



---

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS**

SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Biorrecuperación de suelos contaminados con diesel, mediante biopilas utilizando estrategias de bioaumentación y bioestimulación.

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Ingeniería Química

**P R E S E N T A**

**IQI Sayira Rojo Santiesteban**

**Asesores**

Dr. José Javier Castro Arellano

Dr. Enrique Rico Arzate



México, D.F. Junio de 2013.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REVISIÓN DE TESIS*

En la Ciudad de México, D. F., siendo las 13:00 horas del día 28 del mes de Junio del 2013 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESIQIE para examinar la tesis titulada:

**"Biorrecuperación de suelos contaminados con diesel, mediante biopilas utilizando estrategias de bioaumentación y bioestimulación".**

Presentada por el alumno:

ROJO

Apellido paterno

SANTIESTEBAN

Apellido materno

SAYIRA

Nombre(s)

Con registro: 

A	1	1	0	6	0	2
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA QUÍMICA**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

  
DR. JOSÉ JAVIER CASTRO ARELLANO

  
DR. ENRIQUE RICO ARIZATE

  
DRA. MA. ELENA DE LA LUZ NAVARRO CLEMENTE

  
DRA. TATIANA TIMOSHINA LUKIANOVA

  
DR. JUAN RAMÓN AVENDAÑO GÓMEZ

  
DRA. MARINA OLIVA FRANCO HERNÁNDEZ

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA QUÍMICA E INDUSTRIAS EXTRACTIVAS  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

  
DR. ROGELIO SOTELO BOYÁS

*INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO*



*CARTA CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de México, D.F. el día 27 del mes de Junio del año 2013, el (la) que suscribe Savira Rojo Santiesteban alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Ingeniería Química con número de registro A110602, adscrito(a) a la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) asesores: Dr. José Javier Castro Arellano y el Dr. Enrique Rico Arzate y cede los derechos del trabajo titulado "Biorrecuperación de suelos contaminados con diesel, mediante biopilas utilizando estrategias de bioaumentación y bioestimulación", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: sayi\_rs@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
Savira Rojo Santiesteban  
Nombre y firma del alumno(a)

## **DEDICATORIA**

A mis padres y hermanas,  
con todo mi amor.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Instituto Politécnico Nacional y a la Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractivas, por el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Enrique Rico Arzate y el Dr. José Javier Castro Arellano, directores de este proyecto, por el apoyo brindado.

A la Dra. Marina Olivia Franco Hernández considerada como una tercera asesora, por compartir sus conocimientos y permitir realizar las pruebas en su laboratorio para el desarrollo de esta investigación.

A Ana Karen Cornejo, amiga y colaboradora de trabajo, por su entrega, dedicación y apoyo incondicional en la realización de este proyecto.

Al biólogo Rogelio Bailón Morales por su apoyo incondicional brindado en la construcción de las biopilas en la planta de producción de composta del IPN.

Al Ing. Rogelio y Armando, por el apoyo brindado del equipo y material en el laboratorio de mecánica de suelos II de ESIA-Zacatenco.

## RESUMEN

La creciente industrialización y el uso de derivados del petróleo ha generado la liberación de grandes cantidades de hidrocarburos provocando graves problemas de contaminación de suelos, algunos de ellos tóxicos para el ambiente y la salud humana. El objetivo de este trabajo fue implementar un sistema de remediación; biopilas aireadas manualmente para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados de diesel. Para ello se extrajo 150 kg de suelo sin contaminar con alto contenido de materia orgánica derivada de composta madura y se realizó una caracterización inicial para determinar el contenido de nutrientes y de factores físico-químicos, biológicos que el suelo presentaba. Una vez caracterizado el suelo fue contaminado, y se construyeron 3 biopilas de 50 kg con dimensiones de 1x0.6x0.4m cada una, las cuales fueron colocadas a la intemperie sobre bases de metal. Las concentraciones iniciales fueron 49,141.01 mg/kg ss para la biopila 1 (B1); 56,249.18 mg/kg ss para la biopila 2 (B2) y 62,752.99 mg/kg ss para la biopila control (BC), esta última fue utilizada como control, al tratamiento B1 se adicionaron sustancias húmicas y un consorcio comercial de bacterias perteneciente al género *Pseudomonas* sp. previamente adaptadas, que también fue inoculado en el tratamiento B2. Los factores físico-químicos y biológicos fueron monitoreados a lo largo del proceso de biorremediación, las biopilas fueron aireadas y humedecidas de 2-3 veces por semana. De acuerdo a los resultados obtenidos, el pH se mantuvo sin grandes variaciones ( $\approx 8$ ) al igual que la conductividad eléctrica ( $\approx 0.5$  dS/m), las concentraciones de nutrientes indican que hubo una utilización de nitrógeno y fósforo, siendo muy parecidas en todos los tratamientos. Las unidades formadoras de colonias (CFU) del suelo antes de ser contaminado fue del orden de  $10^5$ , aumentando a  $10^8$  en el día 1 en el tratamiento B1, mientras que los tratamientos B2 y BC alcanzaron un crecimiento máximo en 62 días. Las tasas de emisión de  $\text{CO}_2$  de los tratamientos ( $k=366$   $\text{d}^{-1}$  para B1 y BC y  $305$   $\text{d}^{-1}$ ) indican que hubo una gran actividad por parte de los microorganismos en las tres biopilas, comprobándose que la adición de diesel no resultó tóxico. Después de 4 meses las concentraciones finales fueron 5,345.85 para B1, 11,668.11 para B2 y 13,196.28 mg/kg ss para BC. Los resultados de concentración de hidrocarburos totales del petróleo (TPH) se ajustan a un modelo cinético de primer orden, B1 fue el tratamiento con una tasa de degradación de TPH 20% más rápida ( $k=0.020$   $\text{d}^{-1}$ ) alcanzando un 89.12% de biodegradación, seguido de B2 y BC con una constante igual a 0.016 y 0.015  $\text{d}^{-1}$ , respectivamente y con eficiencias de (79.25%) y (78.97%) respectivamente. Los tratamientos B2 y BC no mostraron diferencias significativas de disminución de concentraciones de contaminantes. De acuerdo a los cromatogramas los compuestos más recalcitrantes al final de la experimentación fueron aquellos que en su estructura presentan números de carbono entre  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_{21}$ - $\text{C}_{27}$ , principalmente.

## ABSTRACT

Increasing industrialization and the use of oil has led to the release of large quantities of hydrocarbons causing serious soil pollution problems, some of them toxic to the environment and human health. The objective of this work was to implement a remediation system; biopiles manually aerated soil remediation contaminated with diesel derived hydrocarbons. This was extracted 150 kg of unpolluted soil high in organic matter derived from mature compost and initial characterization was performed to determine the nutrient content and physicochemical factors, soil biological presented. Characterized once the soil was contaminated, which were built three biocells 50 kg with dimensions 1x0.6x0.4m each one, which were placed on the open metal bases. The initial concentrations were 49,141.01 mg/kg ss for treatment B1, 56,249.18 for treatment B2, and 62,752.99 mg /kg ss for treatment BC, the latter was used as a control, was added to for treatment B1 humic substances and commercial consortium of bacteria belonging to the genus *Pseudomonas* sp. adapted previously and for treatment B2 was inoculated with the same consortium. The physico-chemical and biological parameters were monitored during the bioremediation process, the wet biopiles were aerated and 2-3 times a week. According to the results, the pH was maintained without large variations ( $\approx 8$ ) as electrical conductivity ( $\approx 0.5$  dS / m), nutrient concentrations show that there was a utilization of nitrogen and phosphorus, with these concentrations very similar in all treatments. CFU soil was contaminated prior to the order of  $10^5$ , growing to  $10^8$  on day 1 at treatment for treatment B1, the treatments B2 and BC had a maximum growth of microorganisms after 62 days of treatment. The  $\text{CO}_2$  emission rates of treatments ( $k = 366$  mg  $\text{CO}_2$ / kg soil  $\text{d}^{-1}$  for treatments B1 and BC and 305  $\text{CO}_2$ / kg soil  $\text{d}^{-1}$ ) indicate that there was considerable activity by microorganisms in the three biopiles and found that the addition of diesel was not toxic for the microorganisms. After 4 months the final concentrations were 5,784.56 mg/kg ss for treatments B1, B2, and 11,668.11 to 13,196.28 mg/kg ss for treatment BC. The TPH concentration results fit a first order kinetic model, B1 was treatment with a degradation rate of TPH 20% faster ( $k = 0.020$   $\text{d}^{-1}$ ) achieving a 89.12% biodegradation, followed by treatment B2 and BC with a constant equal to 0.016 and 0.015  $\text{d}^{-1}$ , respectively and efficiencies (79.25%) and (78.97%) respectively. Treatment B2 and BC showed no significant differences in pollutant concentrations decrease. According to chromatograms the most recalcitrant compounds at the end of the experiment were those present in its carbon number especially between  $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_{21}$ - $\text{C}_{27}$ .

## Contenido

DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
Lista de figuras.....	10
Lista de tablas.....	12
Abreviaturas.....	13
NOMENCLATURA.....	14
INTRODUCCIÓN.....	15
CAPITULO I Generalidades.....	19
1.- Los suelos.....	19
1.1.-Composicion del suelo.....	19
1.1.1La fracción mineral.....	20
1.1.2 La fracción orgánica: humificación y sustancias húmicas.....	20
1.1.2.1 Sustancias húmicas (SH).....	21
1.1.4 Gases y su difusión en perfil del suelo.....	23
1.1.5 Humedad de un suelo.....	24
1.2 Ciclos biogeoquímicos.....	24
1.3 Contaminación de suelos por hidrocarburos.....	26
1.3.1 Hidrocarburos.....	26
1.3.2 La contaminación de suelos por hidrocarburos.....	28
1.3.3 Remediación de suelos.....	29
1.3.4 Factores que condicionan la biorremediación del suelo.....	30
1.3.5 Microorganismos en la biorremediación.....	31
1.3.6 Crecimiento celular y cinética de consumo de sustrato.....	33
1.4 Antecedentes.....	42
CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS.....	46
2.1Diseño experimental.....	47
2.1.1 Extracción y preparación del suelo.....	48
2.1.2 Construcción de biopilas.....	49



2.1.3 Bioaumentación .....	50
2.2 Muestreo .....	52
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION .....	65
3.1 Caracterización de sustancias húmicas.....	65
3.2 Caracterización del suelo antes de ser contaminado. ....	65
3.3 Análisis de los parámetros físicos químicos y biológicos del proceso de biorremediación.....	67
3.3 Crecimiento de microorganismos.....	80
3.4 Dióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) emitido por los microorganismos.....	84
3.5 Biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo. ....	85
3.6 Cinética de biodegradación. ....	88
3.7 Cromatogramas del suelo .....	88
CONCLUSIONES.....	94
RECOMENDACIONES .....	94
ANEXO I.....	96
Preparación de soluciones .....	96
ANEXO II .....	99
Curva tipo Nitratos .....	99
Curva tipo amonio. ....	100
Curva tipo fosforo soluble. ....	101
Determinación de concentración de TPH's.....	102
ANEXO III Fotografías .....	103
BIBLIOGRAFIA .....	112

## Lista de figuras

Figura 1. Esquema de los constituyentes del suelo (Viñas, 2005). .....	19
Figura 2. Propiedades químicas de las sustancias húmicas (Stevenson, 1994).....	22
Figura 3. Estructura modelo del ácido húmico (Stevenson, 1982).....	22
Figura 4. Estructura modelo de los ácidos fúlvicos.....	23
Figura 5. Principales sustancias involucradas en emergencias ambientales reportadas a las PROFEPA entre 1997 y 1999 (PROFEPA, 2002). .....	28
Figura 6. Mecanismo de acción enzimática (Valencia, 2010).....	36
Figura 7. Esquema de un proceso de biodegradación. Un reactivo orgánico A se encuentra vinculado a una enzima extracelular y como consecuencia de ello, es transportado al interior de la célula. El proceso de oxidación biológica conlleva una serie de reacciones en las cuales se separan los electrones del compuesto (Eweis, 2000).....	38
Figura 8 Proceso de oxidación de los hidrocarburos alifáticos. ....	39
Figura 9. Proceso de oxidación de los hidrocarburos aromáticos. ....	40
Figura 10. Esquema general del trabajo experimental. ....	47
Figura 11. Proceso de preparación del suelo extraído sin contaminar. Suelo secado al aire (izquierda) y tamizado (derecha).....	48
Figura 12. Aspecto físico del suelo después de ser contaminado con diesel comercial mexicano.....	49
Figura 13. Construcción de biopilas experimentales puestas sobre bases de metal (izquierda) con cubierta de plástico para evitar pérdidas de suelo (derecha).....	50
Figura 14. Aspecto del inoculo comercial adaptado previo a su incorporación a B1. ....	51
Figura 15 Aspecto de las placas sembradas con el consorcio comercial de bacterias (izquierda) y morfología microscópica (100x) de <i>Pseudomonas sp.</i> (derecha). ....	52
Figura 16. Muestreo (a) en rejilla, (b) Puntos de muestreo en cuadrícula para extracción de submuestras y (c ) cuarteo y toma de la muestra compuesta.....	53
Figura 17. Triángulo textural del suelo mostrando los porcentajes de arcilla, limo y arena de las clases texturales (USDA, 1999). ....	54
Figura 18. Biopila dividida a lo largo y alto para el registro de temperaturas. ....	57
Figura 19. Esquema experimental del monitoreo de CO <sub>2</sub> emitido por los microorganismos del suelo contaminado. ....	62
Figura 20. Variación de pH y CE a lo largo del tratamiento. Las barras corresponden a la desviación estándar de los valores promedio de las 3 biopilas. ● pH promedio ,▲CE promedio.....	69
Figura 21. Variación de temperatura de las biopila a lo largo del tratamiento.● Biopila 1,▲ Biopila 2 , ■ Biopila control y + ambiente. ....	71
Figura 22. Variación de carbono orgánico a lo largo del tratamiento. Las barras indican la desviación estándar entre las 3 repeticiones de cada punto. ● Biopila 1, ▲ Biopila 2 y ■ Biopila control. ....	73

