización inicial se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Caracterización física, química y biológica del suelo y de la composta al inicio de los experimentos

PARÁMETRO	COMPOSTA	SUELO
Humedad (%)	30.66	16.03
Materia orgánica (%)	24.70	18.0
pH	7.92	8.43
Fósforo (mg/kg)	249.56	101.53
Nitrógeno total (mg/kg)	1 335.3	684.57
Capacidad de intercambio catiónico Cmol(+)/kg ⁻¹	45.0	13.9
Densidad aparente (g/mL)	0.5	0.86
Densidad real (g/mL)	1.58	2.01
Porosidad (%)	67.32	42.78
Textura	-	Arcillo-limoso
Capacidad de retención de agua (mL/kg)	695	40
Heterótrofas (ufc/gr)	6.67 E4	1.3 E4
Degradadoras (ufc/gr)	1.19 E4	2.24 E3

La humedad natural del suelo y la composta fue muy baja, de ahí el bajo contenido de bacterias, aún las heterótrofas. Experiencias dentro del grupo de trabajo (Zegarra, 2000, Domínguez, 2001 y Guzmán 2001) han demostrado que una humedad entre el 30 y 40% en el suelo es óptima para la existencia de una actividad microbiana nativa.

Como era de esperarse el contenido de materia orgánica fue más alto en la composta debido a su origen orgánico. En el suelo la cifra obtenida está influenciada por la presencia de diesel.

Los valores de pH del suelo y de la composta se encontraron dentro del intervalo óptimo recomendado para una biorremediación, el cual es entre 6 y 9 (Pelczar *et al*, 1982 y USEPA,

1996). Tomyo como referencia los valores obtenidos se decidió no ajustar el pH del suelo, para simular con ello condiciones reales de trabajo en campo.

El contenido de nitrógeno total en la composta fue muy alto, lo cual era de esperarse debido al propio proceso de preparación (Briddestone y Gray, 1994). En contraste, el suelo presentó un contenido de nitrógeno bajo, situación que pudo limitar la existencia de microorganismos nativos, ya que es un nutriente esencial para la síntesis de proteínas. No obstante, el contenido de fosfatos fue alto en ambos casos tomyo como referencia las cifras reportadas en los trabajos de Vázquez y Bautista (1993). Para ajustar los contenidos de nitrógeno y fósforo en el suelo, se utilizaron fertilizantes comerciales como el sulfato de amonio y fosfato tricálcico, porque fueron los más fácilmente disponibles y apropiados para las condiciones del suelo. Se consideró la posibilidad de utilizar otros fertilizantes más económicos como la urea y el superfosfato triple, sin embargo, ambos favorecen el incremento del pH porque producen reacción alcalina, lo que aumentaría aún más pH del suelo. Aunque la urea ha demostrado ser efectiva en biorremediación (Frankenberger, 1988), el pH alcalino del suelo hubiera limitado su aplicación.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) fue alta en la composta, lo cual indica que la reserva nutrimental es abundante, tomyo como referencia las cifras de la NOM-021-RECNAT-2000. Este parámetro es importante porque puede alterar las propiedades físicas, así como el pH y fertilidad de los suelos; además está determinada por el tipo y cantidad de arcillas, así como de la materia orgánica que contienen (Sylvia, *et al* 1999).

El suelo presentó una densidad aparente de 860 kg/m^3 , la cual es típica de suelos constituidos por partículas finas, en cambio la composta presentó una densidad aparente de 500 kg/m^3 que corresponde a la densidad de horizontes turbosos (Porta, 1994). La densidad aparente es importante porque influye en la circulación del agua y del aire. Asimismo, se pudo observar que este parámetro está directamente relacionado con la estructura del suelo, no así la densidad real que depende de la densidad de las partículas y es independiente a la estructura. Según los resultados obtenidos, la naturaleza de las partículas del suelo son minerales de arcilla, en cambio en la composta sus características corresponden a materiales orgánicos (Porta, 1994). La densidad real siempre es mayor que la densidad aparente, ya que esta última considera el espacio poroso del suelo, el cual fue de 42.78%, que es la porosidad típica de suelos arcillo-arenosos-limosos

(Freeze y Cherry, 1979; Sylvia, 1999) y en la composta fue de 67.32%, típica de suelos orgánicos.

Aunque los poros del suelo juegan un papel muy importante en el movimiento de aire y agua, así como en la colonización de microorganismos en los espacios vacíos, la mayor importancia se encuentra en el tamaño de los poros. Los macroporos permiten una mejor aireación y paso del agua, en el caso de las arcillas, aunque tienen una mayor porosidad, los espacios vacíos son microporos que restringen el flujo de gases y agua en el suelo.

La capacidad de retención de agua fue mucho más alta en la composta, debido a la gran cantidad de materia orgánica, la cual seguramente absorbió la mayor parte del agua, o quizá a los microporos que posee y que restringen el paso del agua.

El contenido de bacterias heterótrofas en el suelo y la composta fue bajo, tomyo como referencia que un suelo fértil puede contener entre 10^6 y 10^9 bacterias/g (Wood, 1989). Se observó una mayor cantidad de bacterias heterótrofas en la composta y algunas tuvieron la capacidad de degradar el diesel, aún sin haber estado antes en contacto con este contaminante. Respecto a las bacterias degradadoras de diesel en el suelo, su proporción fue muy baja, pero representa el 10% de la población bacteriana heterótrofa cuantificable, cifra que se considera aceptable.

3.2. Características del cultivo de bacterias degradadoras

Para que los microorganismos puedan degradar los hidrocarburos es indispensable que estén en contacto directo con ellos (Tiehm, 1997). En el caso del diesel, aún en bajas concentraciones, flota sobre el agua debido a su baja solubilidad. La manera de reducir la tensión superficial agua-diesel, consistió como ya se mencionó anteriormente, en agregar a los cultivos pequeñas proporciones de surfactante con la finalidad de aumentar la biodisponibilidad del contaminante.

Se decidió utilizar en agente tensoactivo no iónico, que aumenta las transferencia de masa, éste es un alcohol graso etoxilado, el cual se eligió dado que entre sus ventajas de utilización en campo sobre salen las siguientes: 1) causa una mínima reducción en el flujo subterráneo; 2) es biodegradable y 3) no causa dispersión de hidrocarburos en la zona no saturada del suelo (Ruíz, 2002).

La concentración del surfactante estuvo en función de la mínima necesaria, ya que si se utilizan concentraciones altas puede ser utilizado por los microorganismos como fuente de carbono. Además de que, se ha reportado que concentraciones de tensoactivo entre 500 y 1000 ppm, pueden inhibir la biodegradación de los hidrocarburos (Fortín, 1997 y Margesin, 1998) e inclusive pueden causar daños a la célula debido a lisis de la membrana celular.

En trabajos realizados por Ruíz (2002) se encontró que la concentración óptima de surfactante no iónico para cultivos de bacterias degradadoras de diesel fue de 0.05% (v/v), por lo que a partir de este dato, se calcularon las concentraciones utilizadas en el presente trabajo.

Como resultado de la adición de surfactante al medio de cultivo se observó un crecimiento notable de la biomasa después de tres días, resultado seguramente del rompimiento de la tensión superficial que existía entre el agua y el combustible.

El tiempo que tardaron en crecer las bacterias en el reactor puede atribuirse a la alta concentración de diesel en el medio (35 856 ppm), ya que en los trabajos de Guzmán (2001) y Ruíz (2002), manejo concentraciones de 25 000 y 8 300 ppm de diesel, respectivamente, se obtuvieron tiempos de crecimiento menores, de 12 y 10 días, respectivamente.

Después de la primera inoculación a la biopila BA, se realizó una cuantificación de bacterias degradadoras en el suelo, la cual mostró una población de 1.81×10^5 UFC/g de suelo, en respuesta a esto, se decidió comenzar otro cultivo de bacterias degradadoras en el reactor para realizar una segunda inoculación a los 45 días posteriores a la primera y una mezcla del suelo.

3.3. Comportamiento de los parámetros en las biopilas

Aunque se trató de ajustar la concentración inicial de diesel a 5 000 ppm en todas las biopilas, en la realidad se observó una diferencia que se atribuyó a la heterogeneidad propia del suelo, la cual no evita que los resultados sean confiables, porque el muestreo y los análisis estadísticos, ya consideran el error aleatorio que está implícito en cualquier experimento (ϵ_i). La concentración de

diesel en el suelo de la biopila AC fue menor debido a la adición de la composta vegetal que redujo el contenido de diesel, como se observó en los trabajos realizados por Domínguez (2001), debido a una dilución v/v.

En este trabajo la finalidad de haber adicionado composta fue incluir un agente abultante, para permitir una mejor oxigenación, proporcionar nutrientes de origen natural al suelo que pudieran contribuir a aumentar la biodegradación del diesel y quizá aumentar la proporción de microorganismos. Según Biddlestone y Gray (1994) el tipo de composta utilizada es más rica en nutrientes, que la obtenida de desechos municipales. No existe una proporción óptima suelo-composta, ya que en otros trabajos como los de Namkoong *et al* (2002), Kästner y Mahro (1996); Laine y Jorgensen (1996), se han utilizado diferentes proporciones de composta con diferentes concentraciones de contaminantes, dyo como resultado, que la mejor dependerá del tipo de suelo y del contaminante. Los resultados obtenidos de la caracterización física, química y biológica de las biopilas se reportan en las tablas 3.2 y 3.3. y se discuten en los siguientes incisos.

3.3.1. Variación de la humedad

La humedad se mantuvo para todas las biopilas entre el 20 y 30 %, como se observa en la figura 3.1 que no es el porcentaje óptimo para que los microorganismos puedan llevar a cabo sus funciones metabólicas adecuadamente (EPA, 1994), no obstante, parece que esto no afectó directamente en la degradación y si ayudo a que no se generaran lixiviados porque a pesar de que las biopilas fueron conformadas con un grado de inclinación para la recolección de éstos, en ningún caso hubo lixiviación, lo que indica que el aporte de agua fue el adecuado. Aunque la humedad no está identificada como un factor que gobierne directamente la degradación, según Freijer *et al.* (1996), sí tiene un papel imprescindible en las reacciones enzimáticas y de intercambio de nutrientes en el suelo. Un suelo saturado de agua no hubiera permitido un intercambio de oxígeno para que se llevara a cabo el metabolismo aerobio de las bacterias degradadoras del diesel.

Tabla 3.2. Caracterización física, química y biológica de las biopilas

BIOESTIMULACIÓN (BE)									
Tiempo (días)	0	15	30	45	60	75	90	120	150
Humedad (%)	30.06	25.77	30.79	27.61	30.08	31.65	32.23	31.38	35.00
pH	8.32	8.55	8.71	8.65	8.53	8.60	8.63	8.30	9.18
Fósforo (mg/kg)	256.17	242.56	248.70	252.57	45.75	46.80	71.06	95.9	131.9
Nitrógeno total (mg/kg)	5098.3	4049.8	4211.4	3394.4	3460.1	3501.9	3517.3	2267.4	2346.6
Bacterias heterótrofas (ufc/gr suelo)	2.85E5	-	4.04E5	-	8.44E5	-	1.47E6	-	3.38E5
Bacterias degradadoras (ufc/gr suelo)	1.43E5	-	1.59E5	-	1.57E5	-	8.85E5	-	1.38E5
Diesel residual (mg/kg)	5271.9	2727.9	2094.6	2177.3	1690.1	1793.6	2299.2	1303.2	894.0
H. poliaromáticos (mg/kg)									
Dibenzo(a,h)antraceno	ND	0.0057	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenantreno	0.82	0.1826	ND	ND	0.0077	0.0139	0.0139	ND	ND
Fluoranteno	ND	0.0356	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fluoreno	0.40	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pireno	0.44	0.0486	ND	ND	0.0474	0.0613	0.0921	ND	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	ND	0.0337	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Naftaleno	ND	ND	ND	ND	0.0817	0.0229	ND	ND	ND
Antraceno	ND	ND	ND	ND	0.0023	0.0237	0.0034	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	ND	0.0188	ND	ND	0.0112	ND	0.0174	ND	ND
Benzo(a)antraceno	ND	0.0265	ND	ND	ND	0.0089	ND	ND	ND
Benzo(a)pireno	ND	0.0272	ND	ND	0.0071	ND	0.0108	ND	ND
Benzo(b)fluoranteno	ND	0.0520	ND	ND	ND	ND	0.0239	ND	ND
Benzo(g,h,i)perileno	ND	0.0764	ND	ND	ND	ND	0.0423	ND	ND
Criseno	ND	0.0947	ND	ND	ND	ND	0.2242	ND	ND
BIOAUMENTACIÓN (BA)									
Tiempo (días)	0	15	30	45	60	75	90	120	150
Humedad (%)	28.17	43.89	24.86	28.23	28.86	31.53	31.84	29.69	33.20
pH	8.36	8.71	8.76	8.17	9.13	8.81	8.90	9.08	8.95
Fósforo (mg/kg)	195.13	130.89	111.54	106.36	107.53	97.53	154.97	101.0	115.4
Nitrógeno total (mg/kg)	538.31	503.6	524.412	538.6	451.0	460.4	461.5	731.1	544.79
Bacterias heterótrofas (ufc/gr suelo)	9.05E5	-	2.13E6	-	1.64E6	-	4.55E6	-	4.34E5
Bacterias degradadoras (ufc/gr suelo)	1.81E5	-	2.67E5	-	4.22E5	-	4.25E5	-	1.04E5
Diesel residual (mg/kg)	4599.6	3038.9	2693.9	2125.1	1969.2	2081.3	2120.4	2614.4	1756.8
H. poliaromáticos (mg/kg)									
Dibenzo(a,h)antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	0.0027	ND	ND	ND
Fenantreno	0.36	0.2283	ND	ND	0.015	0.0551	0.0063	ND	ND
Fluoranteno	0.56	ND	ND	ND	ND	0.0249	ND	ND	ND
Naftaleno	ND	ND	ND	ND	0.1002	0.0393	ND	ND	ND
Fluoreno	ND	ND	ND	ND	ND	0.4911	ND	ND	ND
Pireno	0.95	0.0074	ND	ND	0.0592	0.0496	0.0279	ND	ND
Antraceno	ND	ND	ND	ND	0.0073	0.2465	0.0034	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	0.25	0.0061	ND	ND	0.0107	0.0043	0.0090	ND	ND
Benzo(a)antraceno	0.15	ND	ND	ND	ND	0.2115	ND	ND	ND
Benzo(a)pireno	0.38	ND	ND	ND	0.0063	0.0140	0.0070	ND	ND
Benzo(b)fluoranteno	ND	0.0088	ND	ND	0.0132	0.0073	0.0122	ND	ND
Benzo(g,h,i)perileno	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.0154	ND	ND
Criseno	ND	0.0552	ND	ND	ND	0.1260	0.0609	ND	ND