Figura 23 Perfil de concentración de $\text{NH}_4^+$ y $\text{NO}_3^-$ respecto al tiempo de B1.....	77
Figura 24 Perfil de concentración de $\text{NH}_4^+$ y $\text{NO}_3^-$ respecto al tiempo de B2.....	78
Figura 25. Perfil de concentración de $\text{NH}_4^+$ y $\text{NO}_3^-$ respecto al tiempo de BC. ....	79
Figura 26. Crecimiento de los microorganismos del suelo de cada biopila a diferentes tiempos. ....	82
Figura 27. Producción de $\text{CO}_2$ acumulado en microcosmos con diferentes sustancias adicionadas. ● Biopila 1, ▲ Biopila 2 y ■ Biopila control. Las barras representan la desviación estándar entre 4 réplicas. ....	85
Figura 28. Variación de la concentración de HTP's de cada biopila, respecto al tiempo de biorremediación. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres muestras analizadas.....	86
Figura 29. Porcentajes de biodegradación alcanzados a los 42, 84 y 112 días de cada tratamiento.....	87
Figura 30 Cromatograma de estándar de 25,000 ppm de diesel puro, con identificación de números de carbono de $\text{C}_{10}$ – $\text{C}_{27}$ .....	90
Figura 31 Cromatógramas de la biopila 1 (a) antes de ser contaminado, (b) día 0, (c) día 42, (d) día 112.....	91
Figura 32 Cromatógramas de la biopila 2 (a) antes de ser contaminado, (b) día 0, (c) día 42, (d) día 112.....	92
Figura 33 Cromatógramas de la biopila control (a) antes de ser contaminado, (b) día 0, (c) día 42, (d) día 112.....	93
Figura 34. Curva tipo para la determinación de la concentración de $\text{N-NO}_3^-$ del suelo.....	99
Figura 35. Curva tipo para la determinación de la concentración de $\text{NH}_4^+$ del suelo. ....	100
Figura 36. Curva tipo para la determinación de la concentración de $\text{P-PO}_4^{3-}$ del suelo.....	101
Figura 37. Curva tipo para la determinación de la concentración de HTP's.....	102
Figura 38. Aspecto de las placas sembradas para recuento de CFU a diferentes días experimentales. Día 1 (a), 28 (b), 62(c) y 112 (d). ....	106
Figura 39. Aspecto del suelo al inicio (izquierda) y al final (derecha) de la experimentación. ....	107
Figura 40. Imágenes tomadas en microscopio óptico (100 X) de diferentes microorganismos tipo bacilos GRAM (-), presentes en los tratamientos.....	110
Figura 41. Imágenes tomadas en microscopio óptico (100 X) de diferentes microorganismos tipo cocos GRAM (-), presentes en los tratamientos.....	111

## Lista de tablas

Tabla 1. Textura del suelo en función al tamaño de partícula. ....	20
Tabla 2. Composición elemental de las sustancias húmicas. ....	21
Tabla 3. Características de las biopilas experimentales. ....	49
Tabla 4. Compuestos utilizados para la preparación del medio reestructivo. ....	50
Tabla 5. Compuestos utilizados para preparación de solución de elementos traza.....	51
Tabla 6. Resultados obtenidos de la caracterización de las SH.....	65
Tabla 7. Caracterización del suelo antes de ser contaminado. ....	67
Tabla 8 Valores de pH de cada biopila determinados semanalmente. ....	68
Tabla 9. Porcentaje de MO del suelo al inicio (día 0) y al final de la experimentación (día 112). ....	73
Tabla 10. Concentración de NT al inicio y al final del tratamiento. ....	74
Tabla 11. Relación C:N al inicio y al final del proceso de biorremediación.....	75
Tabla 12. Concentración de $PO_4^{-3}$ al inicio y final de la remediación. ....	80
Tabla 13. Características morfológicas macroscópicas de las CFU presentes al inicio y final del proceso de descontaminación del suelo, así como del consorcio utilizado. ....	83
Tabla 14. Producción de $CO_2$ emitido por los microorganismos del suelo. ....	85
Tabla 15 Resumen de tasas de utilización de sustrato de los tres tratamientos.....	88

## Abreviaturas

AC Antes de contaminar el suelo

ADN Ácido desoxirribonucleico

AF Ácidos fúlvicos

AH Ácidos húmicos

ARN Ácido ribonucleico

ATP Adenosin trifosfato

CRA Capacidad de retención de agua

CE Conductividad eléctrica

CIC Capacidad de intercambio catiónico

C:N Relación Carbono- Nitrógeno

CO Carbono orgánico

DE Desviación estándar

$\text{NH}_4^+$  Amonio

$\text{NO}_2^-$  Nitrito

$\text{NO}_3^-$  Nitrato

NT Nitrógeno total

MO Materia orgánica

pH Potencial de hidrogeno

ppm partes por millón

SH Sustancias húmicas

TPH Hidrocarburos totales del petróleo por sus siglas en inglés

UFC Unidades formadoras de colonias por sus siglas en inglés

## **NOMENCLATURA**

B1 biopila 1

B2 biopila 2

BC biopila control

C concentración de TPH a cualquier tiempo

C<sub>0</sub> concentración inicial de TPH

C<sub>n</sub> números de carbono

G(-) gram negativo

k constante de velocidad

r<sup>2</sup> factor de correlación

T temperatura (°C)

ss suelo seco

## INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se analiza la biodegradación de hidrocarburos derivados de diesel, contenidos en suelos con alto contenido de materia orgánica derivada de composta madura, utilizando la adición de sustancias húmicas y de un consorcio comercial de bacterias *Pseudomonas* sp., como parte de estrategias de bioestimulación y bioaumentación.

En el capítulo I se da una breve reseña sobre términos y trabajos que se han realizado en el ámbito de la biorremediación. Se explica brevemente sobre grandes accidentes que han ocurrido y que involucran al petróleo y sus derivados, los cuales han dado cabida al desarrollo de nuevas tecnologías que tienen como objetivo el saneamiento de agua y suelos que han sido impactados con este tipo de contaminantes. En el apartado de antecedentes se mencionan algunos autores que han realizado investigaciones de suelos contaminados con hidrocarburos en laboratorio y campo, utilizando estrategias de bioaumentación y bioestimulación, esto con la finalidad de acelerar el proceso de descontaminación. En este mismo capítulo se habla sobre la matriz del suelo y de su importancia ya que es la capa más superficial de la corteza terrestre en el cual se llevan a cabo ciclos biogeoquímicos como nitrógeno y fosforo entre muchos otros, importantes para el sostén de la vida. Se describe al suelo en base a sus porcentajes de composición aproximados: aire, agua, materia orgánica y fracción mineral.

Se realiza una descripción sobre cada una de estos componentes, siendo la fracción mineral la que ocupa una mayor composición ( $\approx 45\%$ ) que le confiere de acuerdo a sus partículas minerales el tipo de textura, la cual influye directamente en las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos. Los segundos componentes de mayor abundancia son el agua y el aire. Importantes para el crecimiento de microorganismos. Los gases presentes en el suelo son los mismos que pueden encontrarse en la atmósfera: oxígeno, nitrógeno y dióxido de carbono, dependiendo estos dos últimos de la aireación del suelo y de la actividad de los microorganismos. El agua por su parte, puede encontrarse en el suelo de tres tipos: gravitacional, capilar y osmótica. Posterior a la descripción de los componentes del suelo, se da una descripción sobre los ciclos biogeoquímicos de nitrógeno y fosforo, que describen el movimiento y la conversión de materiales por actividades bioquímicas mediante los cuales los elementos circulan por vías características entre la parte biótica y abiótica de la ecosfera. Se describe primeramente al ciclo del nitrógeno, recalando las etapas de amonificación y nitrificación. El primer nombre asignado a la formación de amonio a partir de nitrógeno y al segundo al proceso de oxidación de amonio a nitrato. Los cuales son asimilados por los microorganismos como fuentes de nutrientes.

En el capítulo II el lector podrá encontrar algunas generalidades sobre el petróleo, la contaminación del suelo por hidrocarburos y su biorremediación.

Al inicio del capítulo II, se da una descripción sobre el petróleo y la obtención de sus derivados por diferentes y complejas reacciones químicas y de cambios físicos que se engloban en seis operaciones principales: fraccionar, desintegrar, re arreglar, combinar, tratar y mezclar para dar como producto entre muchos otros a combustóleos como diesel.

También se da una descripción de este combustible utilizado, su composición aproximada, algunas de sus propiedades y su clasificación de acuerdo al número de carbonos que contienen en su estructura los compuestos pertenecientes. Dentro de los compuestos presentes en diesel se encuentran hidrocarburos: parafínicos, oleofínicos, nafténicos y aromáticos. Que de acuerdo a sus números de carbono se encuentran en estado líquido.

Posteriormente, se mencionan los problemas que han causado los procesos de refinación y transporte de petróleo y sus derivados, estando entre muchos de ellos la contaminación del suelo causando la muerte de fauna y flora. Dentro de las principales sustancias involucradas en emergencias ambientales ocurridas entre 1997 y 1999, se encuentra el diesel que ocupa el tercer lugar con un 7 %. Afortunadamente se han desarrollado técnicas para poner remedio a este tipo de afectación de suelos, que son descritas en el apartado 2.3, en el cual se da una clasificación sobre las principales técnicas de remediación utilizadas, así como los factores físicos, químicos y microbiológicos que influyen cuando son aplicadas. Dentro de estos factores se hace mayor énfasis en los factores microbiológicos (microorganismos), de los cuales son descritos las bacterias, actinomicetos y hongos además de las interacciones entre ellos. Las interacciones entre microorganismos pueden ser positivas o negativas.

En este mismo apartado se describe el crecimiento celular y las etapas que involucra: fase de adaptación, fase exponencial o de crecimiento, fase de latencia y por último, la muerte. Las cuales pueden ser medidas por técnicas como el recuento en placa, que se describe brevemente en este mismo capítulo.

Una vez explicados los microorganismos y su crecimiento se describe la influencia que tienen en los procesos de biodegradación. Se mencionan algunos mecanismos los cuales tienen como objetivo la utilización de los hidrocarburos como fuente de energía y carbono por parte de la comunidad microbiana del suelo para su reproducción. Dentro de estos mecanismos se encuentran las rutas de descomposición de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, los cuales involucran reacciones oxido-reducción. Al final del capítulo se mencionan algunos microorganismos que han sido identificados como degradadores de diferentes hidrocarburos.

En el capítulo III se describe la metodología de trabajo utilizado. Al inicio se introduce al lector con un esquema general de trabajo que especifica los pasos y los diferentes parámetros medidos a lo largo de la experimentación. Se da en forma general, las sustancias, condiciones y tiempos utilizados.



Como primera etapa se habla sobre la extracción y caracterización del suelo, el cual fue extraído de la planta de producción de composta por lo que contenía un alto porcentaje de materia orgánica. Después de la caracterización el suelo fue contaminado y se construyeron las biopilas, lo cual se describe en este mismo capítulo, así como el seguimiento de los parámetros y la metodología experimental seguida en cada determinación y las ecuaciones que se utilizaron para la obtención de resultados.

En este apartado se mencionan las cantidades y características de las sustancias húmicas utilizadas y la inoculación del consorcio de *Pseudomonas sp.* así como su previa adaptación a diesel como única fuente de carbono.

Dentro de los factores físico-químicos, biológicos medidos se encuentran: potencial de hidrogeno (pH), conductividad eléctrica (CE), humedad, textura, capacidad de intercambio catiónico (CIC), capacidad de retención de agua (CRA), carbono orgánico (CO), materia orgánica (MO), unidades formadoras de colonias (CFU), amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), nitrógeno total (NT), fósforo ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), hidrocarburos totales del petróleo (TPH), los cuales son repostados en el capítulo IV.

El capítulo IV contiene los resultados y la discusión de los mismos. Se presentan tablas y gráficas en donde se puede observar la variación de los diferentes parámetros a lo largo del proceso de remediación.

Al inicio de este apartado se dan los resultados de la caracterización de las sustancias húmicas, los parámetros determinados son CE, pH, NT, P CO y CFU, esto con el fin de tener presente el aporte de estos factores en la B1 a la cual fueron adicionados.

Enseguida se muestran los resultados sobre la cantidad de partículas de arena, limo y arcilla que contiene el suelo, clasificándose de acuerdo al triángulo de textura como un suelo franco arenoso, el cual presentó una capacidad de retención de agua promedio para todos los tratamientos cerca del 65%.

También en este capítulo se muestra el comportamiento de la CE y pH en todo el tiempo de remediación, los cuales presentaron variaciones al inicio de la experimentación principalmente. Otro parámetro que fue medido semanalmente es la temperatura, la cual presentó grandes variaciones, las cuales son analizadas por medio de un gráfico, en el cual se observa la tendencia de los tres tratamientos, siendo estos muy similares en todo el proceso de biorrecuperación.

Posteriormente se analizan las concentraciones de CO y MO, las cuales presentaron grandes variaciones de inicio a fin del proceso de remediación. Aquí se discutirá cuáles podrían ser las razones del comportamiento de las concentraciones a diferentes tiempos.

Posteriormente se hablará también sobre el nitrógeno, la disminución que presentó y la relación C:N, se compara con la de la bibliografía consultada, en esta parte se habla detalladamente sobre el cociente entre estos dos parámetros, ya que es valor importante cuando se llevan a cabo remediaciones de suelo, siendo un factor limitante para el crecimiento de microorganismos. También se discutirá sobre los resultados obtenidos de las formas inorgánicas de amonio y nitrato, los cuales fueron los que presentaron mayores desviaciones estándar entre los resultados de cada prueba, se explicarán algunas causas sobre este comportamiento. El fósforo también fue cuantificado al inicio y final de los tratamientos y la tendencia de los resultados es similar a la de NT, presentando una disminución de concentración al final de la biorrecuperación.

En este mismo capítulo se hablará sobre el crecimiento de microorganismos, se presentan los resultados de los conteos realizados en forma de gráfico de barras, de los conteos realizados se determinaron las características morfológicas macroscópicas de los microorganismos del suelo, las cuales son presentadas en esta misma sección de resultados. Se analizará también la cuantificación realizada del dióxido de carbono emitido por los microorganismos a través de constantes de emisión determinadas con un tratamiento matemático que es explicado en esa misma parte del capítulo.

En la última parte de este capítulo se presentan los resultados de concentración de hidrocarburos, el porcentaje de degradación alcanzado a diferentes tiempos. Con los resultados de concentración de hidrocarburos se determinó una constante de biodegradación para cada biopila utilizando un modelo cinético de primer orden, el tratamiento matemático y los resultados pueden ser observados al final de este capítulo, así como los porcentajes de degradación alcanzados. También se muestran los cromatogramas obtenidos a diferentes días de tratamiento de cada biopila, en ellos se indican los números de carbono de los compuestos más recalcitrantes al final de la remediación.

En la última parte de este escrito se encuentran tres anexos. El anexo I, contiene los reactivos utilizados para la preparación de las soluciones requeridas para determinaciones experimentales.

El anexo II incluye las curvas tipo para el cálculo de concentraciones de nitrato, amonio, fósforo y TPH.

Y por último, el anexo III contiene algunas fotografías sobre la construcción de las biopilas, el aspecto del suelo al inicio y término de la experimentación y algunas imágenes de microorganismos fijados y vistos en un microscopio óptico.

## CAPITULO I Generalidades

### 1.- Los suelos

El suelo es la capa más delgada que rodea a la tierra, está constituida por material orgánico, material mineral, gases y líquidos los cuales de acuerdo a sus características físicas, químicas y físico – químicas constituyen los horizontes de la tierra. Estas capas diferenciales del suelo han sido consecuencia de: alteraciones, transferencia de masa y energía, adiciones y pérdidas de roca madre a través del tiempo.

El suelo es un recurso natural de suma importancia ya que a través de este se pueden llevar a cabo funciones de tipo sociales, económicas, ecológicas, culturales etc. Sin embargo, resulta ser un recurso no renovable ya que el tiempo de contaminación, degradación, y daño al suelo resulta tener mayor velocidad que la renovación y remediación del mismo (Ortiz, 2007).

#### 1.1.-Composicion del suelo

El suelo está constituido principalmente por materia orgánica ( $\approx 0.5-5\%$ ), aire ( $\approx 20-30\%$ ), agua ( $\approx 20-30\%$ ), fracción mineral ( $\approx 45\%$ ). Tanto los componentes de la fracción orgánica y mineral se distribuyen en el suelo de tal manera que en su formación dejan entre sí poros, los cuales contienen agua ó aire teniendo así tres fases presentes: sólido, líquido y gas (Figura 1).

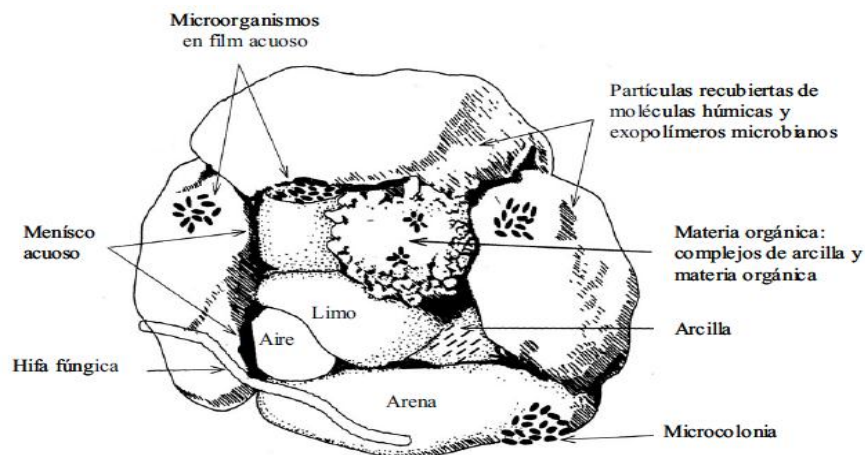


Figura 1. Esquema de los constituyentes del suelo (Viñas, 2005).

### 1.1.1 La fracción mineral

La fracción mineral es aquella que forma la materia inorgánica y que ocupa mayor porcentaje dentro de la estructura del suelo, las cantidades relativas de cada tipo de partícula mineral determinan la textura de un suelo (Tabla 1) y tienen un impacto directo sobre sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Miller 1994, Van Deuren *et al.*, 2002).

**Tabla 1. Textura del suelo en función al tamaño de partícula.**

<b>Tipo de textura del suelo</b>	<b>Tamaño de partícula</b>
Grava	> 2 mm
Arena muy gruesa	<2 mm
Arena gruesa	1 - 0.5 mm
Arena fina	0.25 - 0.10mm
Limo	0.05 – 0.02 mm
Arcilla	< 0.02 mm

Los minerales se dividen en primarios y secundarios; los primeros se encuentran constituidos principalmente por O<sub>2</sub> y Si y forman silicatos de estructuras Si-O (grava y arena). Los minerales secundarios, provenientes de procesos de disolución y precipitación, son de suma importancia debido a su superficie de reacción, y a que sirven como depósitos de agua, nutrientes y materia orgánica, lo que le confiere la parte activa de un suelo (arcillas).

### 1.1.2 La fracción orgánica: humificación y sustancias húmicas.

Los residuos de vegetales y animales constituyen la materia prima de la cual se origina la materia orgánica del suelo. El conjunto de transformaciones que sufren estos residuos orgánicos, puede seguir diferentes caminos dependiendo del tipo y cantidad de material orgánico, del ambiente edáfico, del material parental, de la actividad biológica y del clima. Estos procesos denominados descomposición y mineralización son eminentemente biológicos y durante su desarrollo el material tiende a transformarse. La humificación, proceso complementario, se lleva a cabo estrictamente en el suelo y es de carácter biológico y fisicoquímico. Bajo este complejo marco de interacciones existen en el suelo: a) materiales orgánicos frescos; b) productos minerales liberados como CO<sub>2</sub>, pequeñas cantidades de nitrógeno amoniacal, nítrico, sulfatos y fosfatos; c) sustancias orgánicas como lípidos, proteínas, polifenoles, azúcares, vitaminas y antibióticos y el conjunto de ellas son las denominadas sustancias no húmicas; d) sustancias prehúmicas que mediante mecanismos de estabilización van a constituir las verdaderas sustancias húmicas y por último e) las sustancias húmicas. De acuerdo con esto es de esperar que existan en el suelo

tal variedad de composiciones de materiales orgánicos que sólo es posible conocerlas en estudios detallados (Bendeck).

### 1.1.2.1 Sustancias húmicas (SH).

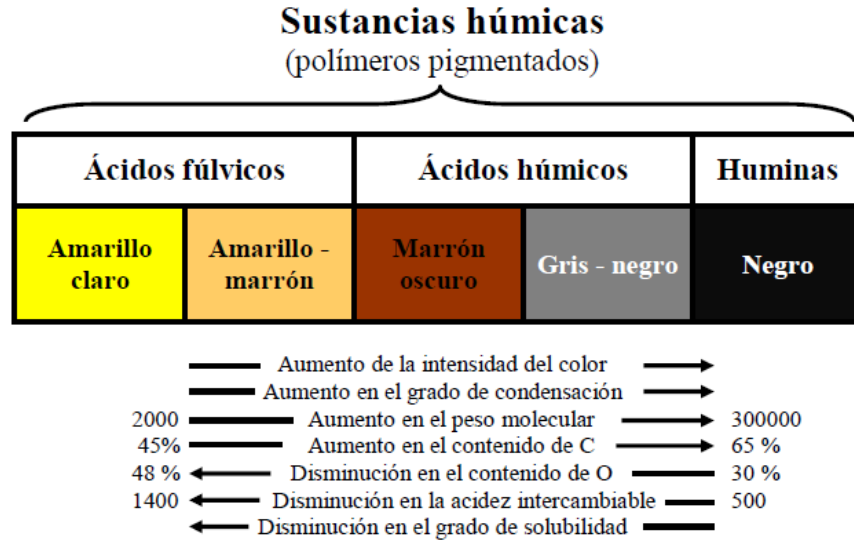
Las sustancias húmicas representan el máximo constituyente de los componentes muertos y a su vez la fracción más representativa y más estable del carbono del suelo, y pueden llegar a constituir hasta un 90% del carbono total del suelo. Esta fracción no es una sustancia de composición exactamente definida, ni siquiera una agrupación de compuestos con propiedades que puedan ser expresadas en términos de unidades. Ellas son generalmente polímeros condensados de compuestos aromáticos y alifáticos producidos por la transformación de la lignina de las plantas, de los polifenoles de las células y de síntesis microbial. Son sustancias altamente complejas, heterogéneas, amorfas, con propiedades coloidales, con alta capacidad de intercambio catiónico, con gran cantidad de grupos ácidos, constituidas principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno. Durante la descomposición de los residuos vegetales, la materia orgánica se biodegrada, transformándose en moléculas pequeñas, a un ritmo muy variable.

Los procesos de polimerización o policondensación afectan principalmente a los precursores fenólicos, que por acción de las polifenol - oxidasas se oxidan a semiquinonas adquiriendo una forma condensada oscura que se asocia con una mínima proporción de las cadenas alifáticas (péptidos y sacáridos), formándose en primer lugar los ácidos fúlvicos, en los que las cadenas alifáticas predominan sobre los núcleos aromáticos y en una fase posterior se forman los ácidos húmicos por aumento de condensación y volumen de los núcleos aromáticos y disminución de las cadenas alifáticas. La composición elemental de las diferentes fracciones de las SH se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2. Composición elemental de las sustancias húmicas.**

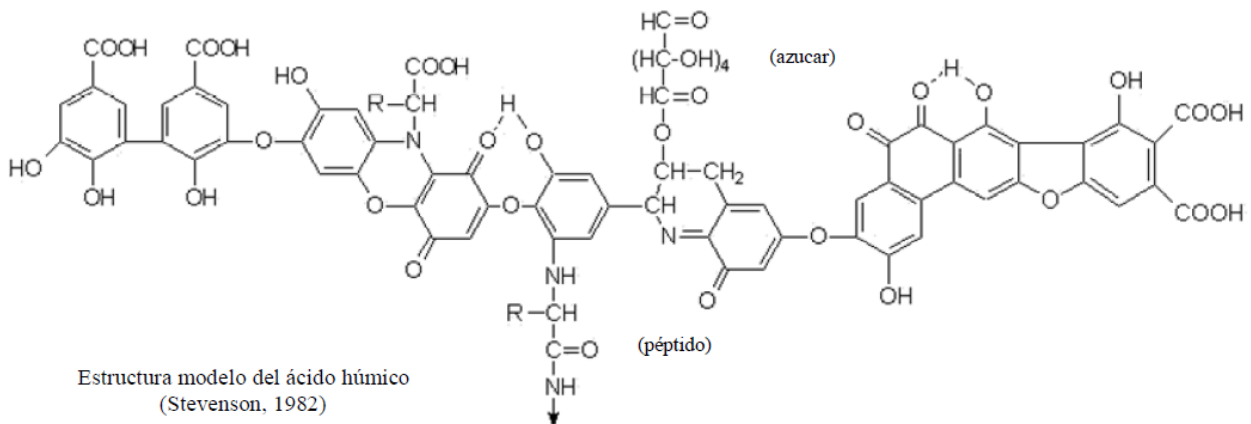
Sustancias	% ( en base a material seco y sin cenizas)			
	C	H	O	N
Ácidos húmicos	52-62	3.0-5.5	30-35	3.5-5.0
Ácidos fúlvicos	44-49	3.5-5.0	44-49	2.4-4.0
Huminas	54-65	3.2-7.6	28-32	2.0-4.2

En la Figura 2 se muestran las relaciones que existen entre las tres fracciones que la componen. En ella puede verse que el contenido de C y O, la acidez y el grado de condensación cambian sistemáticamente con el peso molecular (David, 2008).



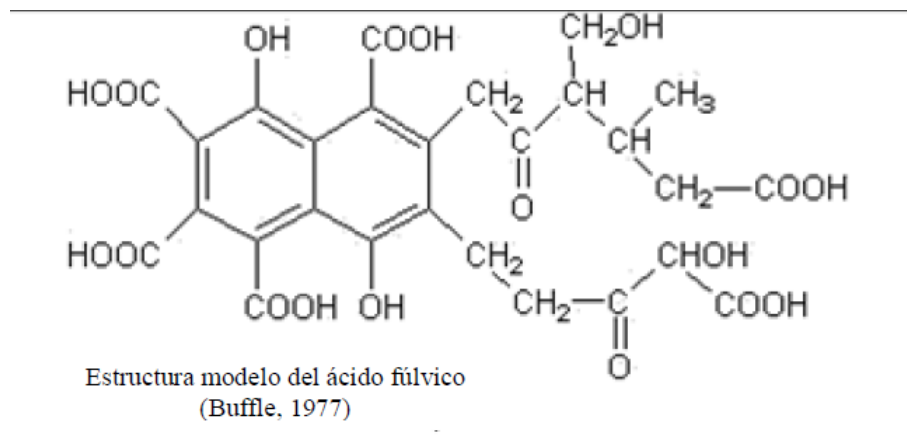
**Figura 2. Propiedades químicas de las sustancias húmicas (Stevenson, 1994).**

Ácidos húmicos: fracción de las SH que no es soluble en soluciones acuosas ácidas (pH < 2) pero sí es soluble a valores mayores de pH. Puede extraérselas del suelo con diferentes reactivos. Son la mayor fracción extraíble de las SH del suelo. Presentan una coloración entre marrón oscuro y negro. Observaciones de AH extraídos de diferentes suelos realizadas al microscopio electrónico muestran que éstas poseen estructura polimérica, en forma de anillos y cadenas. Se postuló para los AH una estructura macromolecular aromática compleja con aminoácidos, azúcares, péptidos y compuestos alifáticos que participan en la unión entre grupos aromáticos. La estructura, que se muestra en la Figura 3, contiene grupos OH fenólicos, estructuras quinónicas, N y O como puentes y grupos COOH aromáticos (David, 2008).