ND no detectado

Tabla 3.3. Caracterización física, química y biológica de las biopilas

ADICIÓN DE COMPOSTA (AC)									
Tiempo (días)	0	15	30	45	60	75	90	120	150
Humedad (%)	30.33	27.14	24.65	28.42	24.0	33.09	31.12	28.38	33.50
pH	8.74	8.9	8.85	8.8	8.94	9.01	9.10	9.04	9.02
Fósforo (mg/kg)	414.4	337.7	200.7	123.0	101.77	103.5	98.19	205.6	159.5
Nitrógeno total (mg/kg)	2007.1	2669.9	1919.6	1977.7	2430.4	2608.6	2569.9	2069.9	1670.0
Bacterias heterótrofas (ufc/gr suelo)	4.73E6	-	3.32E6	-	1.05E7	-	4.65E6	-	1.22E6
Bacterias degradadoras (ufc/gr suelo)	1.0E6	-	3.58E5	-	1.05E6	-	2.61E5	-	1.80E5
Diesel residual (mg/kg)	2741.8	2677.0	2101.7	2609.7	1893.9	2241.6	2980.3	1501.3	2048.9
H. poliaromáticos (mg/kg)									
Acenafteno	ND	ND	ND	ND	ND	0.0138	ND	ND	ND
Dibenzo(a,h)antraceno	ND	ND	ND	ND	0.0165	ND	ND	ND	ND
Fenantreno	0.29	0.2521	ND	ND	0.0261	0.5059	0.0103	ND	ND
Fluoranteno	ND	ND	ND	ND	0.0902	0.1120	ND	ND	ND
Fluoreno	ND	ND	ND	ND	ND	0.0247	ND	ND	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	ND	ND	ND	ND	0.0797	0.0089	ND	ND	ND
Naftaleno	ND	ND	ND	ND	0.1231	0.0381	ND	ND	ND
Pireno	0.41	ND	ND	ND	0.1183	0.0825	0.0265	ND	ND
Antraceno	ND	ND	ND	ND	0.0034	0.7073	0.0129	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	ND	0.0108	ND	ND	0.0476	0.0040	0.0095	ND	ND
Benzo(a)antraceno	ND	ND	ND	ND	ND	0.1762	ND	ND	ND
Benzo(a)pireno	ND	0.0122	ND	ND	0.0872	0.0047	0.0064	ND	ND
Benzo(b)fluoranteno	ND	0.0114	ND	ND	0.0843	0.0166	0.0125	ND	ND
Benzo(g,h,i)perileno	ND	ND	ND	ND	0.1194	0.0026	0.0168	ND	ND
Criseno	ND	0.0380	ND	ND	0.2151	0.0867	0.0628	ND	ND
ATENUACIÓN NATURAL (AN)									
Tiempo (días)	0	15	30	45	60	75	90	120	150
Humedad (%)	25.07	24.76	23.09	23.95	22.73	27.30	25.08	27.57	28.96
pH	8.98	9.11	8.72	9.01	9.12	9.28	8.70	9.20	9.40
Fósforo (mg/kg)	111.0	101.0	70.75	42.0	28.81	30.62	38.30	139.8	66.1
Nitrógeno total (mg/kg)	700.4	873.3	689.3	780.9	515.4	356.4	525.3	715.6	309.5
Bacterias heterótrofas (UFC/gr suelo)	4.40E6	-	1.04E5	-	1.29E6	-	2.67E5	-	6.75E5
Bacterias degradadoras (UFC/gr suelo)	2.40E5	-	2.60E4	-	3.49E5	-	9.34E4	-	2.11E5
Diesel residual (mg/kg)	6281.1	4535.8	3228.8	3715.3	3580.2	3204.7	3778.7	1834.2	2575.1
H. poliaromáticos (mg/kg)									
Acenafteno	ND	0.0291	ND						
Dibenzo(a,h)antraceno	ND	0.0215	ND	ND	ND	0.0078	ND	ND	ND
Fenantreno	ND	0.1987	ND	ND	0.0554	0.1003	0.0388	ND	ND
Fluoranteno	1.64	0.0306	ND	ND	0.0150	0.0492	ND	ND	ND
Fluoreno	0.62	0.1911	ND	ND	0.0464	0.1881	ND	ND	ND
Indeno(1,2,3-cd)pireno	ND	0.0673	ND	ND	ND	0.0614	ND	ND	ND
Naftaleno	ND	0.1259	ND	ND	0.0513	0.0224	ND	ND	ND
Pireno	0.44	ND	ND	ND	ND	0.0214	ND	ND	ND
Antraceno	ND	ND	ND	ND	0.0034	0.0408	0.0052	ND	ND
Benzo(k)fluoranteno	ND	0.0784	ND	ND	0.0134	0.0218	0.0088	ND	ND
Benzo(a)antraceno	ND	0.0163	ND	ND	ND	0.0310	ND	ND	ND
Benzo(a)pireno	ND	0.1414	ND	ND	0.0082	0.0577	0.0071	ND	ND
Benzo(b)fluoranteno	ND	0.1826	ND	ND	0.0174	0.0150	0.0163	ND	ND
Benzo(g,h,i)perileno	ND	0.1367	ND	ND	ND	0.0129	0.0135	ND	ND
Criseno	ND	0.1009	ND	ND	0.1248	0.2767	0.1901	ND	ND

ND no detectado

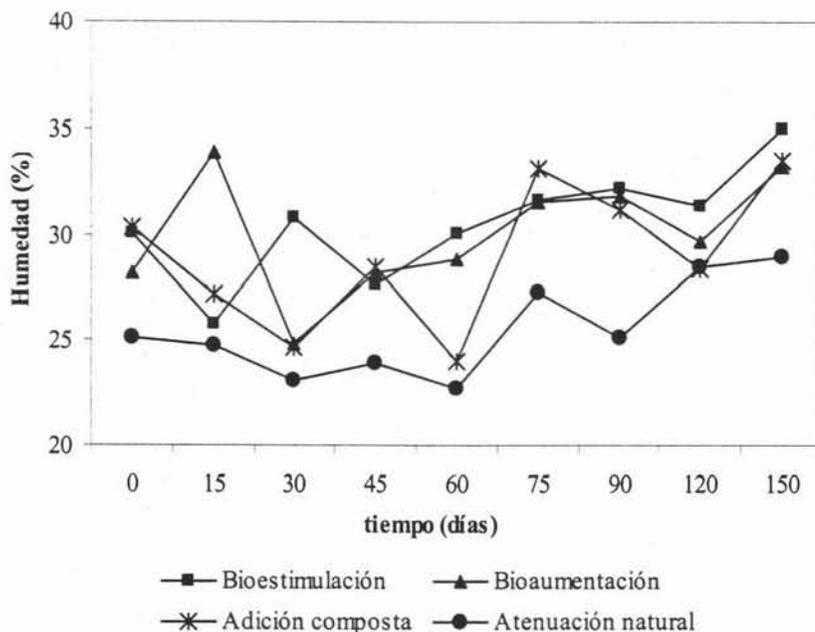


Figura 3.1. Variación del porcentaje de humedad durante la degradación de diesel

Los porcentajes más altos de humedad fueron los de la biopila AC, esto debido a la presencia de la composta, que en la caracterización inicial mostró tener 9 veces mayor capacidad de retención de agua que el suelo. Una prueba de ello es que la biopila AN presentó los porcentajes de humedad más bajos.

3.6.2. pH

Los valores de pH que se registraron en las biopilas fueron mayores a 8. Se considera que un intervalo óptimo de pH para el éxito de una biorremediación es entre 6 y 9 (Pelczar *et al*, 1982 y USEPA, 1999).

Durante los primeros 15 días después de haber iniciado el experimento se observó un aumento en el pH de las biopilas como consecuencia de la consecuente amonificación debido a la adición de nitrógeno amoniacal (Domínguez, 2001). Se ha reportado (Kästner y Mahro, 1995) que a una mayor concentración de amonio el pH tiende a incrementar. Un aumento del pH fue evidente en las cuatro biopilas después de las tres primeras semanas (Figura 3.2), hecho que coincide con las mayores tasas de degradación, disminuyendo posteriormente. Algunos autores (Domínguez 2001

y Pérez, 1999), atribuyen la disminución del pH a la producción de CO₂ y ácidos orgánicos generados a partir de la degradación del contaminante.

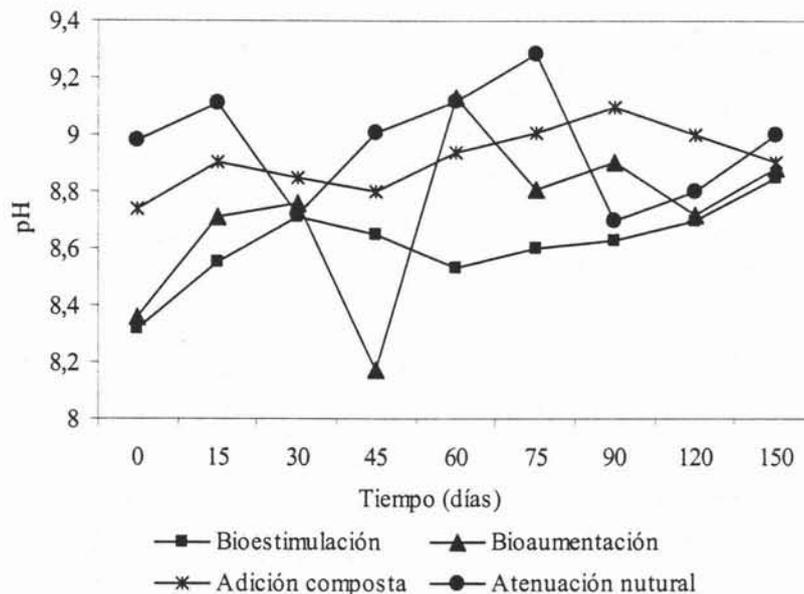


Figura 3.2. Variación del pH durante la degradación de diesel

3.3.3. Variación del nitrógeno total y los fosfatos

En las biopilas BE y AC el suelo presentó un mayor contenido de nitrógeno y fosfatos por la adición del fertilizante y la composta, respectivamente. El nitrógeno disminuyó con más rapidez en la biopila BE (figura 3.3), no así en las biopilas BA y AT. Tal vez el nitrógeno se mineralizó, o bien, fue utilizado para la formación de componentes orgánicos como aminoácidos y proteínas, biosintetizados durante la descomposición de los hidrocarburos (Deni y Pennincky, 1999). En algunas etapas el nitrógeno se incrementó, debido quizá a la formación de amonio por la presencia de bacterias amonificantes (Domínguez, 2001) y la posible disminución de oxígeno.

El nitrógeno es considerado (Cabrera *et al.* 1991) como el elemento determinante de la tasa de descomposición de la fuente de carbono, en este caso el diesel, porque la adición de nitrógeno amoniacal en cantidades adecuadas acelera su incorporación a la biomasa y con ello el incremento de su actividad.

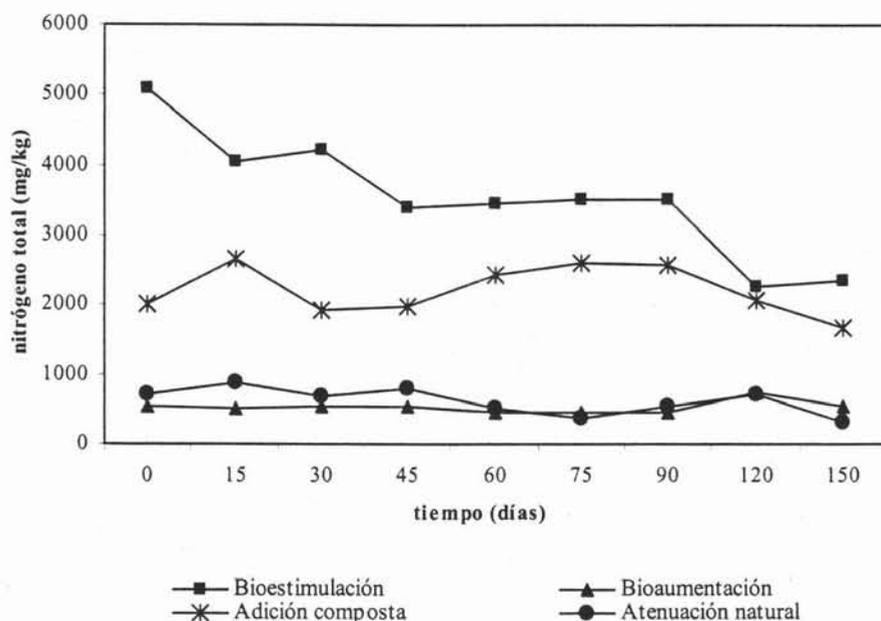


Figura 3.3. Utilización del nitrógeno total durante la degradación

El fósforo también es un elemento fundamental en la descomposición de la materia orgánica, su disminución en las cuatro biopilas indicó que este fue consumido por los microorganismos en forma de fosfatos (figura 3.4).

Al final del experimento se observó un incremento en la concentración de fosfatos en las biopilas BE, BA y AN el cual se atribuye a un intercambio isoiónico del fósforo adsorbido en el complejo de intercambio en el suelo. La gran cantidad de materia orgánica existente por la presencia del contaminante, incrementa la capacidad de intercambio iónico del suelo (Domínguez 2001).

La proporción de C:N:P que se manejó, de 100:10:0.5 en la biopila BE fue adecuada para los microorganismos; sin embargo, se pudieron haber utilizado proporciones menores, ya que algunos autores (Trindade *et al.*, 2003 y Walworth, 1997) sostienen que las cantidades de nitrógeno y fósforo necesarias para estimular la biodegradación de hidrocarburos es menor a los requerimientos teóricos, debido a que no todo el carbono de los contaminantes es incorporado a la biomasa, una fracción importante pasa a CO₂ y una cantidad significativa de N orgánico es reciclado con la muerte celular (Stevenson, 1986). El utilizar menos fertilizantes bajaría los

costos para remediar una cantidad mayor de suelo, este aspecto es importante cuyo se tratan gries volúmenes de suelo contaminado. Morgan y Watkinson (1989) encontraron que las relaciones óptimas de C:N para la degradación de hidrocarburos es de 200:1.