**Figura 3. Estructura modelo del ácido húmico (Stevenson, 1982).**

Ácidos fúlvicos: fracción de las SH que es soluble en soluciones acuosas a cualquier valor de pH. Se las separa de los AH por acidificación, y los AF permanecen en solución. Son de color amarillo-amarronado. Los AF son de menor peso molecular, contienen mayor proporción de O y menor proporción de C que los AH. Los AF contienen además más grupos funcionales ácidos, principalmente grupos carboxílico (COOH). La estructura modelo del AF (modelo de Buffle) contiene estructuras aromáticas y alifáticas, ambas muy sustituidas con grupos funcionales oxigenados, como se ve en la Figura 4 (David, 2008).



**Figura 4. Estructura modelo de los ácidos fúlvicos.**

Huminas: fracción de SH insoluble en agua a cualquier valor de pH. Son de color negro (David P., 2008), pueden ser de dos tipos de origen: de herencia o neoformación.

La humina heredada está constituida por partículas de densidad menor de 1.8 gr/cm<sup>3</sup> se hallan retenidas en los agregados de la fracción pesada del suelo. Es mayoritaria en aquellos suelos que tienen una vegetación de difícil biodegradación. Entre las huminas de neoformación se encuentran las huminas de insolubilización extraíbles, de naturaleza comparable a la de los ácidos húmicos y fúlvicos, ligada a la fracción mineral por medio de enlaces que solo pueden ser destruidos en el laboratorio por medio de agentes químicos que rompen la unión con los silicatos.

#### 1.1.4 Gases y su difusión en perfil del suelo

Los principales gases que constituyen un suelo son, en esencia, los mismos que se encuentran en la atmósfera terrestre: nitrógeno, oxígeno y dióxido de carbono. Sin embargo, las concentraciones relativas de estos gases, en concreto del oxígeno y dióxido de carbono, dependen de la aireación del suelo y de la actividad microbiana (Eweis, 1999)

El mecanismo dominante de transporte de gases en el suelo es la difusión y permeación (Martínez, 2008). La superficie del suelo actúa como una membrana permeable que permite el paso de los gases. Los gases se pueden mover bien en la fase aire, esto es, a través de los poros, suponiendo que están conectados entre sí y en contacto con la atmósfera, o en la fase líquida, en forma disuelta. Sin embargo, debe advertirse que la difusión de gases en agua es unas diez mil veces más lenta que en la fase gas (Eweis, 1999).

### **1.1.5 Humedad de un suelo**

La humedad de un suelo influye en gran medida en la actividad biológica. Un suelo con una humedad demasiado baja da lugar a zonas secas y a una disminución en la actividad microbiana. Sin embargo, demasiada humedad inhibe el intercambio de gases y el movimiento de oxígeno a través del suelo. Tradicionalmente, se ha clasificado el agua en tres tipos: gravitacional, capilar y osmótica. El agua gravitacional, es el agua que se mueve en sentido descendente bajo la influencia de la gravedad. Es el agua que está disponible para los microorganismos y juega un papel importante en el transporte de contaminantes y otras materias. El agua capilar, aquella retenida en los poros, también está disponible para los microorganismos en un suelo. El agua osmótica es aquella retenida por las partículas de arcilla y el humus y, al contrario que los otros dos tipos de agua, no está al alcance de los microorganismos de un suelo (Eweis, 1999).

## **1.2 Ciclos biogeoquímicos**

Se le llama ciclo biogeoquímico al movimiento de cantidades masivas de carbono, nitrógeno, oxígeno, calcio, sodio, fósforo, potasio y otros elementos entre los seres vivos y el ambiente (atmósfera, biomasa (microorganismos) y sistemas acuáticos) mediante una serie de procesos de producción y descomposición.

Un elemento químico o molécula necesario para la vida de un organismo, se llama nutriente o nutrimento. Los organismos vivos necesitan de 30 a 40 elementos químicos, donde el número y tipos de estos elementos varía en cada especie. Los elementos requeridos por los organismos en grandes cantidades se denominan:

1. **Macronutrientes:** Carbono, oxígeno, hidrógeno, nitrógeno, fósforo, azufre, calcio, magnesio y potasio. Estos elementos y sus compuestos constituyen el 97% de la masa del cuerpo humano, y más de 95% de la masa de todos los organismos.
2. **Micronutrientes.** Son los 30 ó más elementos requeridos en cantidades pequeñas (hasta trazas): hierro, cobre, zinc, cloro y yodo.



La mayor parte de las sustancias químicas de la tierra no están en formas útiles para los organismos pero, los elementos y sus compuestos necesarios como nutrientes, son reciclados continuamente en formas complejas a través de las partes vivas y no vivas de la biosfera, y convertidas en formas útiles por una combinación de procesos biológicos, geológicos y químicos.

El nitrógeno es el macronutriente que en mayor medida condiciona la vida sobre la tierra, ya que es el nutriente mineral más demandado por las plantas, siendo el constituyente más habitual de las mismas, después del carbono y el oxígeno. Algunas de las etapas del ciclo del nitrógeno se describen a continuación.

El nitrato es la forma más importante de nitrógeno adquirida por las plantas en los suelos (Coyne, 2000).

La nitrificación es la oxidación biológica del amonio al nitrato por microorganismos aerobios que usan el oxígeno molecular ( $O_2$ ) como receptor de electrones, es decir, como oxidante. A estos organismos el proceso les sirve para obtener energía, al modo en que los heterótrofos la consiguen oxidando alimentos orgánicos a través de la respiración celular. La nitrificación consiste en dos procesos distintos, separados y consecutivos, realizados por organismos diferentes (García, 2011):

- Nitritación. Partiendo de amonio se obtiene nitrito ( $NO_2^-$ ). Lo realizan bacterias de, entre otros, los géneros *Nitrosomas*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira*, *Nitrosovibrio* *Nitrosococcus*.
- Nitratación. Partiendo de nitrito se produce nitrato ( $NO_3^-$ ). Lo realizan bacterias del género *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina*. Tan rápido como se forma el  $NO_2^-$  se oxida para formar  $NO_3^-$ .

Uno de los factores ambientales decisivos en la nitrificación es el pH. La nitrificación es más rápida en suelos que van de neutro a alcalinos y las bacterias nitrificantes son raras o inexistentes en ambientes ácidos (Coyne, 2000).

Amonificación: la mineralización es la descomposición de compuestos orgánicos de nitrógeno para liberar nitrógeno inorgánico. El nitrógeno total mineralizable presente en el suelo depende de su contenido original de nitrógeno orgánico. La amonificación es otro término con el que se designa este proceso, puesto que el producto inmediato es el amoniaco ( $NH_3$ , que rápidamente se convierte en amonio  $NH_4^+$  en las soluciones del suelo). El amonio es asimilado por los microorganismos para la producción de aminoácidos (García, 2011).

En la mineralización del nitrógeno, las macromoléculas se descomponen en subunidades y estas últimas, a su vez, se descomponen para liberar  $NH_4^+$ . Una vez que se produce  $NH_4^+$ ,

este tiene múltiples destinos: es absorbido por las plantas, incorporado a los materiales húmicos, volatilizado y oxidado.

Después del nitrógeno, el fósforo es el segundo nutriente inorgánico necesario para las plantas y microorganismos. La gran cantidad de vegetación que se descompone en el suelo es la principal fuente de compuestos orgánicos del fosforo. Los suelos ricos en materia orgánica contienen abundante fosforo orgánico.

El fosforo es un componente esencial del ácido ribonucleico (ARN), el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el adenosín trifosfato (ATP). El fosforo está presente en el ambiente terrestre de diversas formas y en concentraciones diversas que cabe clasificar como fosforo absorbido (soluble), fósforo orgánico fósforo mineral. La forma absorbida del fosforo es el anión ortofosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$ ). Dentro del ciclo del fosforo la mineralización resulta de gran importancia ya que consiste en la transformación por parte de los microorganismos del fosforo orgánico a formas inorgánicas. Por la acción de las bacterias, hongos y actinomicetos, el elemento combinado en los restos de vegetación y en la materia orgánica del suelo se transforma en elemento aprovechable para las generaciones siguientes de plantas (Alexander, 1980).

## **1.3 Contaminación de suelos por hidrocarburos.**

### **1.3.1 Hidrocarburos**

Los hidrocarburos son compuestos químicos formados del carbono e hidrógeno que de acuerdo a su estructura química pueden ser: parafinicos, oleofinicos, naftenicos y aromáticos.

Parafinas: son moléculas orgánicas de cadena lineal formadas por átomos de carbono e hidrogeno. También reciben el nombre de hidrocarburos saturados o alcanos. Pueden contener en su estructura ramificaciones (isoalcanos).

Oleofinas: Son hidrocarburos que contienen uno o más enlaces dobles entre carbono-carbono. En virtud de que contienen menos hidrógenos que los alcanos con la misma cantidad de átomos de carbono, con frecuencia se les dice no saturados.

Naftenicos: Los hidrocarburos cíclicos contienen cadenas carbonadas que se cierran en sus extremos formando ciclos o anillos. Son hidrocarburos cíclicos saturados que pueden ser cicloalcanos, cicloalquenos y cicloalquinos.

**Aromáticos:** Los hidrocarburos aromáticos son aquellos hidrocarburos que poseen las propiedades especiales asociadas con el núcleo o anillo del benceno, en el cual hay seis grupos de carbono-hidrógeno unidos a cada uno de los vértices de un hexágono.

Los hidrocarburos que contienen de uno a cuatro carbonos son gases. Con una cantidad de 4 a 20 carbonos, los hidrocarburos están en estado líquido a temperatura ambiente. Con menos de 20 carbonos, los hidrocarburos son sólidos a temperatura ambiente. Por otra parte, todos son biodegradables

### Petróleo

La palabra petróleo proviene del latín *petroleum* que significa aceite de roca. Es el resultado de la descomposición de la materia orgánica contenida en rocas sedimentarias (Santamaría, 2008), el petróleo (sólido, líquido y gas) procede de la acumulación y depósito del proceso de sedimentación a través de una serie de transformaciones que se producen en el subsuelo. Estas transformaciones dependen en gran medida de la temperatura, la cual varía de acuerdo a la profundidad de las aguas marítimas (Meléndez, 1982).

El petróleo crudo produce una variedad de derivados a través de una serie compleja de reacciones químicas y de cambios físicos que se pueden englobar básicamente en las seis operaciones principales siguientes: fraccionar, desintegrar, re arreglar, combinar, tratar y mezclar, esto para producir: gasolina, gas licuado de petróleo (gas LP), combustibles, asfaltos, coque y azufre (Torres y Castro, 2002).

El primer proceso al que se somete el petróleo en la refinería, es la destilación para separarlo en diferentes fracciones. Dentro de las torres de destilación, los líquidos y los vapores se separan en fracciones de acuerdo a su peso molecular y temperatura de ebullición. Las fracciones más ligeras, incluyendo gasolinas y gas LP, vaporizan y suben hasta la parte superior de la torre donde se condensan. Los líquidos medianamente pesados, como la querosina y la fracción diesel, se quedan en la parte media. Los líquidos más pesados y los gasóleos ligeros primarios, se separan más abajo, mientras que los más pesados en el fondo (Torres y Castro, 2002).

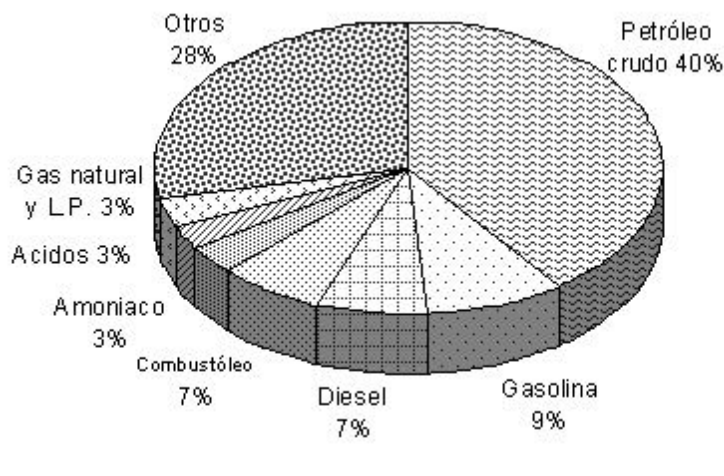
### Diesel

La hoja de datos de seguridad del diesel emitido por PEMEX describe a este combustible como una mezcla de hidrocarburos parafínicos, olefínicos y aromáticos, derivados del procesamiento del petróleo crudo, el cual contiene un 35% vol. (máx). de compuestos aromáticos. El diesel contiene moléculas de entre 10 y 20 carbonos que según la NOM - 138, 2003 entrarían en la clasificación de hidrocarburos de fracción media, con puntos límites de ebullición de 350°C (Leiva y Rodríguez, 2013)

### 1.3.2 La contaminación de suelos por hidrocarburos.

El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha provocado en el mundo un grave problema de contaminación de los suelos y los cuerpos de agua. En México, la industria del petróleo en su conjunto ha tenido un impacto negativo en materia ambiental. Debido a la amplia gama de productos derivados del petróleo, no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada desde la fase de explotación hasta la obtención de los productos petroquímicos básicos. Por las diferentes actividades industriales que efectúa, Petróleos Mexicanos (PEMEX), contamina potencialmente el ambiente por emisión de humos, polvos, gases y descargas de aguas residuales generadas durante la perforación de pozos petroleros, en la extracción de líquidos, por la refinación y en la producción de petroquímicos. Además, la transportación de petróleo crudo y productos refinados en buques tanque y tuberías tiene implícita la posibilidad de derrames que pueden contaminar suelo, agua y atmósfera (Ortínez, 2007).

Cada año se presentan en México un promedio de 550 emergencias ambientales (todos los eventos en los que se encuentran involucradas sustancias que implican algún riesgo para el ambiente o la población y que puedan generar la contaminación de suelos y cuerpos de agua, son conocidos como emergencias ambientales, asociadas con materiales y sustancias peligrosas). Dentro de los compuestos peligrosos más comúnmente involucrados en emergencias ambientales, se encuentran el petróleo y sus derivados (gasolinas, combustóleo, diesel, agroquímicos, gas LP y natural, entre otros) (Figura 5). (INE, 2010), siendo el diesel el producto que ocupa el tercer lugar en derrames de hidrocarburos en México y debido a que es uno de los combustibles con mayor demanda existen una gran cantidad de sitios contaminados, en los que es necesario aplicar técnicas efectivas, eficientes, económicas y seguras encaminadas a descontaminar los suelos.



**Figura 5. Principales sustancias involucradas en emergencias ambientales reportadas a las PROFEPA entre 1997 y 1999 (PROFEPA, 2002).**

La existencia de tres fases en el suelo (sólida, líquida y gaseosa), así como la gran diversidad de materiales que pueden constituirlo, lo convierten en un compartimento ambiental muy complejo. La distribución de los contaminantes orgánicos se encuentra condicionada por estas características, pudiéndose encontrar sustancias adsorbidas o materia orgánica, en disolución, o en fase de vapor sobre o dentro de las partículas de suelo. Al igual que en los medios acuáticos, los contaminantes orgánicos que se encuentran en la superficie pueden sufrir evaporación o fotooxidación. De este modo en el conjunto del suelo, los contaminantes orgánicos pueden ser transformados fisicoquímicamente o sufrir biodegradación. El proceso de transformación más importante es la biodegradación. Los microorganismos suelen estar distribuidos en el suelo formando microcolonias que se encuentran separadas algunos 100  $\mu\text{m}$ , y situadas en poros pequeños entre 0,8 y 3  $\mu\text{m}$  (Viñas, 2005).

### **1.3.3 Remediación de suelos**

La biorremediación ha surgido recientemente como una alternativa tecnológica para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados, donde se aprovecha el potencial de los microorganismos para mineralizar o transformar contaminantes orgánicos en compuestos químicamente más sencillos (Saval, 1998).

Técnicas de remediación de suelos

En función de los objetivos que se quieren alcanzar a la hora de recuperar un suelo contaminado (Kaifer *et al.*, 2004), se pueden distinguir:

Técnicas de contención, que aíslan el contaminante en el suelo sin actuar sobre él, generalmente mediante la aplicación de barreras físicas en el suelo;

Técnicas de confinamiento, que reducen la movilidad de los contaminantes en el suelo para evitar su migración actuando directamente sobre las condiciones fisicoquímicas bajo las que se encuentran los contaminantes;

Técnicas de descontaminación, dirigidas a disminuir la concentración de los contaminantes en el suelo.

Dentro de las técnicas de descontaminación, existe una técnica biológica ampliamente usada para la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos; biopilas.

Las biopilas también conocidas como bioceldas, biomontículos y pilas de compost, se usan para reducir las concentraciones de componentes del petróleo en suelos excavados, esto mediante biodegradación. Esta tecnología implica el amontonamiento de suelo contaminado en forma de pilas y estimular la actividad microbiana aeróbica dentro de los

suelos a través de la aireación y/o adición de nutrientes, humedad y aumento de microorganismos (biorremediación, bioaumentación y bioestimulación) (EPA, 1994).

### **1.3.4 Factores que condicionan la biorremediación del suelo.**

La distribución y el comportamiento de los compuestos orgánicos contaminantes en suelos están gobernados por diferentes factores que incluyen las características del suelo (pH, contenido en materia orgánica y arcilla, potencial redox, contenido en nutrientes, actividad microbiológica, etc.) y las propiedades específicas de cada compuesto (concentración y distribución en el suelo, difusión, permeación, presión de vapor, solubilidad, estabilidad química, biodegradabilidad, etc.)(Ortiz, 2007). Los cuales son descritos detalladamente a continuación.

Factores físicos, químicos y microbiológicos.

**Necesidad de nutrientes:** El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y síntesis. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno. Por lo general suele haber en el suelo una concentración de nutrientes suficiente, sin embargo, si estos no se encontrasen en el intervalo normal se puede adicionar mayor cantidad al medio. El intervalo normal de C : N : P depende del sistema de tratamiento a emplear, siendo de modo habitual 100:10:1( Maroto y Rogel, 2010).

**Potencial de hidrogeno (pH):** afecta significativamente en la actividad microbiana. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8. Así mismo el pH también afecta directamente en la solubilidad del fósforo y en el transporte de metales pesados en el suelo.

**Temperatura:** generalmente las especies bacterianas crecen a intervalos de temperatura entre 15 y 45 °C (condiciones mesófilas), decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40 °C e inhibiéndose a inferiores a 0 °C.

**Humedad:** los microorganismos requieren condiciones mínimas de humedad para su crecimiento. El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno en el suelo. El intervalo varía en función de la técnica.

**Factores químicos:** La estructura y esqueleto de los compuestos orgánicos tienen un mayor impacto sobre la viabilidad para microorganismos y su biodegradación. Los factores estructurales, que inhiben la degradación de los compuestos incluyen la presencia de grupos

amino, metoxi, sulfonatos y nitro, halogenación extensiva, pesos moleculares muy altos o cadenas de longitud larga; bencenos sustituidos en la posición meta, cadenas ramificadas de carbonos. La concentración de compuestos químicos en el ambiente puede afectar en gran medida la tasa de su biodegradación (Alexander, 1980).

Sin embargo, existen factores limitantes que pueden hacer que la degradación no se realice.

Factores microbiológicos: Las comunidades microbianas en ecosistemas contaminados tienden a ser dominadas por aquellos organismos capaces de utilizar y/o de sobrevivir a los compuestos tóxicos (Valderrama y Téllez, 2002). Si los microbios no están presentes en un sistema ellos pueden ser añadidos para ayudar a promover la biorremediación (bioaumentación).

### **1.3.5 Microorganismos en la biorremediación.**

Microorganismo es el término habitualmente empleado para describir a una célula de vida libre, son responsables de muchos ciclos, como el de nitrógeno, carbono, fosforo entre otros y juegan un papel muy importante en los procesos de biorrecuperación (Eweis *et al.*, 1999). Al igual que las plantas y los animales, los microorganismos presentan ciertos requerimientos básicos para su supervivencia: 1) un ambiente favorable, con un pH adecuado, una temperatura apropiada; 2) agua; 3) nutrientes minerales; 4) fuentes de energía, tratándose casi siempre de carbono orgánico; 5) fuentes de carbono, casi siempre orgánicos; 6) donadores y aceptores de electrones, 7) factores de crecimiento (Coyne, 2000).

Dentro de los microorganismos presentes en suelos se encuentran las bacterias, actinomicetos y hongos, los cuales se describen a continuación.

Las bacterias casi siempre son los degradadores primarios, aunque en algunas veces los hongos son importantes. Las bacterias desempeñan el papel de mayor importancia en la biodegradación de contaminantes orgánicos en suelos y aguas subterráneas (Eweis *et al.*, 1999). Siendo entonces las más empleadas en el proceso de biorremediación (Valderrama y Téllez, 2002).

Las bacterias son los organismos más abundantes en los suelos, siendo un grupo extremadamente diverso con variaciones extensivas de las propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas y son los degradadores primarios de compuestos orgánicos naturales y xenobioticos encontrados en el suelo. Algunas especies son degradadores primarios; esto es, ellas inician la degradación de la materia orgánica en el suelo. Otras especies crecen en compuestos resultantes de la degradación parcial de orgánicos complejos o productos residuales de degradadores primarios (Eweis *et al.*, 1999).

Las bacterias son frecuentemente clasificadas en base a su morfología. El mayor grupo morfológico de bacterias son los bacilos o bacterias en forma de bastón; los cocos o células esféricas y los espirilos o espirales. Los géneros más comunes de bacterias en suelo son *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* y *Flavobacterium* (Eweis *et al.*, 1999).

Los actinomicetos son un grupo que taxonómicamente están clasificados como bacterias aunque son similares a los hongos, a diferencia de estos los actinomicetos no tienen núcleo celular, de modo que son procarióticos. Los actinomicetos constituyen de un 10 a un 50% de la población microbiana total del suelo. Son los segundos en abundancia después de las bacterias en el suelo. Con ciertas excepciones son organismos aerobios (Coyne M., 2000).

Toleran un intervalo amplio de pH y temperatura, crecen bajo condiciones limitadas de nutrientes y son resistentes a la desecación, su tasa de crecimiento es más baja que la de las bacterias. Se ha demostrado que los actinomicetos degradan fenoles, aromáticos y aromáticos clorados entre otros compuestos (Eweis *et al.*, 1999).

Los hongos son otro tipo de microorganismos presentes en el suelo, son los principales agentes de la descomposición de la materia orgánica (Coyne, 2000), no tienen movimiento y emplean materia orgánica como fuente de carbono y energía. Son menos numerosos que las bacterias y son competentes en la mayoría de los procesos ingenieriles ambientales (Eweis *et al.*, 1999). Estos subsisten en un amplio intervalo de pH, pero son más tolerantes a suelos ácidos que otros microorganismos. Por otra parte los hongos son mesófilos, ya que proliferan en mayor grado en temperatura comprendidas entre 6 y 50 °C.

#### Interacciones entre microorganismos

Es importante observar a los microorganismos empleados en el tratamiento biológico como una asociación, una comunidad o un consorcio. Una asociación puede consistir de dos o más organismos que viven en estrecha continuidad uno a otro e interactuando entre sí. (Eweis *et al.*, 1999). Las interacciones positivas aumentan la tasa de crecimiento de una población, mientras que las interacciones negativas causan el efecto contrario. Con el aumento de la densidad de población, las interacciones positivas (cooperación) teóricamente aumentan la tasa de crecimiento hasta un límite asintótico. En cambio, las interacciones negativas (competencia) disminuyen la tasa de crecimiento cuando aumenta la densidad de población (Atlas y Bartha, 2006).

Las interacciones cooperativas dentro de una población son particularmente importantes cuando la población usa sustratos insolubles. La producción de enzimas extracelulares por algunos miembros de la población hace que dichos sustratos estén disponibles para todos. Se le llama interacciones por competencia puesto que los miembros de una población usan los mismos sustratos y ocupan el mismo nicho ecológico, si un individuo de la población



metaboliza una molécula de sustrato, ésta ya no estará disponible para el resto de la población (Atlas y Bartha, 2006).

### **1.3.6 Crecimiento celular y cinética de consumo de sustrato.**

Como cualquier organismo, los microorganismos nacen, crecen, se reproducen y mueren. crecimiento se define simplemente como un incremento en el número de microorganismos por unidad de tiempo. Muchas bacterias se reproducen a través del proceso de fisión celular donde dos células son formadas a partir de una célula madre. El tiempo que esta tarda en formar las dos células es llamado tiempo de generación o tiempo de duplicación que pueden ser tan cortos como de pocos minutos o tan largos como de horas (Eweis *et al.*, 1999).

El crecimiento de las poblaciones bacterianas está limitado normalmente o bien por el agotamiento de los nutrientes, o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo (Stainer *et al.*, 1986). El ciclo de crecimiento puede ser dividido en cuatro fases principales: latencia, exponencial, estacionaria y muerte.

La fase de latencia o retardo es el periodo de tiempo que toman las bacterias para aclimatarse al nuevo ambiente antes de empezar el crecimiento. La fase de latencia puede ser muy corta, como cuando las bacterias que están creciendo exponencialmente son transferidas a un medio con una composición similar de nutrientes a los que tenían cuando estaban creciendo (Eweis *et al.*, 1999).

El periodo de aclimatación puede ser muy largo, cientos de días en algunos casos, dependiendo de la biodegradabilidad del compuesto químico, la presencia de otras fuentes de carbono preferentes que tienen que ser primeramente extraídos y la presencia de microorganismos ya adaptados (Eweis *et al.*, 1999).

En el crecimiento exponencial, el número de células se incrementa exponencialmente. Eventualmente ocurre una limitación en la tasa de crecimiento. Durante la fase logaritmica las células comienzan a mostrar sus características visibles: morfología, color densidad y agrupación de sus colonias (Tortora *et al.*, 1993).

En esta fase el crecimiento neto es aproximadamente cero. Las células se dividen usando compuestos orgánicos acumulados o compuestos de células muertas y rotas.

La muerte puede simplemente significar la activación de la actividad metabólica o ésta puede ser descomposición real de la célula.

### Cinética de consumo de sustrato

El factor con mayor influencia sobre el crecimiento es la disponibilidad de sustrato cuando las condiciones ambientales son las óptimas. El sustrato es un término aplicado para el nutriente limitante de crecimiento. En muchos casos la fuente de carbono es el sustrato. Frecuentemente, la fuente de carbono es una mezcla de compuestos como los hidrocarburos totales del petróleo (TPH), los cuales se emplean como parámetros de concentración. En sistemas de suelo, las concentraciones se pueden mostrar como la masa de sustrato por unidad de masa de suelo (Eweis *et al.*, 1999).

La tasa de crecimiento será siempre en función de las condiciones ambientales, concentraciones de sustrato, oxígeno y células. Sin embargo en muchos casos, especialmente en aplicaciones en escala de campo, el sustrato depende de muchas variables y la modelización será problemática. Algunas de estas variables incluyen la predación por otros microorganismos, disponibilidad del sustrato, la presencia de fuentes preferenciales de carbono y la necesidad de un periodo de aclimatación. Los modelos simples tienen que ser formulados para el caso donde la desaparición del sustrato es solamente función de la concentración y de la biomasa microbiana. El modelo de biodegradación de primer orden es regularmente el más empleado, en donde se describe el consumo de sustrato en aplicaciones de campo. La escasez de datos, facilidad de aplicación y la mayor exactitud, son las razones por las que es ampliamente aceptado este modelo de primer orden (Eweis *et al.*, 1999).

La fórmula general de la cinética de primer orden que puede describir la tasa de reducción de concentración de TPH es (ecuación 1) (Yudono *et al.*, 2013):

$$\frac{dC}{dt} = -kC^n \quad 1$$

Donde:

t : tiempo

C : Concentración de TPH en cualquier tiempo.

n : Orden de reacción.

k : Constante de degradación.