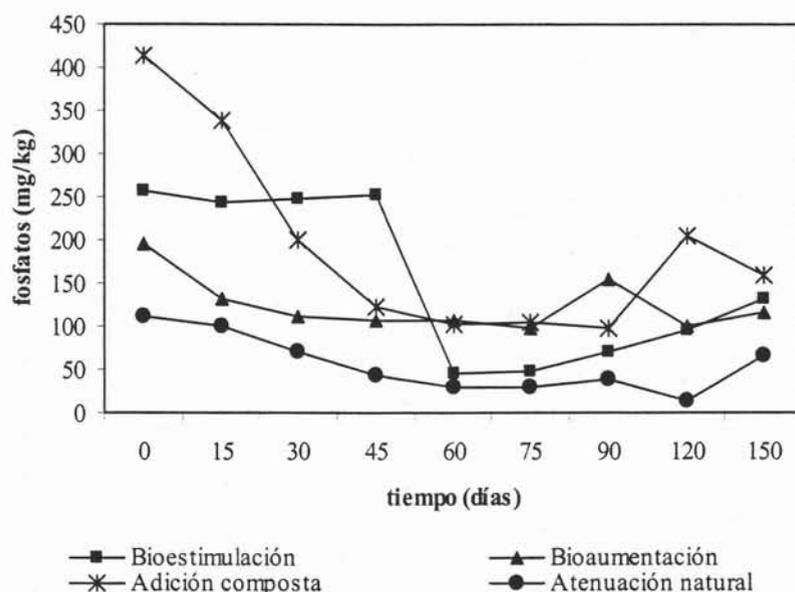


Figura 3.4. Utilización de fosfatos durante la degradación

3.3.4. Variación de la temperatura

La temperatura prácticamente permaneció alrededor de 20 °C en todas las biopilas, no obstante que el experimento se inició en época invernal, este valor estuvo dentro del intervalo óptimo para que se lleve a cabo la degradación aerobia de hidrocarburos, que es entre 15 y 20 °C (EPA, 1994). A temperaturas bajas, como son las invernales, se ha observado (Margesin y Schinner, 2001 y Thomasin-Lacroix *et al.*, 2002) que no existe degradación de muchos sustratos orgánicos, entre ellos, los hidrocarburos. Por ejemplo, en climas de entre 0 a 10 °C, la degradación tarda meses o años en llevarse a cabo. En la biopila BE existió una temperatura 2 °C mayor al resto de las biopilas que fue entre 18 y 19 °C durante el primer mes, coincidiendo este valor con su tasa más alta de biodegradación.

Al parecer las cubiertas de plástico negro contribuyeron a que la temperatura se conservara al absorber calor durante el día y conservarlo durante la noche, funcionando como un invernadero que

permitió el funcionamiento adecuado de las bacterias (Baker y Herson, 1994). Sin embargo, esto también pudo causar una disminución en oxígeno disponible para los microorganismos.

3.3.5. Porosidad

Debido a la alta porosidad del suelo (58%, típica de suelos arenosos-limosos) y a las dimensiones de las biopilas, estas no se removieron mecánicamente durante el tiempo que duró el experimento. Un buen intercambio de oxígeno con el ambiente puede darse en un terreno natural, hasta los 30 cm de profundidad (Patrick, 1977 en Rhykerd *et al.*, 1999). A esta profundidad la concentración de oxígeno varía de 5 a 15%, la cual es suficiente para que se lleve a cabo la mineralización de hidrocarburos, ya que por abajo de 10%, ha sido demostrado (Freijer, 1996) que la mineralización es muy limitada.

Para evitar una deficiencia de oxígeno, en el centro de las biopilas se hicieron unos orificios de 1 cm de diámetro en la parte superior hasta una profundidad de 30 cm, ya que una aireación adecuada es esencial para la actividad de las bacterias degradadoras. Una baja concentración de oxígeno limita la degradación de hidrocarburos en suelo (Von Wedel *et al.*, 1988),

No se puede descartar, como ya se mencionó, la limitación del oxígeno en las biopilas como consecuencia del uso de las cubiertas plásticas, que pudieron disminuir la aireación del suelo (Baker y Herson, 1994).

3.3.6. Contenido de bacterias degradadoras

La población bacteriana fue mayor en la biopila BA debido a la inoculación y en la biopila AC por la adición de composta (figuras 3.5 y 3.6). Basado en esto, se puede decir que las bacterias cultivadas y adicionadas al suelo sobrevivieron conservando su capacidad degradadora de diesel, sin embargo, el factor limitante para su desarrollo fue la falta de nutrientes en el medio. Esto se puede comprobar al observar en la biopila BA una disminución del nitrógeno y los fosfatos a través del tiempo, además de que en la biopila BE a pesar de tener una población bacteriana menor, presentó una mayor degradación del contaminante, así como una disminución drástica de nutrientes esenciales a través del tiempo. A pesar de que los microorganismos de la composta nunca habían estado en contacto con el diesel, muchos fueron susceptibles a convertirse en

degradadores como se pudo ver en la caracterización inicial, al cuantificar las bacterias en presencia de diesel como única fuente de carbono.

Se observó una mayor población de bacterias mientras existió una elevada concentración de diesel en las biopilas, lo que es un indicador de que el contaminante fue una fuente de carbono asimilable para su actividad. Sin embargo, se ha visto (Atlas, 1981) que aunque se puede correlacionar un alto número de bacterias degradadoras de hidrocarburos con la presencia de estos, no parece haber una posible correlación entre el número de degradadoras y la tasa de degradación del combustible.

En general se observó una disminución de las bacterias en todas las biopilas a través del tiempo, solo en la biopila AN hubo un aumento al final del experimento, tal vez porque debido a la antigüedad de la contaminación, en el suelo existen bacterias nativas que se han adaptado perfectamente a utilizar el diesel para sus funciones metabólicas y lo único que necesitaban era nutrientes y oxigenación. Este fenómeno se observa frecuentemente en derrames antiguos (Sorenson *et al.*, 2003 y Korda *et al.*, 1997), que en México se conocen como pasivos ambientales. Según Bundy *et al.* (2002), es frecuente que la cantidad de bacterias en el suelo contaminado con diesel disminuya a través del tiempo conforme va disminuyendo la concentración de este.

3.3.7. Biodegradación del Diesel

En la figura 3.7 se presentan las curvas de degradación del diesel. Después de 150 días de tratamiento, la concentración de diesel residual más baja se observó en la biopila BE (17.6%), demostroyo con ello que fue el mejor tratamiento. En las biopilas BA y AT, los porcentajes de diesel residual fueron de 39.69y 42.27% respectivamente, mientras que el diesel residual más alto se encontró en la biopila AC con 76.55%.

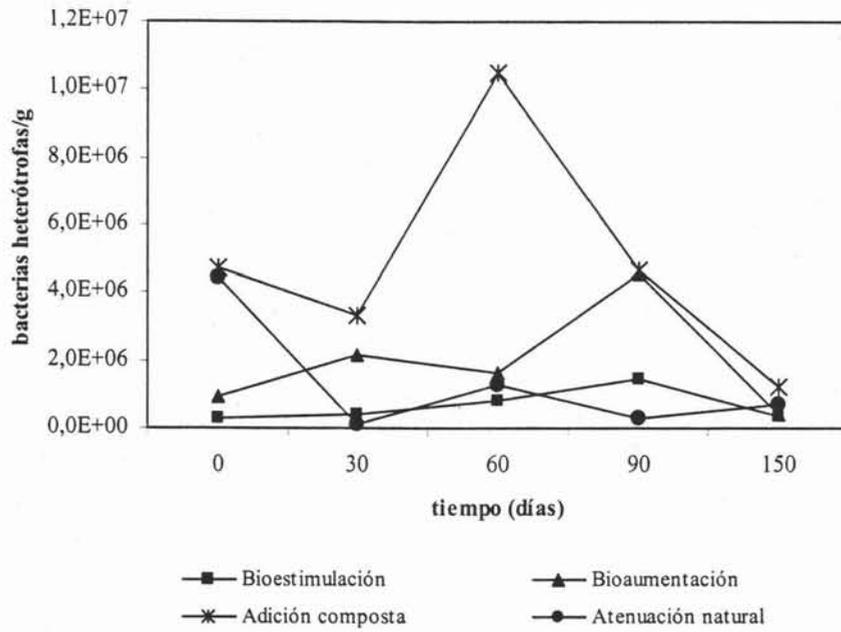


Figura 3.5. Cuantificación de bacterias heterótrofas en las biopilas

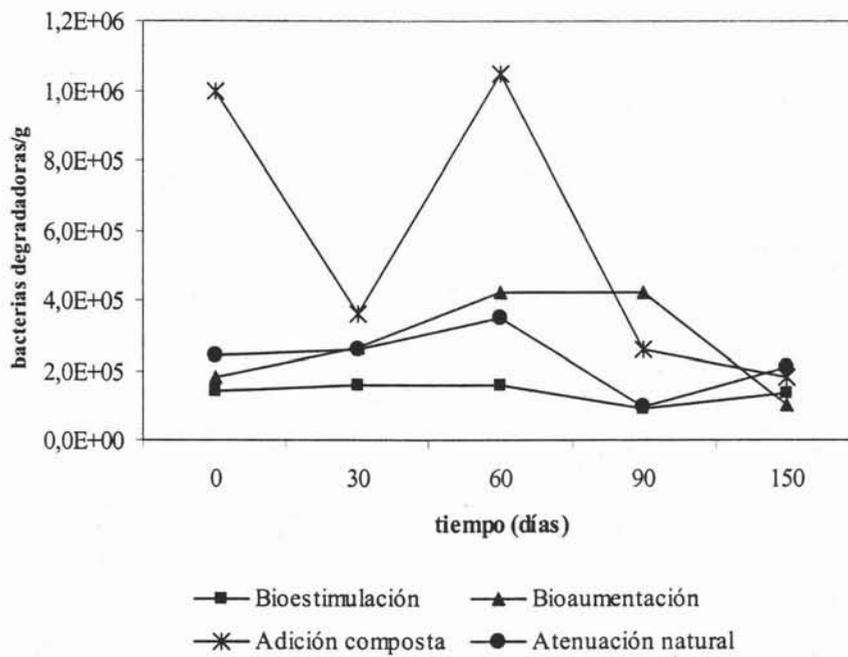


Figura 3.6. Cuantificación de bacterias degradadoras en las biopilas

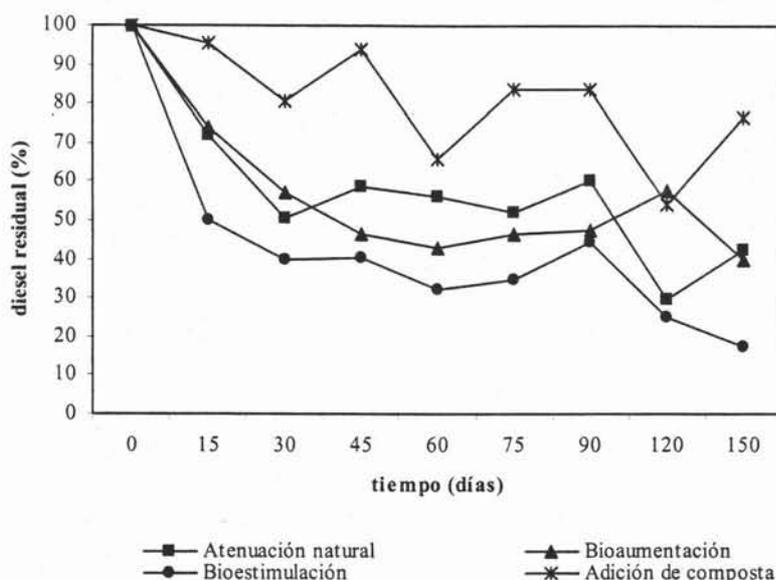


Figura 3.7. Degradación del diesel en las biopilas

El diseño experimental aplicado (Modelo al azar de Efectos Fijos con 4 Niveles) mostró que estadísticamente el tratamiento más eficiente (ANOVA $0.05 \leq P$) fue el BE alcanzando en cinco meses de tratamiento el 82.4% de degradación de diesel. Después le siguieron en eficiencia el BA y el AN con 60.31% y 57.73%, respectivamente. La adición de composta solo permitió un 23.45% de degradación de diesel. La USEPA ha establecido objetivos de remediación por arriba del 60% que en este caso particular y otros casos fueron alcanzados de uno a tres meses (Baker y Herson, 1994). La máxima degradación del diesel sucedió durante los primeros 30 días de tratamiento en las cuatro biopilas. La biopila BE presentó la tasa de degradación más alta con 68.62 mg/día, después de BA con 42.19 mg/día y la AT con 64.69 mg/día. La adición de composta fue el tratamiento con la tasa de degradación más baja, de 11.41 mg/día.

En diferentes trabajos realizados en suelos contaminados con diesel (Domínguez, 2002; Margesin y Schinner, 2001; Cunningham y Philp, 2000; Tindade *et al.*, 2003; Sorenson y Peterson, 2003) la bioestimulación alcanzó niveles de degradación de alrededor del 70%. Guzmán (2001), en cambio, encontró porcentajes de eliminación del diesel por arriba del 99% en el mismo tipo de suelo. Debe considerarse que la aplicación de esta técnica para el tratamiento de suelos

contaminados con diesel, dependerá principalmente de la cantidad de bacterias autóctonas, la cantidad de nutrientes, la concentración del combustible en el suelo y de la forma de operación.

Después del primer mes de tratamiento, la degradación del diesel en todas las biopilas comenzó a ser más lenta, probablemente se debió a la dificultad de degradar los hidrocarburos más complejos, que están en mayor proporción en combustibles con temperaturas de destilación mayores como el diesel (Song *et al.*, 1990), o bien, por cambios en la comunidad microbiana que puede perder la capacidad de degradar el diesel al final del experimento bajo las condiciones que prevalecen en el lugar (Jorgensen *et al.*, 2000).

Los niveles de hidrocarburos residuales que se degradan más lentamente, son importantes para decidir la viabilidad de la biorremediación. La naturaleza exacta de estos hidrocarburos residuales y sus cantidades no pueden ser conocidos de manera individual aunque al parecer son alcanos de cadenas ramificadas, poliaromáticos saturados (naftenos) y aromáticos, cada uno de los cuales pueden tener cadenas con grupos alquilo unidos al centro del anillo aromático. Lo anterior se deduce de los perfiles cromatográficos en los que se observa, que con el tiempo se pierden ciertos componentes, como los picos definidos que según Geerdink *et al.* (1996) son las cadenas lineales, mientras que permanecen los picos no definidos y la campana, que de acuerdo a los mismos autores corresponden a los alcanos ramificados, compuestos aromáticos y poliaromáticos. La desaparición de los picos definidos se observa más claramente en los cromatogramas correspondientes a la biopila BE (figura 3.8), los cuales fueron obtenidos bajo las mismas condiciones de análisis.