Integrando y linealizando la ecuación 1 se obtiene 2

$$\ln[C] = -k t + \ln[C]_0 \quad 2$$

Donde:

$C_0$  = Concentración inicial de hidrocarburos

C = Concentración de hidrocarburos

t = Tiempo de eliminación

k = Constante de la tasa de cambio en el contenido de hidrocarburos en el suelo.

### Medición del número de células

El método más frecuentemente utilizado para la medición de poblaciones bacterianas es el recuento en placa, que se basa en asumir que cada bacteria crece y se divide dando lugar a una sola colonia. Cuando se realiza el recuento en placa es importante que crezca sólo un limitado número de colonias en la placa ya que un excesivo número de colonias causa inexactitudes al momento de realizar el conteo. Las unidades reportadas son unidades formadoras de colonias por volumen o masa (CFU/ mL ó CFU/ g) (Tortora *et al.*, 1993).

### Degradación biológica de hidrocarburos

En la biodegradación, los microorganismos transforman contaminantes mediante reacciones metabólicas (metabolismo es el término utilizado para referirse a más de un centenar de transformaciones químicas individuales que toman parte de una célula) (Stainer *et al.*, 1986). El objetivo final de estas reacciones o transformaciones es la producción de nuevas células. El metabolismo se divide en dos procesos: anabolismo o también llamado biosíntesis (que requiere de energía en el cual los microorganismos construyen material celular) y catabolismo (que producen energía en el cual los microorganismos oxidan compuestos). Estos dos procesos están estrechamente interrelacionados, así los compuestos orgánicos parcialmente oxidados a lo largo de la vía catabólica podrían servir como pasos iniciales en la síntesis de un componente celular (Eweis *et al.*, 1999).

La energía necesaria para crecer puede provenir de la oxidación de compuestos químicos (quimiotrofos) o de la luz (fotótrofos). Cuando un compuesto orgánico o inorgánico es oxidado, se desprende energía. Casi todas las reacciones llevadas a cabo en los procesos celulares requieren la utilización de unas proteínas llamadas enzimas que actúan como catalizadores. De aquí que los microorganismos actúen como reactores donde las enzimas actúan como catalizadores mediante reacciones de óxido-reducción. Cuando una reacción química tiene lugar se produce un cambio de energía que puede ser expresada en dos términos (Eweis *et al.*, 1999):

H=Entalpía=energía total liberada durante una reacción química.

G=energía libre=energía liberada y que está disponible para realizar un trabajo.

La diferencia entre entalpía y energía libre es la energía no disponible para realizar trabajo, ésta es a menudo disipada como calor. La variación de energía libre de un sistema puede tener un valor positivo (reacción no espontánea, endergónica) o negativo (energía libre liberada, reacción espontánea, exergónica) (Eweis *et al.*, 1999).

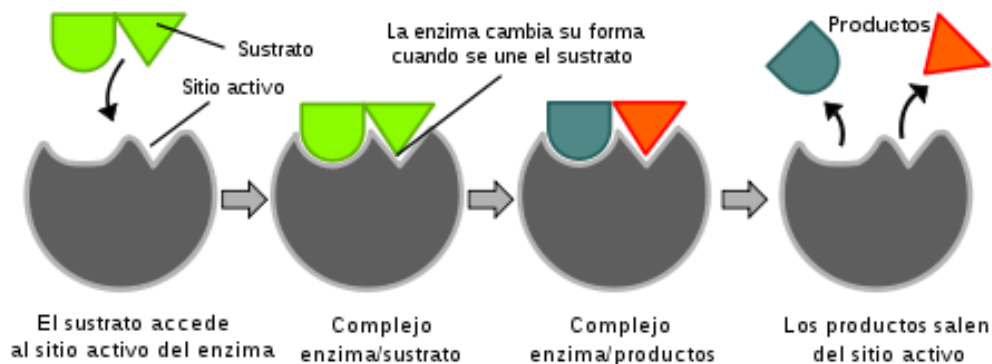
Para que las moléculas reaccionen entre sí, primero se requiere un aporte de energía para romper los enlaces de las moléculas y alcanzar un estado reactivo (Eweis *et al.*, 1999).

Las sustancias que pueden acelerar una reacción química disminuyendo su energía de activación, sin sufrir ellas mismas alteración, se llaman catalizadores, que en las células vivas son las enzimas (Tortora G., 1993). Las transformaciones biológicas de los compuestos orgánicos están catalizadas por acción de las enzimas, las cuales son proteínas, compuestas de aminoácidos (Eweis *et al.*, 1999).

#### Mecanismo de acción enzimática

Aunque los científicos no comprenden completamente cómo las enzimas disminuyen la energía de activación, se cree que la secuencia general de sucesos en la siguiente, la Figura 6 muestra este mecanismo de acción (Tortora *et al.*, 1993).

- 1.- La superficie del sustrato entra en contacto con una región específica de la superficie de la molécula de enzima llamada centro o sitio activo.
- 2.- Se forma un compuesto transitorio intermedio llamado complejo enzima-sustrato.
- 3.- La molécula de sustrato se transforma por reorganización de los átomos ya existentes, por rotura o combinación de varias moléculas de sustrato.
- 4.- Las moléculas de sustrato transformadas, los productos de la reacción, se liberan de la molécula de enzima.
- 5.- La enzima, ahora libre, puede reaccionar con otras moléculas de sustrato.



**Figura 6. Mecanismo de acción enzimática (Valencia, 2010).**

La biodegradación de un compuesto específico es frecuentemente un proceso que se realiza paso a paso en el cual se involucran muchas enzimas y muchos microorganismos. Las enzimas son específicas en términos de los compuestos que atacan y las reacciones que catalizan. Más de una enzima es normalmente requerida para romper una sustancia

orgánica. Frecuentemente, los organismos que tienen las enzimas para degradar el contaminante están presentes ya en el suelo (Eweins *et al.*, 1999).

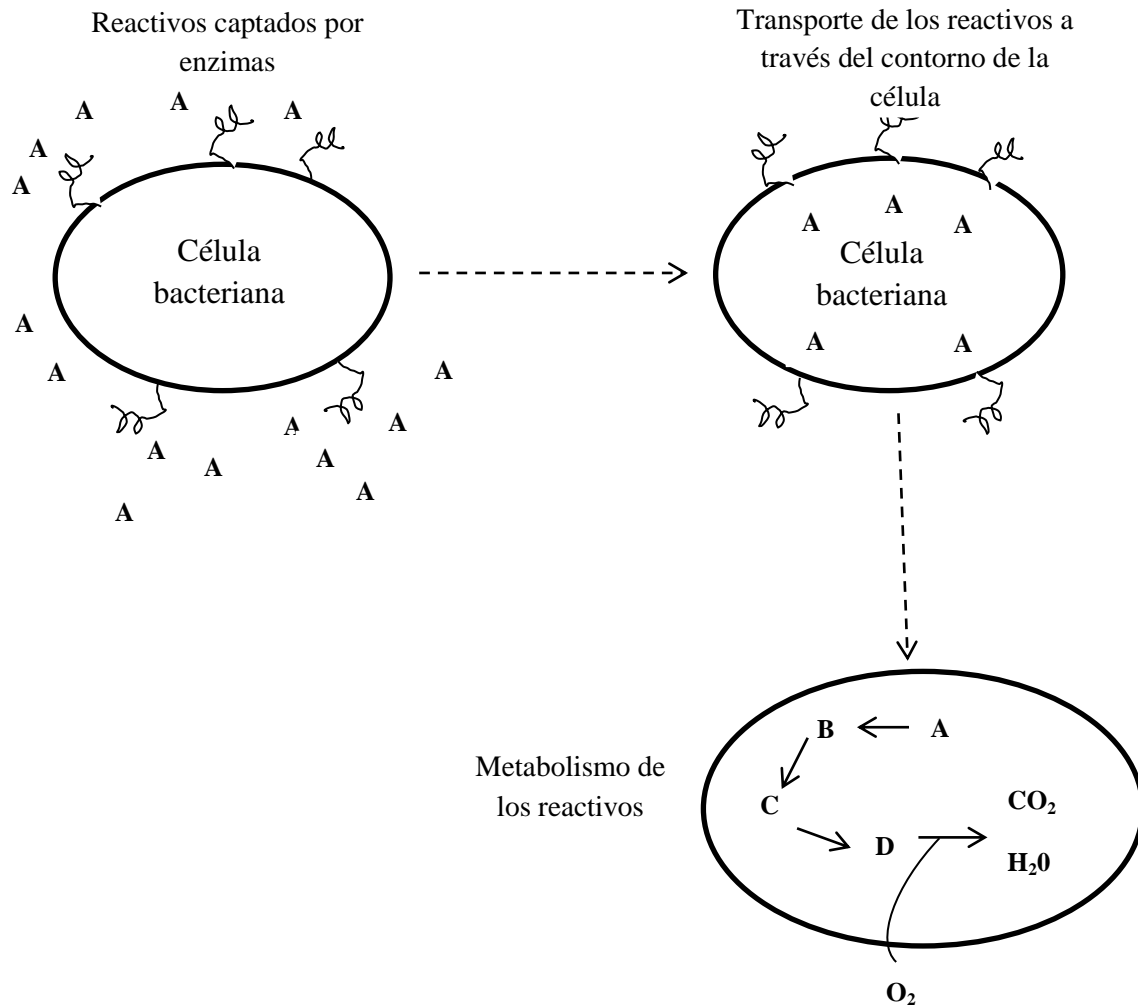
Los procesos de biorrecuperación más importantes conllevan la oxidación biológica de los contaminantes orgánicos. La Figura 7 esquematiza este proceso. Los compuestos biodegradables se encuentran inicialmente vinculados a enzimas extracelulares y son transportados a través de la membrana celular. Entonces, se producen una serie de reacciones de transformación en las cuales se separan los electrones del compuesto y se oxida la estructura del carbono. Una vez que los contaminantes orgánicos han sido convertidos en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O, se dice que se ha producido la mineralización. La biodegradación no siempre acaba en mineralización. El cambio en la estructura molecular de un contaminante durante la biorrecuperación puede llevar a la obtención de productos diferentes al compuesto reactivo, pero aún tóxicos o peligrosos. Los productos del petróleo difieren entre sí en su susceptibilidad a la descomposición (biodegradación). La facilidad de descomposición suele seguir este modelo (Coyne, 2000):

N-alcanos > alcanos ramificados > compuestos aromáticos de escaso peso molecular > alcanos cíclicos.

Los alcanos de cadena larga son más resistentes a la biodegradación a medida que la longitud de su cadena aumenta. En general también la presencia de ramificaciones reduce la tasa de biodegradación porque los átomos de carbono terciario y cuaternario interfieren con los mecanismos de degradación o lo bloquean totalmente.

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria, o transportadora de electrones de las células, van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la degradación de hidrocarburos. La oxidación es la separación de electrones ( $e^-$  de una molécula). En muchas oxidaciones celulares se extraen a la vez dos electrones y dos iones de hidrógeno (H<sup>+</sup>); esto equivale a extraer dos átomos de hidrogeno. Puesto que la mayoría de las oxidaciones biológicas conllevan las pérdidas de átomos de hidrógeno se denominan reacciones de deshidrogenación. Las reacciones de oxidación-reducción están siempre acopladas; en otras palabras, cada vez que se oxida una sustancia otra es reducida casi al mismo tiempo (Tortora *et al.*, 1993.).

En la degradación de hidrocarburos la cadena la inicia con un sustrato orgánico que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia (Maroto y Rogel, 2010).

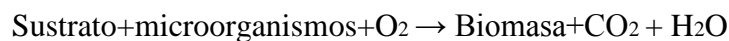


**Figura 7. Esquema de un proceso de biodegradación. Un reactivo orgánico A se encuentra vinculado a una enzima extracelular y como consecuencia de ello, es transportado al interior de la célula. El proceso de oxidación biológica conlleva una serie de reacciones en las cuales se separan los electrones del compuesto (Eweis, 2000).**

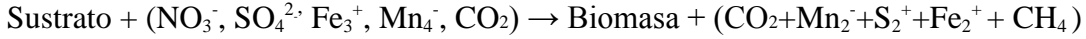
Reacciones oxido-reducción.

Los microorganismos que utilizan hidrocarburos como sustrato deben de tener enzimas denominada monooxigenasas que son dependientes de oxígeno. Cuando los microorganismos utilizan el oxígeno como aceptor de electrones la degradación es llevada a cabo en condiciones aerobias (Maroto y Rogel, 2010).

Degradación aerobia:

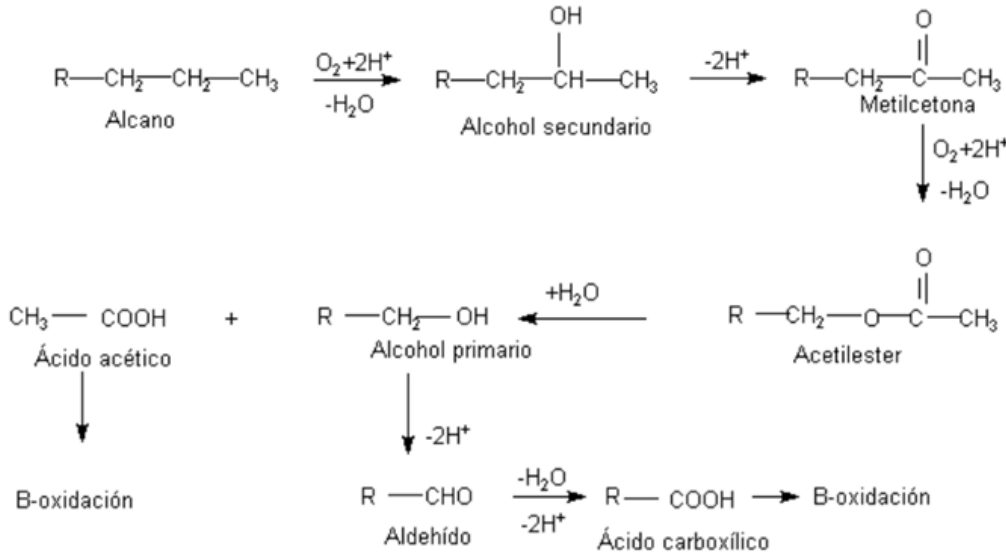


Degradación anaerobia:



La mayoría de los microorganismos en teoría si son capaces de sobrevivir en ese ambiente pueden degradar sin más problemas hidrocarburos de cadenas más largas. Para que los microorganismos puedan degradar alcanos primero deben de oxidar con oxígeno, el último carbono de la molécula, gracias al complejo multienzimático que no hacen más que incorporar esta molécula de oxígeno. Así se obtiene un hidrocarburo con un grupo alcohol siendo así molécula más reactiva. Mediante otras enzimas este grupo alcohol se oxida aún más, hasta grupo aldehído y finalmente carboxílico. Así se obtiene una molécula similar a un ácido graso y puede ser degradado a acetyl coenzima A (acetyl-coA) por  $\beta$ -oxidación que puede ser observado en la Figura 8 (Grady, 1985; Voet y Voet, 1995).