Los perfiles de las biopilas BA y AN fueron muy parecidos entre sí (figuras 3.9 y 3.11); en cambio, en la biopila AC los cambios en los picos permanecieron casi imperceptibles, solo después de cinco meses de tratamiento parece haber una disminución en en área de la campana y de los picos definidos (figura 3.10). Se hace la aclaración de que los perfiles pueden ser completamente comparables entre sí, ya que fueron obtenidos bajo las mismas condiciones de análisis y corrida cromatográfica.

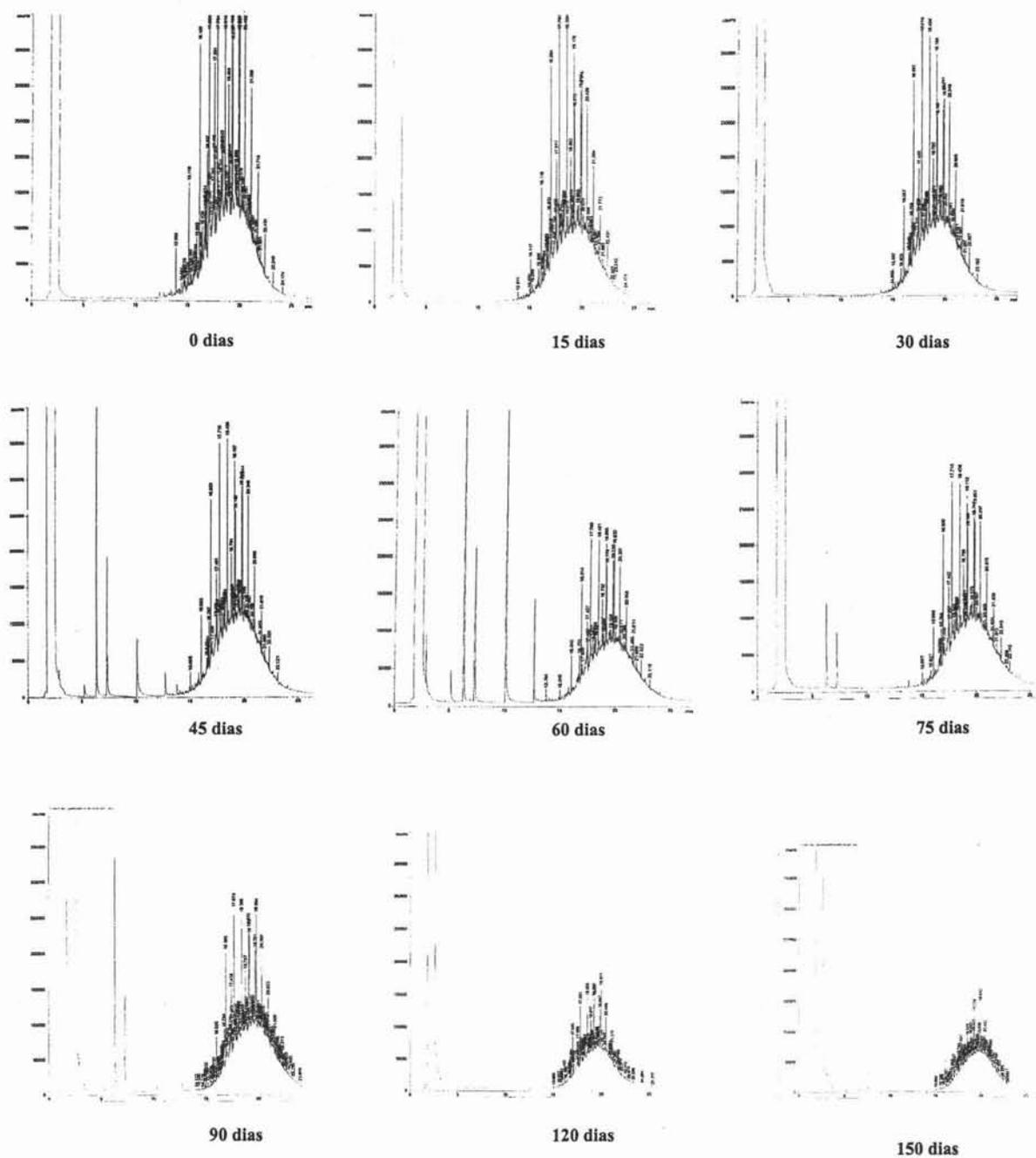


Figura 3.8. Perfiles cromatográficos durante la degradación del diesel en la biopila BE (bioestimulación)

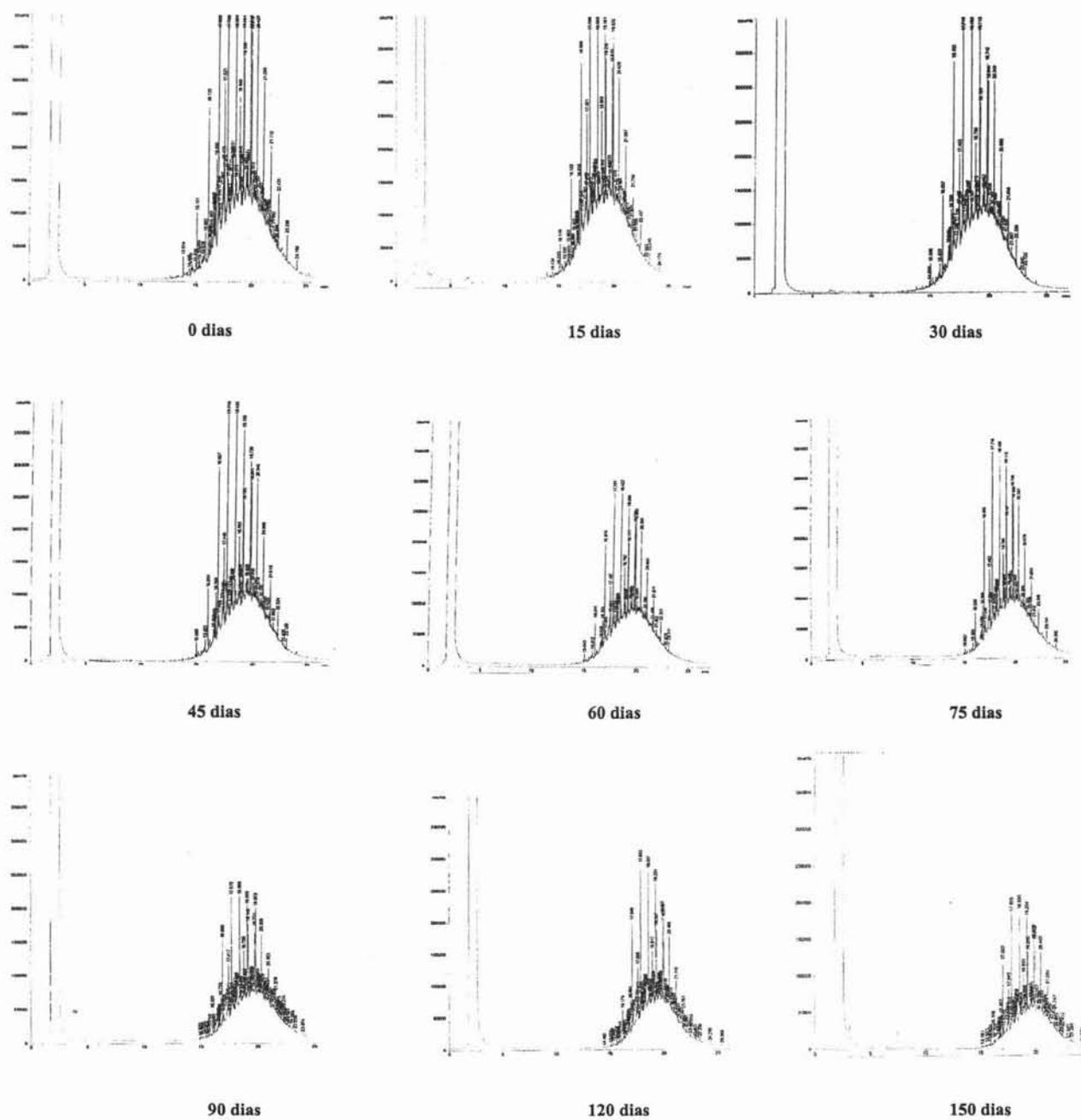


Figura 3.9. Perfiles cromatográficos durante la degradación del diesel en la biopila BA (bioaumentación)

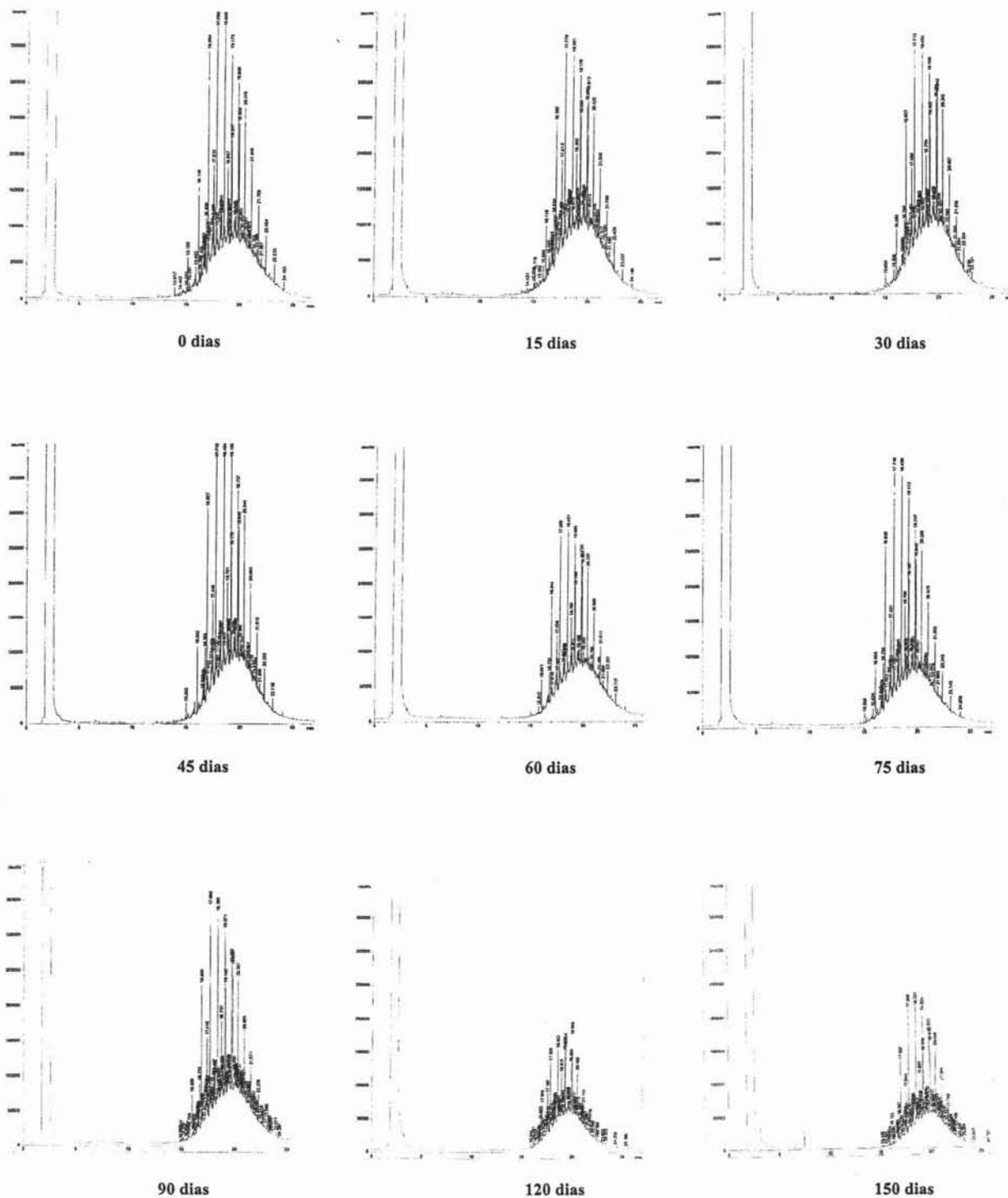


Figura 3.10. Perfiles cromatográficos durante la degradación del diesel en la biopila AC (adición de composta)

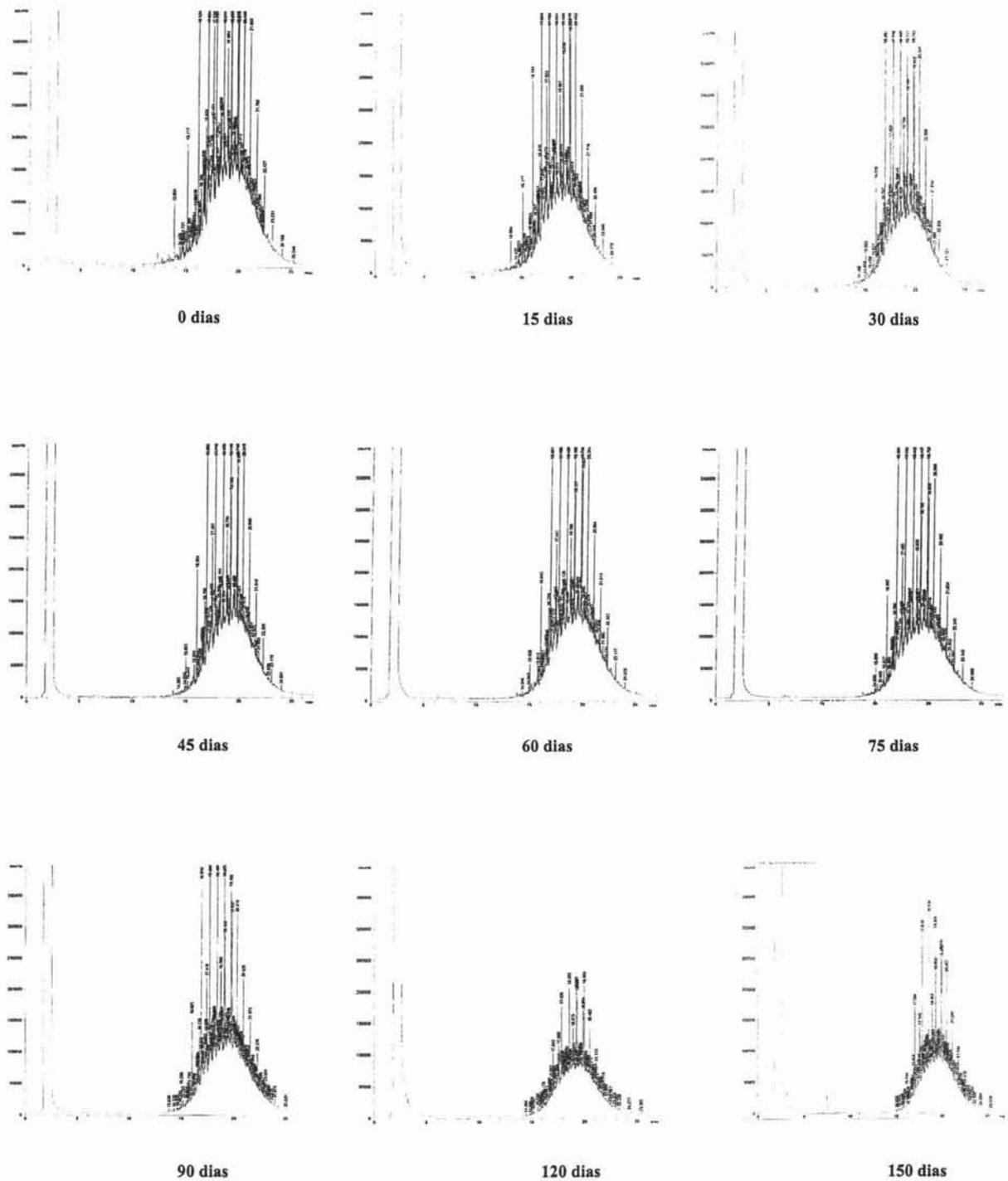


Figura 3.11. Perfiles cromatográficos durante la degradación del diesel en la biopila AN (atenuación natural)

Para casos de contaminaciones antiguas existe una menor biodisponibilidad de la fracción residual, la que permanece “encerrada” en los poros de las partículas del suelo, aunque no se puede descartar la posibilidad de que la causa de este fenómeno es que la fracción residual sea recalcitrante (Huesemann, 1997). Otra explicación puede ser los cambios en la población microbiana a los que se hizo referencia anteriormente y que muy probablemente correspondan a una dificultad para la degradación de dicha fracción residual.