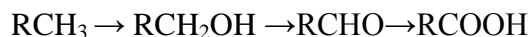
Este proceso de oxidación también puede darse en carbonos no terminales dando lugar a dos ácidos grasos que se procesarán por  $\beta$ -oxidación. Aunque la mayoría de microorganismos en teoría sean capaces de utilizar este mecanismo pocos pueden vivir en esas condiciones. Para hacerlo deben ser capaces de vivir en un medio muy hidrófobo como es el petróleo.



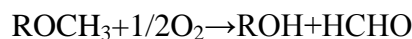
**Figura 8 Proceso de oxidación de los hidrocarburos alifáticos.**

La primera fase del metabolismo aromático es, con frecuencia, la modificación o eliminación de sustituyentes en el anillo de benceno y la introducción de grupos hidroxilo.

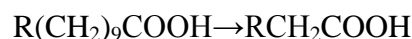
Los grupos metilo son convertidos a grupos carboxilo antes de la ruptura del anillo, reacción que se realiza gradualmente:



Sin embargo, algunas veces el metilo no es eliminado antes de que el anillo sea abierto. Con frecuencia, pero no siempre, el carboxilo es eliminado antes de la ruptura del anillo. El metoxilo es reemplazado por un hidroxilo y da lugar a formaldehído.



Las cadenas alifáticas largas son cortadas para producir un residuo con uno o dos átomos de carbono menos. Esto ocurre gradualmente, casi siempre por  $\beta$ -oxidación.



Para obtener energía y carbono de la transformación los organismos deben romper el anillo. La abertura del anillo casi siempre requiere de la adición de oxígeno. Esta necesidad por  $O_2$  determina que los organismos involucrados sean aerobios. Los microorganismos que utilizan estos compuestos aromáticos como fuente de carbono, hacen es que en lugar de utilizar una enzima monooxigenasa específica para cada molécula diferente, utilizan unas vías bioquímicas llamadas vías altas o periféricas que consisten en modificar los diferentes anillos aromáticos absorbidos en protocatecuato y catecol Figura 9.

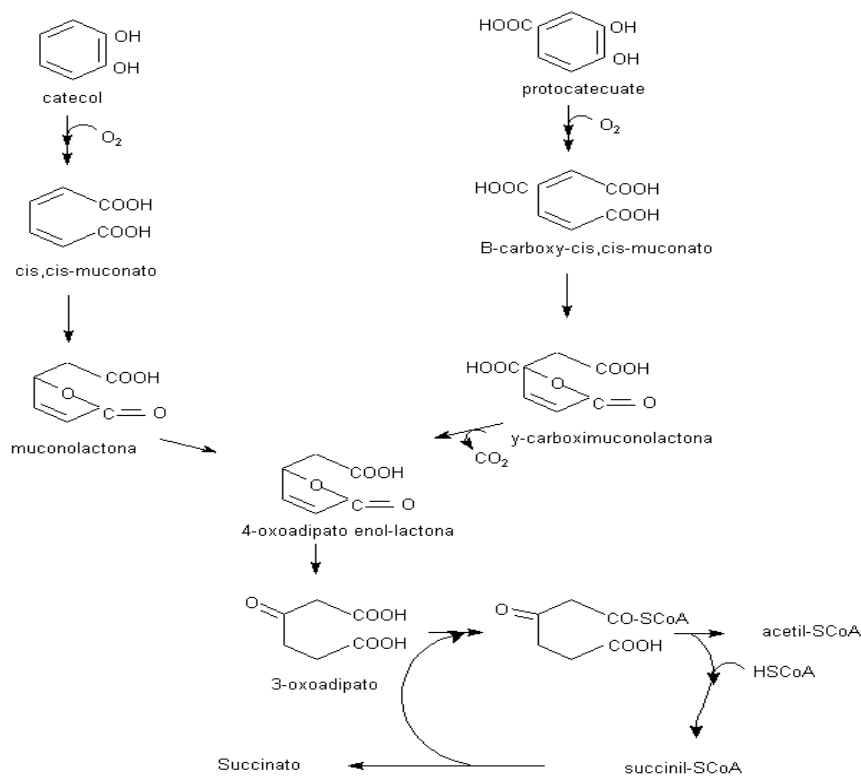


Figura 9. Proceso de oxidación de los hidrocarburos aromáticos.



Es decir, la gran variedad de compuestos aromáticos que se pueden encontrar son modificados y convertidos a estas dos moléculas. A partir de estas dos moléculas que convergen todos los compuestos, ya se puede llevar a cabo el rompimiento del anillo mediante enzimas específicas. Esta segunda fase en la degradación sería lo que se conocería como vías bajas.

Dentro de los microorganismos degradadores de hidrocarburos que se han identificado están: *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilis*, *Acinetobacter junii*, y *Pseudomonas sp* (Telles, 2002). Otro microorganismo aerobico muy utilizado en las prácticas de biorremediación es el *Rhodococcus sp.* ya que posee una gran variedad de vías metabólicas para la degradación y modificación de compuestos aromáticos, incluyendo las actividades de di-oxigenasa y mono-oxigenasa sobre anillos, así como la actividad de ruptura de catecol.

Nuevas especies de *Rhodococcus sp.* que presentan una nueva mutación tienen la capacidad de degradar compuestos alifáticos con enlaces dobles principalmente en el noveno carbono del grupo metilo terminal (alquenos).

La *pseudomona aeruginosa* es identificada como degradadora de gran cantidad de sustratos como en n-hexadecano, mineralización de compuestos alifáticos en condiciones anaerobias, y degradadora de hidrocarburos aromáticos y poli aromáticos (Flavio, 1999; Nelson, 2002).

La *pseudomona fluorescens* es degradadora de naftaleno y fenantreno, ventaja que tiene frente a las otras *pseudomonas*, que solo metabolizan naftaleno y asfaltenos (Roche, 2003).

La degradación del bifenil policlorinado (PCBs) y otros hidrocarburos por microorganismos como *Comamonas acidovorans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Achromobacter sp.* *Pseudomonas sp.* *Flavobacterium devorans*. *Bacillus lentus*, *Bacillus mascerans* y *Bacillus thuringensis* ha sido aplicada con buenos resultados para el tratamiento de los mismos. Se ha referenciado que las *Comamonas sp* son degradadoras de fenantreno, *Gordona sp.* degrada el pireno, de 5 a 35 días luego de ser inoculada. *Azoarcus sp.* puede degradar benceno, tolueno, etilbenzeno y xileno (Carla, 2004 ; Hideli, 2000).

## 1.4 Antecedentes

El término biorrecuperación se emplea para describir una gran variedad de sistemas de ingeniería que utilizan microorganismos para degradar compuestos químicos orgánicos. A mediados del siglo XX se desarrollaron las primeras investigaciones encaminadas a estudiar el potencial de los microorganismos para biodegradar contaminantes (Torres, 2009). Durante los últimos años, la mayor parte de los estudios publicados sobre biorrecuperación se han referido al tratamiento de aquellos terrenos contaminados con compuestos derivados del petróleo (Eweis *et al.*, 1999). En los últimos 30 años, se ha venido utilizando con éxito la biorrecuperación en el tratamiento de terrenos contaminados con petróleo (Ryan *et al.*, 1991).

La inclusión de nutrientes (bioestimulación) para estimular el crecimiento bacteriano e incrementar la tasa de remoción de hidrocarburos fue probada en Alaska, luego del derrame del Exxon Valdez el 23 de Marzo de 1989 (Torres, 2009). Numerosos estudios han sido enfocados hacia el aumento de la tasa de velocidad de degradación de contaminantes derivados del petróleo presentes en suelos, por lo que se han desarrollado técnicas combinadas con estrategias como bioaumentación y bioestimulación.

A continuación se describen algunos de los trabajos que se han realizado probando diferentes enmiendas como material de bioestimulación, así como la inoculación de consorcios indígenas y comerciales como estrategia de bioaumentación.

(Quinn y Reinhart, 1997) utilizaron biopilas con un sistema de irrigación de nutrientes logrando bajar la concentración de TPH de 3000 mg/kg a 10 mg/kg en 12 semanas, con una constante de velocidad promedio de degradación igual a  $2.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

Desechos orgánicos han sido utilizados también para la remediación de suelos con hidrocarburos. (Auxilia *et al.*, 2002) demostraron que cuando adicionaron al suelo contaminado de humus líquido más excreta de pollo disminuyeron en un 97% la concentración de HTP's contenidos en suelo.

Otros trabajos han utilizados diferentes estrategias de bioestimulación combinadas, como (Hazen *et al.*, 2003) quienes diseñaron biopilas con aireación pasiva y activa (inyección de aire) en combinación con la adición de nutrientes como viruta de madera y otros materiales vegetales, para la degradación de 120,000 toneladas de suelos contaminados con HTP's con concentración inicial de 30,000 ppm de hidrocarburos alifáticos y de aromáticos polinucleares. Ellos alcanzaron velocidades de biodegradación de 121 mg/kg suelo/día con aireación activa, mientras que con la aireación pasiva obtuvieron velocidad de 82 mg/kg suelo/día.

(Rivera y Dendooven, 2004) han estudiado las eficiencias de degradación de HTP's a escala laboratorio de muestras de 50 mg de suelo con adición de diesel comercial,

utilizando como fuente de nutrientes compuestos como maíz y biosólidos (lodos generados en el tratamiento de aguas residuales). Realizaron 4 tratamientos de suelo sin esterilizar con diesel: el primero contenía suelo con diesel; el segundo suelo con diesel y maíz, el tercero suelo con diesel y biosólidos, el cuarto suelo con diesel más biosólidos y maíz. Estos tratamientos fueron puestos en frascos de vidrio de 120 mL (experimentación en microcosmos). De todos los tratamientos el compuesto por suelo con diesel más maíz más biosólidos presentó una degradación más rápida en los primeros 10 días de tratamiento, seguido del tratamiento de suelo con diesel más maíz y por último los tratamientos suelo con diesel más biosólidos y suelo con diesel. En base a los resultados ellos concluyen que los biosólidos aceleran la descomposición de diesel debido a su gran contenido de nutrientes, pero después de 100 días la cantidad de gasóleo mineralizada y la concentración residual de TPH no se vio afectada por el tratamiento aplicado y señalan que el uso de los desechos orgánicos locales disponibles parece ser una alternativa barata prometedora para acelerar la descomposición de diesel en el suelo contaminado.

(Roldan *et al.*, 2005) emplearon un sistema de biopilas adicionado con granos de café para la biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos. El trabajo lo dividieron en tres etapas: pruebas de tratabilidad en microcosmos, biopilas a nivel laboratorio, y biopilas en campo. En las tres etapas evaluaron los comportamientos de parámetros como materia orgánica, nitrógeno, fósforo, pH, humedad e HTP's. En la primera etapa evaluaron pruebas de tratabilidad con diferentes materiales orgánicos, escogiendo al tratamiento con grano de café. En la segunda etapa se construyó una biopila de 23 kg de suelo contaminado, en forma de pirámide trunca con dimensiones 0.5x0.3x0.2 m. El suelo contenía una concentración inicial de TPH igual a 58,000 mg/kg, alcanzando una remoción de contaminantes de 69% después de 12 semanas. Y en la tercera etapa construyeron biopilas en campo monitoreadas durante 12 semanas evaluando tres niveles de contaminación: 20,000 ppm, 40,000 ppm y 90,000 ppm, alcanzando eficiencias de 78, 54 y 54 % respectivamente. Ellos concluyen que es posible utilizar granos de café de calidad inferior con bajo valor comercial en bajas cantidades, para el saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.

Por su parte (Dueñas y Santos, 2006) encontraron eficiencias similares entre los tratamientos bioestimulados y bioaumentados. Ellos evaluaron durante 120 días 3 parcelas con 450 kg cada una de suelo contaminado sintéticamente con residuos de contaminación de alquitrán con 14,000 ppm de concentración inicial. Al primer tratamiento le adicionaron fertilizante inorgánico comercial (nitrógeno, fosforo y potasio), al segundo tratamiento le adicionaron fertilizantes comerciales y la inoculación de un consorcio de bacterias nativas y en el tercer tratamiento adicionaron fertilizantes comerciales y un consorcio de bacterias comerciales. Todos los tratamientos fueron humedecidos y aireados manualmente. Al final del proceso ellos alcanzaron porcentajes de degradación de 48.6 para el tratamiento con el

consorcio comercial, 46.2 para el tratamiento con solo adición de nutrientes y 34% para el tratamiento con inoculación de bacterias nativas.

También se han evaluados trabajos de biorremediación a pequeña escala. (Gómez *et al.*, 2009) utilizaron bandejas con 2 kg de suelo contaminado sintéticamente con una mezcla de combustibles gasolina-diesel, para probar estrategias de bioaumentación y bioestimulación por separado y en conjunto. Los resultados obtenidos en tres meses de tratamiento indican que la reducción de concentración de HTP's fue mayor en el tratamiento por bioaumentación (64.92%), al cual se le adicionaron nutrientes (urea y fosfato de potasio) más la inoculación de un microorganismo (*Bacillus* sp.) identificado por los mismos autores, mientras que el tratamiento bioestimulado (suelo contaminado más adición de nutrientes) redujo un 60.45% la concentración de HTP's, siendo entonces el tratamiento bioaumentado el de mejor desempeño.