De acuerdo con los resultados obtenidos se pudo demostrar que la bioaumentación realmente no favoreció la degradación del diesel, muy seguramente debido al limitado contenido de nutrientes naturales del suelo, lo que pudo ocasionar la muerte celular y que quizá la población bacteriana degradadora existente no fue suficiente para mantener por lo menos un número aceptable. Según Trindade *et al.* (2003), el orden de magnitud de bacterias que debe existir en el suelo al aplicar bioaumentación es de 10^8 UFC/g. En el presente trabajo la población bacteriana degradadora inicial fue de 10^3 UFC/g y se aumentó hasta 10^5 UFC/g que es suficiente para obtener buenos resultados de acuerdo a lo establecido por Cunningham y Philp (2000). En los experimentos realizados no se consideraron más inoculaciones, debido a que no sería viable si se planeara llevar el trabajo a una escala mayor, tomyo como base los factores costo-tiempo.

Muchos autores (Del Arco y De Franca, 1999; Vogel, 1996; Cunningham y Philp, 2000; Bundy *et al.*, 2002; Yingying, 2002) consideran que el éxito de la bioaumentación también depende de utilizar bacterias autóctonas del suelo, ya que éstas han demostrado tener la capacidad para degradar más eficientemente el diesel que las bacterias de cultivos comerciales, que no contribuyen significativamente en la degradación de los hidrocarburos y en cambio pueden representar un costo extra para los trabajos de biorremediación (Korda *et al.*, 1997; Jorgensen *et al.*, 2000; Dott *et al.*, 1989, Neralla y Weaver, 1997).

Se considera que el suelo utilizado en este estudio cuenta con una comunidad microbiana autóctona que aunque mínima, está adaptada a las condiciones físico-químicas y nutrientes prevalentes en el lugar. Muchas de las especies que son capaces de degradar los hidrocarburos existen en el suelo, sin embargo, por las condiciones experimentales establecidas no fue posible crear las condiciones para su desarrollo a través de la adición de nutrientes sólo se aumentó la población bacteriana nativa. Esto se refleja como una desventaja de la biorremediación donde las

comunidades microbianas no pueden incluir suficientes especies o enzimas requeridas para una efectiva biodegradación, tal como lo establecieron Korda *et al.* (1997). No obstante, una solución consiste en hacer lo mismo que se hizo en el presente trabajo, que fue aislar del propio suelo contaminado cepas degradadoras, producirlas escala piloto para luego inocular el suelo. Con este mismo procedimiento varios autores han obtenido buenos resultados (Roane *et al.*, 2001; Korda *et al.*, 1997; Trindade, 2003), en cambio, las especies ajenas introducidas presentan ciertas desventajas entre las que se encuentran su pérdida de viabilidad, el tiempos largos de adaptación, tasas bajas de degradación, patogenicidad a humanos, baja estabilidad genética, incertidumbre de que se trate de organismos manipulados genéticamente, la gran cantidad de microorganismos requeridos con una frecuente aplicación en el sitio para mantener una proporción y el destino de estos microorganismos una vez completada la biorremediación (Korda, 1997; Milcic-Tercic y Saval, 2000).

Los cultivos comerciales pueden ser utilizados sobretodo en los casos de emergencias ambientales, en sitios contaminados con un solo compuesto o donde la concentración de hidrocarburos sea relativamente baja.

El suelo utilizado en este estudio fue pobre en los nutrientes esenciales (N y P), por lo que seguramente las bacterias inoculadas no pudieron sobrevivir por mucho tiempo y con una mínima concentración de nutrientes esenciales. En cambio las bacterias autóctonas que habían estado en contacto con el diesel durante un largo tiempo, debido a la antigüedad de la contaminación, degradaron casi a la misma velocidad el combustible. Esto explica por que las biopilas BA y AN tuvieron casi el mismo patrón de degradación y perfil cromatográfico.

Se ha visto frecuentemente en suelos en donde existe una contaminación antigua, que después de haber realizado alguna manipulación en el suelo, la actividad microbiana nativa se dispara (Margesin y Schinner, 2001; Sorenson y Peterson, 2003). Sin embargo, en dichos trabajos la atenuación natural ha dado resultados durante el primero y segundo año de operación con una reducción del 70% del diesel, mientras que en el presente trabajo se obtuvieron tasas de eliminación del 57.73% en cinco meses. Tal vez un factor importante a considerar es la temperatura, los trabajos realizados por dichos autores se han desarrollado en países con temperaturas muy frías y autores como Margesin y Schinner (2001) consideran que ésta afecta no

sólo la tasa de biodegradación, si no también la naturaleza física y composición química de los hidrocarburos. Además, se considera que se debe dar tiempo a los microorganismos para que produzcan enzimas cuya función sería la de un surfactante durante la degradación de los contaminantes. Se ha demostrado que existen muchas especies microbianas en el suelo capaces de producir surfactantes naturales que les ayudan a tener los hidrocarburos biodisponibles (Margesin y Schinner, 2001; Ron y Rosenberg, 2002; Christofi y Ivshina, 2002).

La adición de composta (AC) fue el tratamiento menos eficiente muy probablemente se debió a la adsorción del diesel en la matriz orgánica de la composta, situación que redujo la biodisponibilidad de los compuestos (Weissenfels *et al.*, 1992). La sorción de compuestos orgánicos en suelo se incrementa con el contenido de materia orgánica (Mens *et al.* 1980) y como se pudo observar la composta utilizada en este trabajo es extremadamente rica en materia orgánica. Lo anterior podría indicar que no era una composta madura y de ser así, los microorganismos utilizaron como fuente de carbono la materia orgánica susceptible de ser degradada en lugar del diesel. Este fenómeno también ha sido observado en otros estudios (Laine y Jorgensen, 1996), en donde la adición de composta fue considerada como no favorable para la remediación de xenobióticos. Otra razón por la cual la degradación fue menor en la pila AC puede atribuirse a una relación inapropiada suelo contaminado-agente orgánico, la cual puede retardar o inhibir la actividad microbiana por el exceso de compuestos orgánicos (Thomas *et al.* 1992 en Namkoong *et al.* 2002). Los resultados obtenidos en esa investigación, indicaron que una excesiva adición de composta retardó la degradación del combustible. La relación de la mezcla suelo:composta depende del tipo y madurez de la composta, por ejemplo, una composta madura es un material biológicamente estable por lo que al adicionarla al suelo contaminado no funciona como una fuente de carbono competidora (Namkoong *et al.* 2002).

La aparente fase estacionaria en las curvas de degradación observadas al final del experimento, puede estar relacionada con la rápida degradación de los n-alcenos en una etapa temprana, y a que después quedan los compuestos de peso molecular más altos, los cuales son más resistentes a la degradación teniendo como efecto una disminución en la tasa de biodegradación (Namkoong *et al.*, 2002). No obstante, después de cinco meses de tratamiento, las biopilas BA y BE alcanzaron niveles de limpieza por debajo de 2000 mg/kg que fue el límite permisible utilizado como referencia para un suelo de uso industrial.

De Jonge *et al* (1997) reportó que las concentraciones residuales de n-alcanos disminuyeron con el incremento del número de carbonos, demostrando que el número de carbonos de los n-alcanos influyen en la tasa de biodegradación.

Los hidrocarburos poliaromáticos comúnmente normados como son el benzopireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno y criseno que son posibles carcinógenos a humanos, estuvieron presentes desde el inicio en concentraciones muy bajas, por debajo de los límites permisibles utilizados como referencia; inclusive algunos de ellos desde el primer mes fueron no detectables. Las variaciones en sus concentraciones a través del tiempo más bien se debe a la heterogeneidad del suelo. La biopila AC presentó una menor cantidad de hidrocarburos poliaromáticos, dada la dilución del suelo con la composta.

La concentración de hidrocarburos poliaromáticos disminuyó en todas las biopilas a través del tiempo, lo cual se debió probablemente a la remoción por hidrólisis, que incrementa hasta 15% con la incubación (Käster y Mahro, 1996), y/o por degradación bacteriana. Se descartó la posibilidad de que los poliaromáticos se hayan reducido por volatilización, ya que ésta es mínima, además de que las biopilas estuvieron tapadas con plástico precisamente para evitar este fenómeno. En estudios de suelo contaminado con diesel al que se añadió composta (Namkoonng *et al.*, 2002 y Joyce *et al.*, 1998), se observó que la tasa de volatilización fue apenas arriba del 2%, que no fue significativo comparado con la biodegradación que en condiciones óptimas alcanza degradaciones de arriba del 95% (Sudip *et al.*, 2002). Jackson (1992) observó que sólo el 5% del diesel no intemperizado puede ser volátil. Por otro lado, Zhou y Crawford (1995) establecen que la degradación de hidrocarburos frescos es menor a la que se observa con intemperizados

3.4. Análisis del diseño experimental

3.4.1 Comprobación de idoneidad del modelo

Previamente se hizo notar que las suposiciones que fundamentan el análisis de variancia es que los datos se ajusten al modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_i + \varepsilon_{ij}$$

además, que los datos sean independientes y que tengan una distribución normal. Para comprobar la normalidad se realizó un histograma de residuos, cuyos datos aparecen en la tabla 3.4. La comprobación de idoneidad del modelo se hizo al graficar los residuos, comúnmente se recomienda que tal comprobación sea un diagnóstico de rutina en cada diseño experimental.

Tabla 3.4. Residuos ordenados y puntos de probabilidad para los datos de biodegradación de diesel

Orden k	Residuo ε_{ij}	$P_k = (k - 1/2) / 36$
1	-28.14	0.013
2	-27.51	0.041
3	-25.04	0.069
4	-17.67	0.097
5	-17.14	0.125
6	-15.73	0.152
7	-15.65	0.180
8	-13.79	0.208
9	-10.60	0.236
10	-10.40	0.263
11	-10.28	0.291
12	-9.42	0.319
13	-8.20	0.347
14	-7.33	0.375
15	-5.99	0.402
16	-4.90	0.430
17	-2.69	0.458
18	-2.12	0.486
19	-1.99	0.513
20	-0.61	0.541
21	0.23	0.569
22	0.68	0.597
23	0.70	0.625
24	1.7	0.652
25	2.04	0.680
26	2.04	0.708
27	2.24	0.736
28	7.31	0.763
29	12.34	0.791
30	13.81	0.819
31	14.11	0.847
32	17.34	0.875
33	18.55	0.902
34	42.08	0.930
35	43.17	0.958
36	57.36	0.986

Para comprobar la suposición de normalidad se construyó una gráfica de probabilidad normal de los residuos, en donde se graficaron los residuos ordenados contra su punto de probabilidad acumulada.

La gráfica de probabilidad normal aparece en la figura 3.12, con los residuos graficados contra $(1-P_k) \times 100$ en la escala vertical izquierda. En la parte inferior de esta figura se presenta un diagrama de puntos de los residuos. Al observar esta representación gráfica se ve una distribución ligeramente sesgada con el extremo derecho más largo que el izquierdo. La tendencia de la gráfica de probabilidad normal de desviarse hacia abajo en el lado izquierdo implica que la distribución del error, es más “reducido” que lo esperado en una distribución normal, es decir que los residuos negativos no son tan grues (valor absoluto) como se esperaba. Sin embargo, esta gráfica no es demasiado anormal (Montgomery, 1991) dado que la mayor concentración de valores están en el centro de la campana.

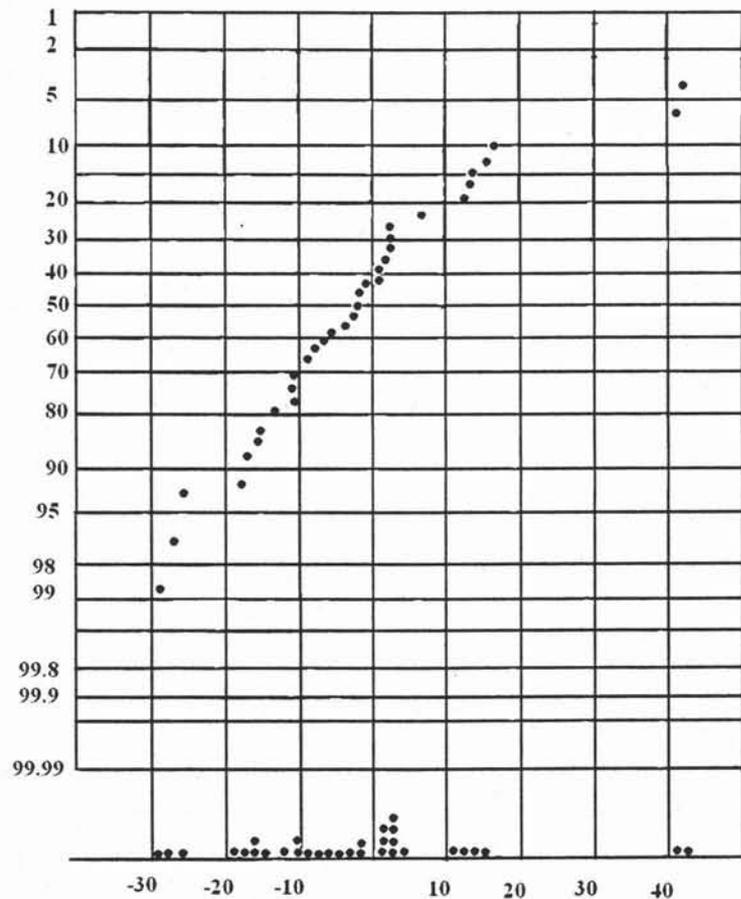


Figura 3.12. Gráfica de probabilidad normal de los residuos para degradación del diesel

También se pudo observar que la gráfica parece una línea recta tomyo como referencia los valores centrales, lo cual fue un indicativo de que la distribución de los errores es normal. Al visualizar dicha línea se debe poner más énfasis en los valores centrales de la gráfica que en los extremos (Montgomery, 1991).

Después de comprobar la normalidad de los datos se aplicó una prueba de independencia, para detectar alguna correlación entre ellos. Una manera de hacer esto fue graficoy los residuos contra el tiempo (figura 3.13), en donde se pudo observar que los datos son independientes pues no existen rachas con residuos positivos o negativos que indicaran una correlación positiva.

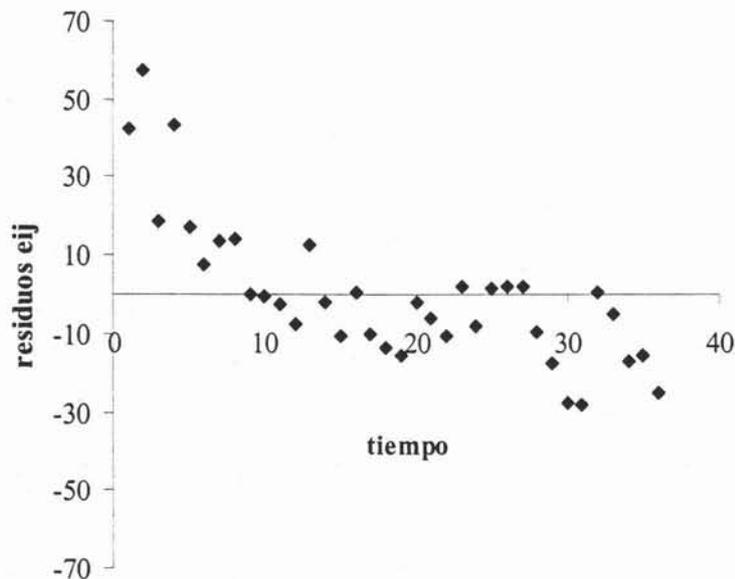


Figura. 3.13 Gráfica de residuos contra el tiempo

Graficar los residuos contra el orden del tiempo en el que se recopilaron los datos fue útil para detectar una correlación entre ellos. Una tendencia a tener rachas con residuos positivos y negativos indica una correlación positiva, lo que hubiese indicado que la suposición de que los residuos son independientes no era cierta. Para asegurar la independencia de los datos, se realizó

un sorteo para asignar el orden en que se tomaría la muestra de suelo cada vez (número entre paréntesis tabla 3.5). Según Montgomery (1991), un paso importante para obtener la independencia es realizar un procedimiento apropiado de aleatorización.

Tabla 3.5. Observaciones realizadas para cada tiempo

TRATAMIENTOS		OBSERVACIONES (% de diesel residual)								
		100	72.03	50.59	58.62	55.93	51.93	60.16	29.78	42.27
Testigo (atenuación natural)	(2)	(6)	(11)	(14)	(17)	(24)	(25)	(29)	(36)	
	100	74.17	57.06	46.23	43.04	46.43	47.41	57.51	39.69	
Bioaumentación	(4)	(5)	(9)	(15)	(18)	(22)	(28)	(32)	(34)	
	100	49.95	39.95	40.52	32.06	34.44	44.34	24.97	17.60	
Bioestimulación	(3)	(7)	(10)	(13)	(19)	(23)	(27)	(30)	(33)	
	100	95.26	80.84	93.79	65.72	83.49	83.49	53.94	76.55	
Adición de composta	(1)	(8)	(12)	(16)	(20)	(21)	(26)	(31)	(35)	

↓ j = 1, 2, ..., n
→

Una vez que se comprobaron la normalidad e independencia de los datos se aplicó el análisis de variancia para un diseño de experimentos: Modelo al Azar de Efectos Fijos con 4 Niveles, cuyos resultados se muestran en la tabla 3.6. De este análisis se concluyó que sí existe una diferencia significativa en el porcentaje de diesel residual entre los cuatro tratamientos

Tabla 3.6. Análisis de variancia para los datos de diesel residual

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F ₀
Tratamientos	8850.36	3	2950.12	
Error	5570.33	32	174.07	16.94 ^a
Total	14420.69	35		

^asignificativa al 5%

Dado que se rechazó la hipótesis nula $H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4$, se aplicó el método de la mínima diferencia significativa (LSD) para probar $H_0: \mu_i = \mu_j$, para toda $i \neq j$, cuyos resultados se muestran en la tabla 3.7. Una pareja de medias difieren significativamente si el valor absoluto de la diferencia de promedios en los tratamientos correspondientes es mayor a 12.66. Por lo tanto los únicos tratamientos que no tuvieron una diferencia significativa fueron los aplicados en las biopilas BA y AN.

A partir de los resultados obtenidos en el análisis anterior, así como de los porcentajes de diesel residual, se puede concluir que el mejor tratamiento fue el BE (bioestimulación).

Tabla 3.7. Análisis de LSD (least significant difference) para diesel residual

Media de los Tratamientos	Diferencia de Medias	LSD
$\check{Y}_1 = 42.64$	$\check{Y}_1 - \check{Y}_2 = -14.19$	12.66 ^a
$\check{Y}_2 = 56.83$	$\check{Y}_1 - \check{Y}_3 = -38.81$	
$\check{Y}_3 = 81.45$	$\check{Y}_1 - \check{Y}_4 = -15.28$	
$\check{Y}_4 = 57.92$	$\check{Y}_2 - \check{Y}_3 = -24.62$	
	$\check{Y}_2 - \check{Y}_4 = -1.09$	
	$\check{Y}_3 - \check{Y}_4 = 23.53$	

^asignificativa al 5%

3.5. Crecimiento de especies vegetales

Después de aplicarse un tratamiento de remediación a un suelo contaminado, lo deseable es realizar estudios de toxicidad para obtener información acerca de los niveles de limpieza alcanzados y conocer la existencia de subproductos de la degradación que puedan ser tóxicos. Los análisis de fitotoxicidad son más rápidos y baratos, aunque menos sensibles que otros estudios.

Otra forma de apreciar que un suelo ha sido remediado, es promover el crecimiento de especies vegetales, aunque no se trate realmente de un estudio, una cubierta vegetal no es solamente estética, sino también evita problemas de erosión asociados al viento y la lluvia.

Después de los 5 meses de tratamiento se retiró el plástico negro que cubría la biopila en donde se aplicó atenuación natural. Se cambió la cubierta plástica general por una transparente, esto con el fin de permitir el paso de la luz para el crecimiento de especies vegetales, y se continuó con el riego únicamente con agua. Después de 15 días, se observó el crecimiento de especies vegetales nativas de la zona (Figura 3.14), así como de algunos musgos.



Figura 3.14. Algunas especies vegetales creciendo en la biopila de atenuación natural (AN)

Posteriormente se sembraron, en la misma biopila, semillas de una especie vegetal resistente como lo es el frijol y de una especie sensible como el jitomate. A la semana de la siembra se observó un crecimiento de las plántulas (Figura 3.15). Un criterio de selección de las semillas sembradas fue el tomar en cuenta los cultivos vegetales que se encuentran rodeo los ductos de diesel en el campo. Dichos cultivos sufren daños ocasionados por el combustible que es derramado en el suelo debido a las tomas clyestinas.



Figura 3.15. Planta de frijol en la biopila de atenuación natural después de cinco meses de tratamiento

El crecimiento de especies vegetales en el suelo de la biopila AN indicó que los niveles de limpieza alcanzados fueron suficientes como para soportar el crecimiento de una cubierta vegetal y que los productos residuales que pudieron permanecer en el suelo no son fitotóxicos, al menos para las especies consideradas.

En suelos saturados con hidrocarburos las plantas herbáceas mueren inmediatamente, en cambio, los efectos en los árboles y matorrales se manifiestan hasta varios meses después del derrame, pero a bajas concentraciones se han encontrado incluso efectos benéficos (Frankenberger, 1992). Según Bossert y Bartha (1984), así como Frankenberger (1992), los hidrocarburos tienen efectos negativos en las plantas, ya sea toxicidad por contacto directo o indirecto por la interacción de los hidrocarburos con los componentes abióticos y microbianos del suelo.

En los climas templados se da más fácilmente la recuperación vegetal que en los climas árticos y subárticos y los suelos más ricos en nutrimentos y humus tendrán una mayor capacidad de recuperación (Bossert y Bartha, 1984).

Conclusiones

- A partir del análisis estadístico del diseño experimental aplicado, se comprobó que la bioestimulación fue el tratamiento más eficiente para reducir la concentración de diesel, mientras que la adición de composta fue el menos eficiente.
- Los únicos tratamientos que no fueron significativamente diferentes fueron el de bioaumentación y el de atenuación natural.
- La adición de nutrientes (bioestimulación) favoreció la actividad microbiana, alcanzando 82.4 % de degradación de diesel en 5 meses.
- La inoculación del suelo con bacterias degradadoras (bioaumentación) no aceleró los tiempos de degradación, porque no sobrevivieron los microorganismos adicionados.
- El suelo contaminado utilizado en el estudio fue pobre en nutrientes esenciales (N y P), así como en bacterias degradadoras.
- La composta fue rica en nutrientes esenciales pero no disponibles, y bacterias heterótrofas susceptibles de convertirse en degradadoras, sin embargo, su adición no favoreció la degradación del combustible por su adsorción en la matriz orgánica de esta.
- Al cabo de 5 meses, las bacterias degradadoras de diesel se encontraron en mayor proporción en las biopilas de bioestimulación y de atenuación natural.
- En el suelo utilizado si existían bacterias nativas con capacidad para degradar diesel, ya así lo demostraron las tasas de biodegradación obtenidas.
- Aún con la presencia de diesel residual se comprobó el desarrollo de especies vegetales en la biopila de atenuación natural.

- Se confirma la conveniencia de realizar pruebas de biotratabilidad antes de aplicar alguna estrategia de biorremediación en un suelo contaminado.

Recomendaciones

- Adicionar menor cantidad de composta para evitar una posible adsorción del contaminante en la matriz de ésta. Asimismo, cerciorarse de que la composta está madura para que no contenga materia orgánica susceptible de ser utilizada por los microorganismos como fuente de carbono.
- Verificar si las cantidades de N:P adicionadas deben ser menores a las teóricas, ya que no todo es utilizado por los microorganismos.
- Quitar las cubiertas de plástico negro de las biopilas diariamente por un periodo de tiempo determinado sería una buena opción para permitir el paso del aire por las galerías y así evitar que el oxígeno sea un factor limitante en la degradación del combustible.
- Remover las pilas para permitir una mayor aireación.

Bibliografía

1. Aguilar A., 1995. *Retos y oportunidades de la ciencia del suelo en el siglo XXI*. **Tierra**, México. 13 (1): 3-16.
2. Aguilera N., 1989. *Tratado de Edafología de México*. Facultad de Ciencias, UNAM. 222 p.
3. Alexander M., 1981. *Introducción a la microbiología del suelo*. AGT Editores, México. 219-240.
4. Atlas R. M., 1981. *Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective*. **Microbiol Rev.** 45:180-209.
5. Baker K. H. and Herson D. S. 1994. *Bioremediation*. McGraw-Hill, USA. 375.
6. Biddlestone A. and Gray K., 1994. *Composting*. In *Compressive Biotechnology: The Principles, Applications and Regulations of Biotechnology in Industry, Agriculture and Medicine*. Murray Moo-Young (ed).
7. Bitton, G. 1999. *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss, USA. 39-51 p.
8. Block R. N., Allworth N. and Bishop M., 1991. Assessment of diesel contamination in soil. En *Hydrocarbon Contaminated Soils*. Calabrese y Kostecki. Chelsen, Michigan, Lewis Publishers, USA. 65-88 p.
9. Bossert I. and Bartha R. 1984. *The fate of petroleum in soil ecosystems*. In *Petroleum Microbiology*. Macmillan Publishing Company, New York, USA.

10. Box, G. E. P., Hunter, W. G. and Hunter, J. S. 1999. *Estadística para Investigadores: Introducción al Análisis de Experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*. Reverté, México. 318-319.
11. Britton N. L. 1984. *Microbiological degradation of aliphatic hydrocarbons*. In *Microbiological Degradation of Organic Compounds*. D.T Gibson (ed). Microbiology Series 13: 89-129.
12. Bundy J. G., Porton G. I. and Campbell C. D. 2002. *Microbial communities in different soils do not converge after diesel bioremediation*. **J Appl Microbiol.** 92: 276-288.
13. Cabrera M. L., Kissel D. E. and Bock B. R. 1991. *Urea hydrolysis en soil: effect of urea concentration and pH*. **Soil Biol Biochem.** 23 (12): 1121-1124.
14. Cano-Santana Z. y Meave J., 1996. *Sucesión primaria en derrames volcánicos: el caso del Xitle*. Ciencias, México, No. 41 (enero-marzo): 58-68.
15. Christofi N. and Iushina I. B. 2002. *Microbial surfactants and their uses in field studies of soil remediation*. **J Appl Microbiol.** 92: 915-929.
16. Cole G. M. 1994. *Assessment and remediation of petroleum contaminated sites*. Lewis Publishers, London.
17. Cole M. A., 1998. *Remediation of soil contaminated with toxic organics compounds*. In, *Beneficial Coutilization of Agricultural, municipal and Industrial By-products*. Kluwer Academic Publishers Printed, The Netherlands. 175-194.
18. Cookson J. T., 1995. *Bioremediation Engineering*. McGraw-Hill, Inc. USA. 524.
19. Cueramerica, 2003. www.cueroamerica.com

-
20. Cunninham C. J. and Philip J. C. 2000. *Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex-situ treatment of diesel contaminated soil*. **Land Contamination and Remediation**. 8 (4). 261-270.
21. De Jonge H., Freijer J. I., Verstraten J. M., Westervel J., Van der Wielen F. W. M. 1997. *Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils*. **Environ. Sci. Technol.** 771-775.
22. Del Arco J. P. and De Franca F. P. 1999. *Biodegradation of crude oil in sandy sediment*. **International Biodeterioration and Biodegradation**. 44. Sept-oct. 87-92.
23. Deni J. and Pennicky M. J. 1999. *Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon polluted soil*. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (9): 4008-4013.
24. Deyta A. L., 1999. *Caracterización de dos suelos contaminados con gasolina y evaluación de su capacidad degradadora de hidrocarburos monoaromáticos*. Tesis de Posgrado en Biotecnología, Facultad de Química, UNAM.
25. Domínguez A., 2001. *Pruebas de biotratibilidad de un suelo contaminado con diesel mediante el uso de texturizantes orgánicos*. Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM.
26. Dott W., Feideker D., Käpfer P., Schleibinger H., Strechel S. 1989. *Comparison of autochthonous bacteria and commercially available with respect to their effectiveness in fuel oil degradation*. **J. Indust. Microbiol.** 4: 365-374.
27. EPA, 1994. *Biopiles*. www.epa.gov/OUST/pubs/tum_ch4.pdf
28. EPA, 1996. *Environmental Engineering Sourcebook*. Ann Arbor Press, Inc. 375 p.
29. EPA, 1999. *Bioremediation in Oil Spill Response*. www.epa.gov/oilspill/docs/epaupd9.pdf
-

-
30. EPA, 2004. www.epa.gov
31. EPA, 2004. www.epa.gov/ORD/SITE/reports/540r01500.pdf
32. Estadísticas Ambientales:
http://148.233.168.204/estadisticas_ambientales/compendio/02medio_ambiente/suelos.html
33. Feenestra S. and Cherry J. A., 1988. *Subsurface contamination by dense non-aqueous phase liquid (DNAPL) chemicals*. International Groundwater Symposium. International Association of Hydrogeologist. Nova Scotia, Canada: 15.
34. Freezy R. A. and Cherry J. A. 1979. *Gruondwater*. Prentice-Hall, New Jersey. USA.
35. Fortin J., Jury W. and Anderson M. A. 1997. *Enhanced removal non-aqueous phase liquids from saturated soil using surfactants solutions*. **J. Contaminated Hydrology**. 2483: 247-267.
36. Frankenberger W. T. 1988. *Use of urea as nitrogen fertilizer in bioreclamation of petroleum hydrocarbons in soil*. **Environ. Contam.** 40: 66-78.
37. Foth S., Turk L. M. y Millar C. 1980. *Fundamentos de la ciencia del suelo*. Cia. Editorial Continental, México. 121-166.
38. Freijer J. I., Verstraten J. M., Westerveld J., Van der Wielen F. W. M. 1996. *Assessing mineralization rates of petroleum hydrocarbons in soils in relation to environmental factors and experimental scale*. **Biodegradation**. 7: 487-500.
39. Geerdink M. J., Van Loosdrecht M. C., and Lybenk. Ch. A. M. 1996. *Biodegradability of diesel oil*. **Biodegradation**. 7: 73-81.

-
40. Gibson D. T. and Subramanian V. 1984. *Microbial degradation of aromatic hydrocarbons*. In *Microbial Degradation of Organic Compounds*. Microbiology Series 13: 181-252.
41. Godsy E. M., 1994. *Microbiological and geochemical degradation processes*. Symposium on Natural Attenuation of Ground Water. EPA, september. 40-42.
42. Guzmán A., G. 2001. *Pruebas de biotratibilidad de agua subterránea y suelos contaminados con mezclas de gasolina y diesel*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, UNAM.
43. Heusemann M. E. 1997. *Incomplete hydrocarbon biodegradation in contaminated soil: limitation in bioavailability or inherent recalcitrance?* **Bioremediation J.** 1, 27-39.
44. IEA, 1999. International Energy Agency. www.iea.org/weo/division.htm
45. Jackson J. D. 1992. *In situ bioremediation of diesel contaminated soils*. Memories of 5th Annual Symposium of Arizona Hydrological Society. Arizona. 309-316.
46. Jespersen G., Jerger M. and Exner D., 1993. *Biorremediation tackles hazwaste*. **Chemical Engineering**. June. 116-122.
47. Jorgensen K. S., Pustinen J. and Suortti A. M., 2000. *Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil by composting in biopiles*. **Environ. Pollut.** 107: 246-254.
48. Joyce J. F., Sato C., Cardenas R., and Surampalli R. Y. 1998. *Composting of polycyclic aromatics hydrocarbons in simulated municipal waste*. **Water Environmental Research.** 70. 356-361.
49. Kästner M. and Mahro B., 1996. *Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils affected by the organic matrix of compost*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 44: 668-675.
-

-
50. Korda A., Santas P., Tenente A. and Santas R. 1997. *Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in-situ treatments and commercial microorganism currently used*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 677-686.
51. Laine M. and Jorgensen K. 1996. *Straw compost and bioremediated soils as inocula for remediation of chlorofenol- contaminated soil*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 62 (5): 1507-1513.
52. Leahy J. G. and Colwell R. R. 1990. *Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment*. **Microbial Reviews.** 54 (3): 305-315.
53. Lim D., 1998. *Microbiology*. McGraw-Hill, USA. 720
54. Little T. M. y Hills J.F. 1983. *Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura*. TRILLAS, México. 49-51.
55. Margesin R. and Schinner F. 1998. *Biodegradation of anionic surfactant sodium dodecyl sulfate at low temperatures*. **International Biodeterioration and Biodegradation.** 41 (2): 139-143.
56. Margesin R. and Schinner F. 2001. *Bioremediation natural attenuation and biostimulation of diesel-oil contaminated soil in an Alpine Glacier Skiing area*. **Appl. Environ. Microbiol.** 67 (7): 3127-3133.
57. Means J. G., Wood S. G., Hassett J. J. and Banwart W. L. 1980. *Sorption of polynuclear aromatics hydrocarbons by sediments and soils*. **Environ. Sci. Technol.** 14: 1524-1528.
58. Méndez I. 1976. *Lineamientos generales para la planeación de experimentos*. IIMAS, UNAM. México. 25 p.

-
59. Milcic-Tercic J. y Saval S., 2000. *Bioseguridad en microbiología ambiental*. TEOREMA, México. Septiembre-Noviembre. 12-15.
60. Milcic-Tercic J., López-Vidal Y., Vrvic M. M. and Saval S. 2000. *Biodegradation potential assessment of microbial consortia isolated from a diesel contaminated soil*. **Wat. Sci. Technol.** 42: 403-406.
61. Montgomery D. C. 1991. *Diseño y análisis de experimentos*. Iberoamericana, México. 589.
62. Morgan P., and Watkinson R. J. 1989. *Hydrocarbon degradation in soils and methods for soil biotreatment*. **Crit. Rev. Biotech.** 8 (4): 305-333.
63. Namkoong W., Hwang Y., Park J., Choi J. 2002. *Bioremediation of diesel contaminated soil with composting*. **Envir. Pollut.** 119. 23-31.
64. Neralla S. and Weaver R. W. 1997. *Inoculants and biodegradation of crude oil floating on march sediments*. **Bioremediation J.** 1: 89-96.
65. NOM-021-RECNAT-2000. *Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis*. Diario Oficial de la Federación, 31 de diciembre del 2002. México.
66. NOM-EM-138-ECOL-2002. *Que establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, la caracterización del sitio y procedimientos para la restauración*. Diario Oficial de la Federación. Agosto 20 del 2002. 43-53.
67. Orantes J. L. 2002. *Aplicación de surfactantes en sitios contaminados con hidrocarburos*. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería, UNAM. México.

-
68. Palencia H., 1997. Química de Hidrocarburos. *Memorias del curso de Biorremediación de Suelos y Acuíferos contaminados con hidrocarburos*. Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, México, D. F.
69. Pelczar M. J., Reid R. and Chan E. C. 1982. *Microbiología*. McGraw-Hill. México. 243.
70. PEMEX. 2003. www.pemex.gob.mx
71. Pérez N., 1999. *Caracterización microbiológica del subsuelo subyacente a canales de aguas residuales en la zona de Chalco, Estado de México*. Tesis Licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, UNAM.
72. Porta J., López Acevedo M. y Roquero de Laburu C. 1994. *Edafología para la Agricultura y el Medio Ambiente*. Mundi-Prensa, España. 807 p.
73. PROFEPA, 1999. *Aportaciones del GDT a la gestión de suelos contaminados*. www.profepa.gob.mx/saa.audita63.htm
74. PROFEPA. 2000. Disposiciones y procedimientos para la caracterización y restauración de suelos contaminados. www.profepa.gob.mx/saa
75. Rhykerd R. L., Crews B., McInnes K. J. and Weaver R. W. 1999. *Impact of bulk agents, forced aeration and tillage on remediation of oil- contaminated soil*. **Bioresource Technology**. 67: 279-285.
76. Roane T. M., Josephson K. L. and Pepper I. L. 2001. *Dual-bioaugmentation strategy to enhanced remediation at cocontaminated soil*. **Appl. Environ. Microbiol.** 67 (7): 3208-3215.

-
77. Roldan G. A., 2001. *Biopilas como alternativa de tratamiento para la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos*. Tesis Posgrado en Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería, UNAM.
78. Romero H. M., 2000. *Estudios de biodegradación de diesel en columnas experimentales empacadas con suelo*. Tesis de Licenciatura en Química Biología Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
79. Ron E. Z. and Rosenberg E. 2002. *Biosurfactants and oil bioremediation*. **Current Opinion in Biotechnology**. 13: 249-252.
80. Roy, J. I. 1997. www.miliarium.com/paginas/Prontu/Tablas/Química/Contaminantes.htm
81. Romantschuk M., Srand I., Petänen T., Peltola R., Jonson-Vihanne M., Koivula T., Yrjäjä and Haahtela K. 2000. *Means to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches*. **Environ. Poll.** 107:179-185.
82. Ruíz I. 2002. *Estimulación de cultivos microbianos degradadores de hidrocarburos*. Tesis de Maestría en Biotecnología. Facultad de Química, UNAM. México.
83. Saval S., 1995. *Remediación y Restauración*. En PEMEX: Ambiente y Energía. Instituto de Investigaciones Jurídicas, UNAM/Petróleos Mexicanos.
84. Saval S, 2000. *Bioremediation: Clean up biotechnologies for soils and aquifers*. In Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses. E. J. Olguín, G. Sanchez and E. Hernández. 155-156.
85. SEINET-FQ. 2003. <http://depa.pquim.unam/~tunda/gral/tensoactivos.html>
86. SEMARNAT, 2004. <http://carpetas.semarnat.gob.mx/dgmic/suelos/proceso.shtml>
87. SEMARNAT, 2004. <http://carpetas.semarnat.gob.mx/dgmic/suelos/registro-federal.shtml>

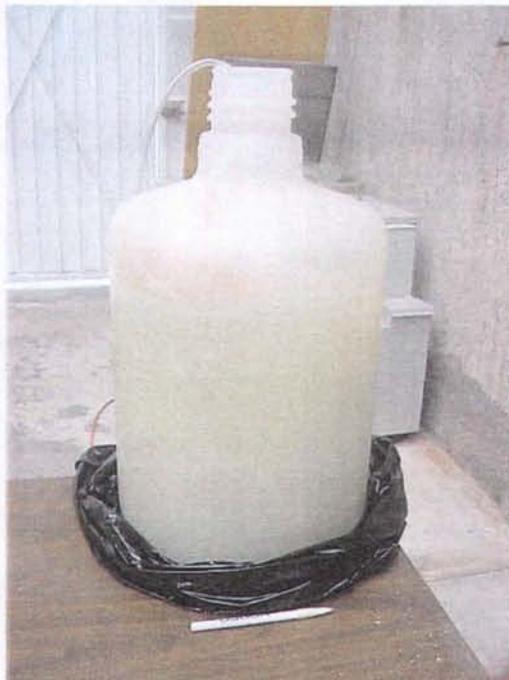
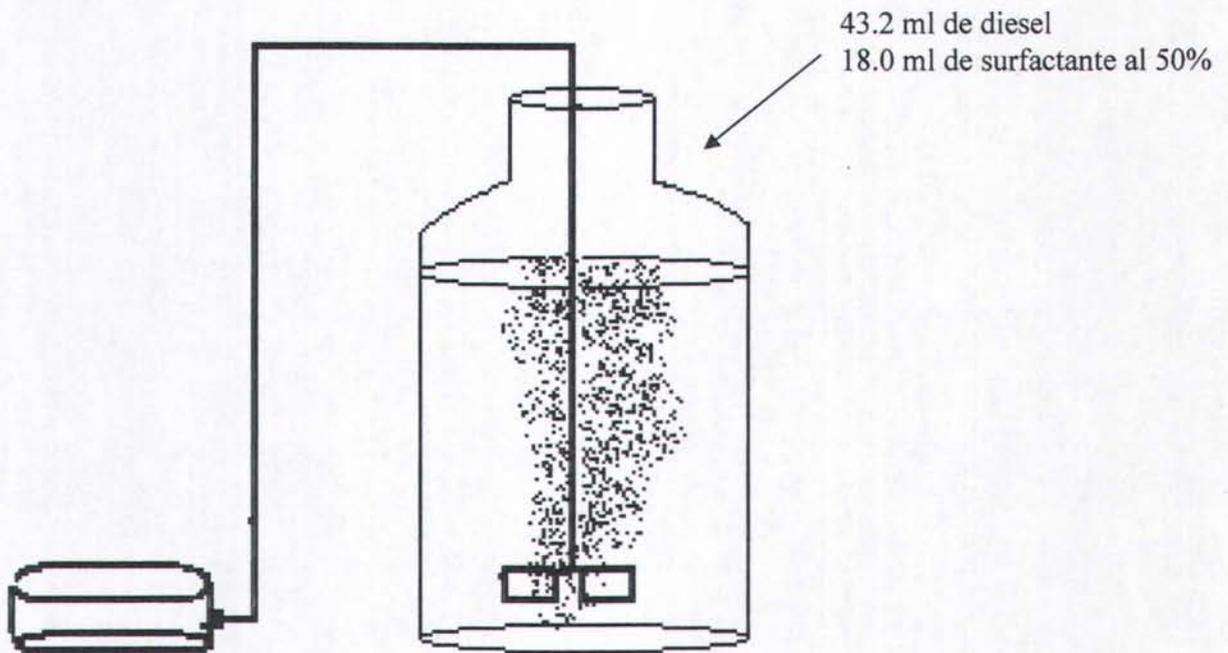
-
88. Siebe G., 1998. *Química de suelos*. Curso sobre remediación de suelos y acuíferos. Instituto de Ingeniería, UNAM. México.
89. Sidkar S. K. and Irving R. L. 1998. *Bioremediation: Principles and Practices*. Bioremediation Technologies. Vol. III. Technomic Pub. Co. Inc. 42-45.
90. Sorenson K. S. and Peterson L. N. 2003. *Combining biostimulation for source area treatment with monitored natural attenuation for restoration of a large TCE plume*. www.containment.fsu.edu/cd/content/pdf/335.pdf
91. Speight J. G., 1999. *The Chemistry and Technology of Petroleum*. Marcel Dekker, USA. 918.
92. Song H. G., Wang X., Bartha R. 1990. *Bioremediation Potential at terrestrial fuel spills*. **Appl. Environ. Microbiol.** 56. 652-656.
93. Stainer R. Y., Doudoroff M. and Adelberg E. A., 1970. *The microbial world*. Prentice-Hall, Inc, USA. 873 p.
94. Stevenson F. S. 1986. *Cycles of soils*. Mc-Graw Hill. USA.
95. Sudip K. S., Om V. S. and Rakesh K. J. 2002. *Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation*. **Trends in Biotechnology**. 20 (6): 243-249.
96. Suthersan S. S., 1997. *Remediation Engineering, Design Concepts*. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
97. Sylvia D., Fuhrmann J., Hartel P. and Zuberer D. 1999. *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall.

-
98. Thomassin-Lacroix E. J., Erickson M., Reimer K. J. and Mohn W. W. 2002. *Biostimulation and bioaugmentation for on site treatment of weathered diesel fuel in Arctic soil. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 551-556.
99. Tiemh A., Stieber M., Werner P. and Frimmel F. H. 1997. *Surfactant enhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. Environ. Sci. Technol.* 31 (9): 2570-2576.
100. Timmis K, N. 2002. *Pseudomonas putida: a cosmopolitan opportunist par excellence. Environ. Microbiol.* 4 (12): 779-781.
101. Trindade P. V. O, Sobral L. G. Rizzo A. C. L, Leite S. G. F., Lemos J. L. S., Milloili V. S. and Soriano A. V. 2003. *Evaluation of biostimulation and bioaugmentation techniques in bioremediation process of petroleum hydrocarbons contaminated soil.* http://ipec.utulsa.edu/Ipec/conf2002/trindade_soriano_21.pdf
102. USEPA, 1996. *Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implimentation.* www.epa.gov/ORD/NRMRL/Pubs/1996/625K96001.pdf
103. USEPA, 1998. *An analysis of composting as an environmental remediation technology.* Solid Waste and Emergency Response.
104. USEPA. 1999. *Bioremediation in oil spill response.* www.epa.gov/oilspill/docs/epaupd9.pdf
105. Vázquez A. A. y Bautista A. N. 1993. *Guía para la interpretación de análisis químico de suelo y agua.* Dpto. de Suelos, Universidad Autónoma de Chapingo, México.
106. Villarreal A. y Soler F., 1996. *Diseños Experimentales: Conceptos y Aplicaciones.* DEPMI, Facultad de Ingeniería. UNAM.
107. Vogel J.M. 1996. *Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. Current Opinion in Biotechnology.* 7. 311-316.
-

-
108. Von Wedel R. J., Mosquera J. F., Goldsmith C. D., Heater G. R., Wong A., Fox T. A., Hunt W. T., Paules M. S., Quiros J. M. and Wiegand J. W. 1988. *Bacterial biodegradation of petroleum hydrocarbons in groundwater: in situ augmented bioreclamation with enrichment isolated in California*. **Water Sci. Technol.** 20, 501-503.
109. Walworth J. L., Woolard C. R., Braddock J. F. and Reynolds C. M. 1997. *Enhanced and inhibition of soil petroleum biodegradation through use of fertilizer nitrogen: an approach to determining optimum levels*. **J. Soil Contam.** 6 (5): 465-480.
110. Weissenfels W. D., Klewer H. J. and Langhoff J. 1992. *Adsorption of polycyclic aromatics hydrocarbons (PAH's) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36: 689-696.
111. Wise D. and Trantolo D. 1994. *Remediation of hazardous waste contaminated soils*. Marcel Dekker, Inc. USA. 382 p.
112. Wood R. 1989. *Soil biology*. Hall, Inc. USA. 470 p.
113. Xu Y. 2002. *Biodegradation of high concentrations of crude oil in microcosms*. Thesis Master of Science. Cincinnati University.
114. Zegarra H. G. 2000. *Optimización de la degradación del diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta*. Tesis Maestría en Ingeniería ambiental, Facultad de Ingeniería, UNAM.
115. Zhou E. and Crawford R. L. 1995. *Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil*. **Biodegradation.** 6: 127-140.

ANEXO 1

Condiciones de operación del reactor



ANEXO 2

Cálculos de los fertilizantes agregados

Carbono orgánico = 49 700 mg/kg de suelo

N necesario = (49 700 mg/kg) (0.1) = 4 970 mg/kg

N disponible = 684.57 mg/kg

Volumen del suelo a tratar = 0.64 m³

Densidad del suelo = 860 kg/m³

Masa total del suelo = (0.64 m³) (860 kg/m³) = 550.4 kg de suelo

1. Adición de nitrógeno:

N requerido = 4 970 mg/kg – 684.57 mg/kg = 4 285.43 mg/ kg de suelo

Total de nitrógeno = (550.4 kg) (4 285.43 mg/kg) = 2 358 700 mg = 2.35 kg de nitrógeno

Sulfato de amonio (20.5% de nitrógeno en el sulfato de amonio)

Cantidad de (NH₄)₂SO₄ = (4 285 mg/kg) (1mg de (NH₄)₂SO₄/0.205 mg N) = 20 902 mg de

(NH₄)₂SO₄/kg suelo = 0.02 kg (NH₄)₂SO₄/ kg de suelo

(0.02 kg (NH₄)₂SO₄/kg suelo) (550.4 kg/ 0.64 m³) = **11.0 kg de (NH₄)₂SO₄**

2. Adición de fósforo:

P necesario = (49 700 mg/kg) (0.005) = 247.5 mg/kg

P disponible = 101.52 mg/kg

P requerido = 247.5 mg/kg – 101.52 mg/kg = 145.98 mg/kg

Masa total del suelo = (0.64 m³) (860 kg/ m³) = 550.4 kg

Total de P = (550.4 kg de suelo) (145.98 mg/kg) = 80 347.39 mg de P = 0.08 kg de P

El fósforo que se agregó en forma de fosfato tricálcico (*18.3% de fósforo en el Ca₃(PO₄)₂)

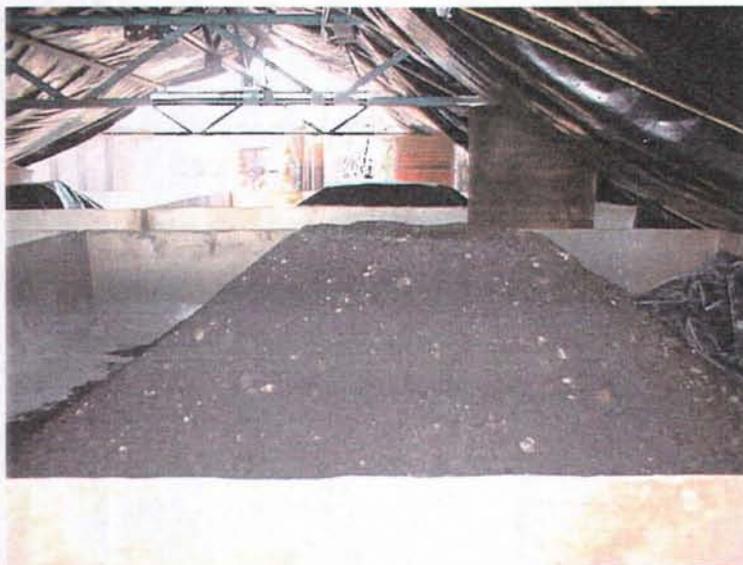
Ca₃P₂O₈ requerido = (145.98 mg/kg) (1 mg Ca₃(PO₄)₂/0.183 mg P) = 797.70 mg /kg suelo

(0.00079 kg Ca₃(PO₄)₂/ kg suelo) (550.4g/ 0.64 m³) = **0.680 kg de Ca₃(PO₄)₂/ 0.64 m³ suelo**

• www.ceniap.gov.ve/bdigital/ztzoo/zt601/texto/fósforo/htm

ANEXO 3

Vista de las biopilas en campo



Dimensiones de cada una de las biopilas



Cubierta de plástico para evitar volatilización de compuestos y agua



Cubierta de plástico para evitar volatilización de compuestos y agua



Protección de las inclemencias del tiempo con armazón metálico y cubierta de plástico

ANEXO 4

Datos obtenidos para curvas patrón

Datos de la curva patrón de fosfatos para los primeros 45 días de arranque de las biopilas

Sol.patrón (ml)	fosfatos (ppm)	Abs
1	0,1	0,02
2	0,3	0,03
3	0,5	0,05
4	0,7	0,08
5	0,9	0,09
6	1	0,1
7	2	0,11
8	3	0,13
9	4	0,14

Datos experimentales obtenidos para determinación de fosfatos

Tiempo (días)	Biostimulación	Bioaumentación	Adición de composta	Atenuación natural
0	0,09	0,1	0,25	0,12
15	0,07	0,09	0,21	0,11
30	0,06	0,11	0,13	0,08
45	0,065	0,06	0,08	0,05

Datos de la curva patrón de fosfatos para los días posteriores a las 45 días de arranque de las biopilas

Sol.patrón (ml)	fosfatos ppm	abs
1	0,1	0,03
2	0,2	0,03
3	0,3	0,08
4	0,4	0,1
5	0,5	0,11
6	0,6	0,11
7	0,7	0,15
8	0,8	0,17
9	0,9	0,17
10	1	0,25

Datos experimentales obtenidos para determinación de fosfatos

tiempo(días)	Bioestimulació n	Bioaumentació n	Adición de composta	Atenuación natural
60	0,1	0,08	0,24	0,07
75	0,1	0,07	0,215	0,07
90	0,15	0,11	0,21	0,09

Datos experimentales para determinación de nitrógeno total

tiempo (días)	Bioestimulación	Bioaumentación	Adición de composta	Atenuación natural
0	2,6	0,3	1,1	0,4
15	2,3	0,25	1,5	0,5
30	2,3	0,4	1,1	0,4
45	1,9	0,5	1,1	0,45
60	1,9	0,5	1,4	0,3
75	1,9	0,5	1,4	0,2
90	1,9	0,35	1,4	0,3

ANEXO 5

Datos para realizar el análisis de varianza de efectos fijos

Tratamientos	tiempo (días)									Totales	Promedios
	0	15	30	45	60	75	90	120	150	Y _i	ŷ _i
Biestimulación	100	49.95	39.95	40.52	32.06	34.44	44.34	24.97	17.60	383.83	42.64
Bioaumentación	100	74.17	57.06	46.23	43.04	46.43	47.41	57.51	39.69	511.54	56.83
Adición de composta vegetal	100	95.26	80.84	93.79	65.72	83.49	83.49	53.94	76.55	773.08	81.45
Atenuación natural	100	72.03	50.59	58.62	55.93	51.93	60.16	29.78	42.27	521.31	57.92
										y _{..} =2189.76	ŷ _{..} =59.71

Sumas de cuadrados requeridas para el análisis de variancia se calcularon como sigue:

$$SS_T = \sum_{i=1}^{36} \sum_{j=1}^{36} y_{ij}^2 - \frac{y_{..}^2}{N} = [(100)^2 + (49.95)^2 + \dots + (42.27)^2] - \left[\frac{2189.76^2}{36} \right] = 14\,420.6958$$

$$SS_{\text{Tratamientos}} = \sum_{i=1}^3 \frac{y_i^2}{n} - \frac{y_{..}^2}{N} = \frac{383.83^2 + 511.54^2 + 773.08^2 + 521.31^2}{9} - \frac{2189.76^2}{36} = 8850.36$$

$$SS_E = SS_T - SS_{\text{Tratamientos}} = 14\,420.6958 - 8\,850.36 = 5\,570.3358$$

Análisis de variancia para los datos de diesel residual

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media de Cuadrados	F ₀
Tratamientos	8850.36	3 (a-1)	2 950.12	
Error	5570.33	32 (N-a)	174.07	16.94
Total	14420.69	35 (N-1)		F _{α,a-1,N-a} =2.901

Comparación de medias de tratamientos individuales:

Método de la mínima diferencia significativa LSD (least difference significant)

$$LSD = t_{\alpha/2, N-a} \sqrt{\frac{2MS_E}{n}}$$

Si $\left| \bar{y}_i - \bar{y}_j \right| > LSD$ se concluye que las medias poblacionales μ_i y μ_j son diferentes

$$LSD = t_{\alpha 0.025, 32} \sqrt{\frac{2MS_E}{n}} = 2.0369 \sqrt{\frac{2(174.073)}{9}} = 12.668$$

Entonces:

Media de los Tratamientos	Diferencia de Medias	LSD
$\check{y}_1 = 42.64$	$\check{y}_1 - \check{y}_2 = -14.19^*$	12.66 ^a
$\check{y}_2 = 56.83$	$\check{y}_1 - \check{y}_3 = -38.81^*$	
$\check{y}_3 = 81.45$	$\check{y}_1 - \check{y}_4 = -15.28^*$	
$\check{y}_4 = 57.92$	$\check{y}_2 - \check{y}_3 = -24.62^*$	
	$\check{y}_2 - \check{y}_4 = -1.09$	
	$\check{y}_3 - \check{y}_4 = 23.53^*$	

*significativamente diferentes

Por lo que la bioaumentación y la atenuación natural no fueron significativamente diferentes

ANEXO 6

Costos del estudio

A manera de ejercicio se incluyó el costo del estudio realizado:

Fabricación de charolas de fibra de vidrio.....	\$15,000
Colocación de lonas de plástico de alta densidad.....	\$ 5,000
Cultivo de bacterias degradadoras.....	\$ 10,000
Fertilizantes.....	\$ 1,500
Análisis cromatográficos y de laboratorio.....	\$ 230,000
Subtotal	\$ 261,500
Uso de instalaciones de laboratorio.....	\$ 10,000
Beca (30 meses).....	\$ 210,000
Total	\$481,000