(Windevoxhel *et al.*, 2011) estudiaron el efecto en parcelas de un producto húmico y la bioaumentación de un suelo petrolizado con y sin adición de inóculo. Los resultados que obtuvieron indican que el mejor tratamiento fue la combinación de humus y la inoculación, alcanzando eficiencias por arriba del 90% en la remoción de grasas y aceites.

(Mérida y Rodríguez, 2011) utilizaron el composteo para tratar lodos de recorte mediante un consorcio bacteriano y la adición de ácidos húmicos (AH) como surfactante natural. Estos autores estudiaron el efecto que tienen los AH sobre los hidrocarburos presentes en los lodos de recorte. Para ello construyeron 4 sistemas. El primer sistema se utilizó como blanco, el cual contenía lodo de recorte, un segundo sistema se adicionó 2.2 kg de composta (lodos de recorte base aceite, paso de recorte y ramas de maleza) a este se bioestimulo adicionando 500 mL de una solución de nutrientes de nitrógeno y fosforo en una relación de 100:10:1, en un tercer sistema se adiciono 2.2 kg de composta y se le adicionaron 500 mL de los mismos nutrientes y se bioaumentó con 500 mL de un inóculo previamente adaptado, en un cuarto sistema de 2.2 kg de suelo se adicionaron 500 mL de nutrientes, 500 mL de inóculo adaptado y 500 mL de ácidos húmicos. Los sistemas fueron cerrados. Ellos aseguran de acuerdo a los resultados que los AH afectan de manera positiva la degradación de los hidrocarburos presentes y que consecuentemente existe una disminución. Los porcentajes de remoción obtenidos fueron 14% para el tratamiento 2 solo bioestimulado, 40% para el tratamiento tres (bioaumentado y bioestimulado) y 54% para el tratamiento cuatro (bioestimulado y bioaumentado con AH).

(Alessandra, *et al.*, 2012) probaron tres tratamientos de remediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH): landfarming, bioestimulación y bioestimulación con bioaumentación. El experimento fue llevado a cabo en bandejas de plástico de 6.8x27x42.5 cm, con 5 kg de suelo cada una. Posteriormente adicionaron nutrientes ((NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup> y K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> kg<sup>-1</sup>) con una relación de C:N:P de 100:10:1 al tratamiento de bioestimulación, nutrientes más inoculación de la solución con el consorcio de microorganismos

previamente adaptados con concentración de  $10^8$  células/mL. Las bandejas fueron mezcladas manualmente 2 veces por semana para promover el contacto con el aire. Después de 129 días de experimentación las eficiencias de remoción fueron 87%, 89% y 87 % para landfarming, bioestimulación y bioestimulación con bioaumentación respectivamente. Ellos encontraron que las tasas de velocidad de degradación no presentaron grandes diferencias entre los tratamientos.

De acuerdo a los antecedentes antes descritos, en la actualidad es de gran interés el uso de estrategias de bioestimulación y bioaumentación con diferentes sustancias y microorganismos que permitan acelerar los procesos de biodegradación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante técnicas biológicas, todo esto con el fin de reducir la amenaza hacia los ecosistemas y a la salud pública, que ocasiona este grave problema de contaminación de suelos que existe a nivel mundial.

Afortunadamente, tras muchos años de investigación se han desarrollado técnicas basadas en la biodegradación, las cuales utilizan el potencial metabólico de los microorganismos para degradar y/o convertir los contaminantes orgánicos en sustancias inocuas. En la práctica, esto requiere pruebas de biodegradación amigables con el ambiente que se desarrollen dentro de periodos razonables de ejecución, junto con la demostración de que no se perturban procesos esenciales del ambiente. Sí bien los procesos de biodegradación se dan de forma natural, algunas veces resulta necesario acelerar las velocidades de degradación adicionando nutrientes o microorganismos a los sistemas biológicos.

Debido a lo antes descrito este trabajo plantea como objetivo principal, degradar los compuestos derivados de diesel contenidos en suelos, mediante biopilas aireadas manualmente utilizando sustancias húmicas y un consorcio comercial de bacterias *Pseudomonas sp.*, además de estudiar y comparar el efecto de la bioaumentación y bioestimulación en los tratamientos de biodegradación contruidos, determinar las tasas de remoción de hidrocarburos totales del petróleo y estudiar el comportamiento y la influencia de variables físico-químicas, biológicas que intervienen el proceso de descontaminación.

## CAPITULO II. MATERIALES Y METODOS

En este capítulo se dará una explicación detallada sobre el diseño experimental empleado, así como los reactivos, materiales y equipos utilizados. Se introduce al lector con un esquema de trabajo realizado en campo y laboratorio (Figura 10) para una mejor ubicación y un panorama general de este proyecto. Posteriormente se describirá la metodología de cada uno de los diferentes factores físicos, químicos y microbiológicos determinados a lo largo del proceso de remediación.

Este apartado describe el diseño de tres biopilas de 50 kg de suelo cada una, construidas a la intemperie para la biorrecuperación de suelos contaminados sintéticamente con diesel comercial, simulando así una contaminación real ocasionado por un derrame de este tipo de combustible. Para ello se diseñó un experimento, el cual consistió principalmente en dos etapas, la primera de ella es la selección, extracción y caracterización del suelo antes de ser contaminado, esto para conocer las propiedades como: textura, pH, capacidad de retención de agua, capacidad de intercambio catiónico, conductividad eléctrica, humedad, contenido de nutrientes (nitrógeno y fosforo), materia orgánica del suelo, carbono orgánico y cantidad de microorganismos, hidrocarburos totales del petróleo. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que era viable utilizar este suelo como punto de partida del experimento para ser contaminado y posteriormente biorrecuperarlo, utilizando estrategias de bioaugmentación y bioestimulación (adición de sustancias húmicas, aireación activa, adición de agua y la inoculación de un consorcio de bacterias comercial del género *Pseudomonas* sp). La segunda etapa tuvo una duración de 4 meses durante los cuales se realizó el seguimiento, la determinación y análisis de diferentes factores físicos, químicos y microbiológicos del proceso. Estos factores se seleccionaron de tal manera que proporcionaran información indispensable sobre lo que sucedía durante el proceso de la biorrecuperación del suelo. Esta segunda etapa se realizó *in situ* y en el laboratorio. *In situ* se midió la temperatura y humedad de las biopilas, las cuales eran aireadas manualmente y en caso de ser necesario se adicionaba agua. Para el análisis en laboratorio se tomaron semanalmente muestras representativas de suelo de cada biopila durante 112 días y estas se analizaron determinando: pH, conductividad eléctrica, humedad, amonio, nitratos, carbono y materia orgánica, nitrógeno total, fósforo, concentración de hidrocarburos totales del petróleo, cantidad de microorganismos y dióxido de carbono emitido por los microorganismos.

Es importante mencionar que todas las determinaciones experimentales incluidas en este trabajo estuvieron basadas en las siguientes normas, procedimientos y manuales: NORMA OFICIAL MEXICANA: NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, NOM-021-SEMARNAT-2000, NOM-092-SSA1-1994, Agencia de Protección Ambiental: EPA-510-R-04-002, American Society for testing and materials: ASTM D-2216, Manual de técnicas de análisis de suelos, Manual de prácticas de laboratorio de química ambiental II de UPIBI, 2009.

## 2.1 Diseño experimental.

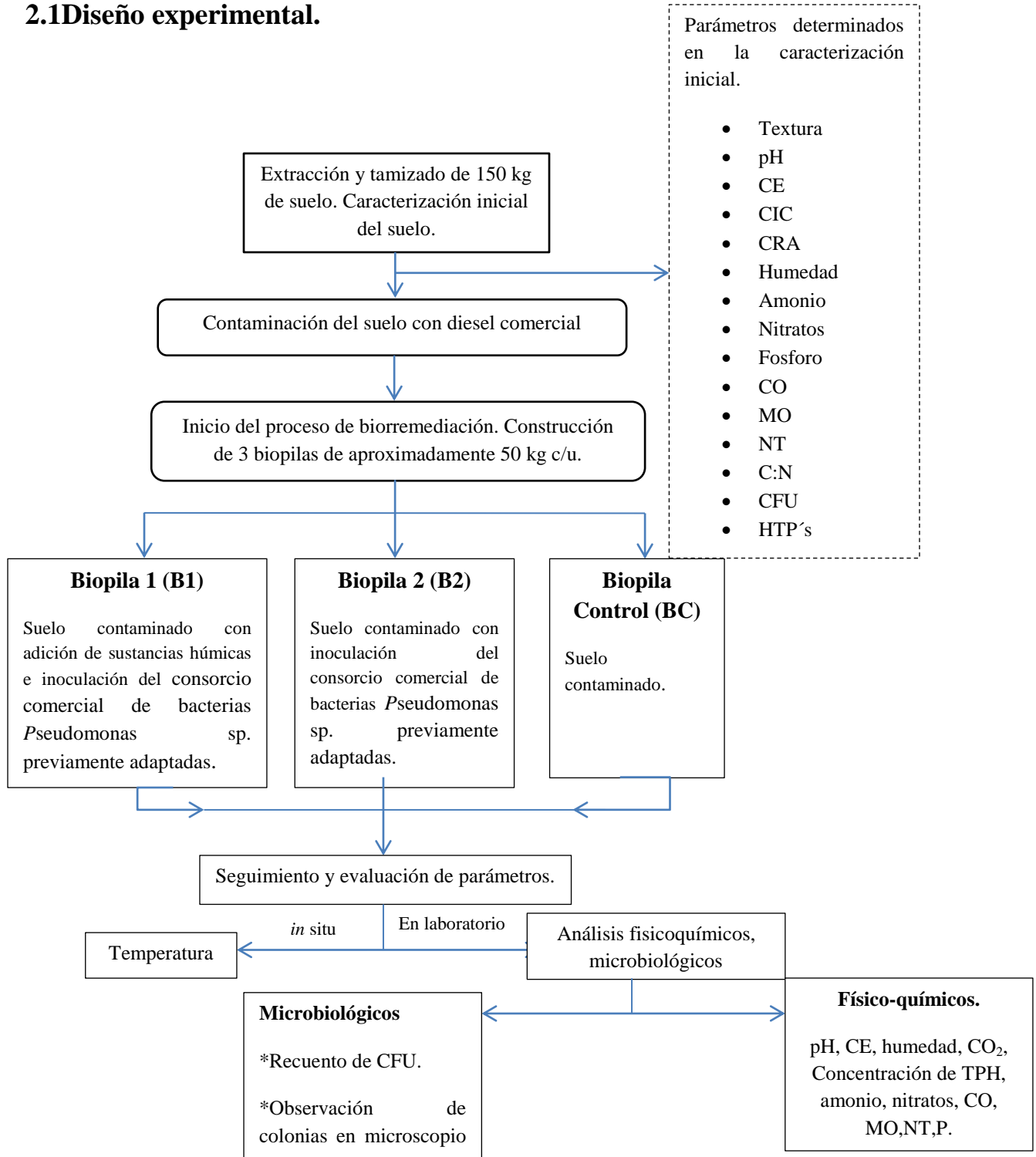


Figura 10. Esquema general del trabajo experimental.

### 2.1.1 Extracción y preparación del suelo.

El suelo con composta fue extraído de la planta de producción de composta de la unidad profesional Zacatenco del Instituto Politécnico Nacional (México), se tomó en los primeros 25 cm de profundidad y corresponde a una muestra disturbada. Se extrajeron aproximadamente 150 kg de suelo que fue secado al aire para después ser tamizado en una malla de acero para obtención de un diámetro de partícula de 2 mm (Alessandra *et al.*, 2012) (

Figura 11).



**Figura 11. Proceso de preparación del suelo extraído sin contaminar. Suelo secado al aire (izquierda) y tamizado (derecha).**

Del suelo extraído se tomó una muestra compuesta por cuarteo y a esta se le realizó una caracterización inicial para establecer las características más importantes de esta matriz la cual sería contaminada posteriormente para la eliminación de los contaminantes adicionados, este análisis indico la textura, el pH, humedad, contenido MO y CO, CE, CIC, disposición de nutrientes ( $\text{NT}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ), CFU y HTP's. Factores importantes para llevar a cabo una recuperación de suelos. Una vez conociendo estos parámetros el suelo se contaminó con diesel comercial mexicano (Figura 12).





**Figura 12. Aspecto físico del suelo después de ser contaminado con diesel comercial mexicano.**

Una vez contaminado se realizó la construcción de las biopilas experimentales, las cuales se ubicaron en la planta de producción de composta-IPN-Zacatenco.

### 2.1.2 Construcción de biopilas.

Se construyeron 3 biopilas (Tabla 3) de 50 kg de suelo contaminado cada una, las dimensiones de cada una fueron: 1 m de largo por 0.6 m de ancho y 0.4 m de alto, formando una estructura geométrica piramidal truncada en la superficie (Figura 18) (Roldán *et al.*, 2005), el aspecto físico puede ser observado en la Figura 13. Las biopilas fueron colocadas sobre bases de metal perforadas que fueron cubiertas con plástico para evitar pérdidas de suelo (Figura 13), se mantuvieron tapadas con plástico por las noches como protección en caso de lluvias. Las biopilas fueron aireadas manualmente de 2-3 veces por semana (Alessandra *et al.*, 2012). Todas las biopilas se construyeron de la misma manera, cada una en zonas separadas.

**Tabla 3. Características de las biopilas experimentales.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Adición de sustancias húmicas.</b>	<b>Inoculación de consorcio comercial de bacterias.</b>
Biopila 1 (B1)	+	+
Biopila 2 (B2)	-	+
Biopila control (BC)	-	-



**Figura 13. Construcción de biopilas experimentales puestas sobre bases de metal (izquierda) con cubierta de plástico para evitar pérdidas de suelo (derecha).**

### 2.1.3 Bioaumentación

Adaptación e inoculación del consorcio.

El consorcio comercial utilizado para la bioaumentación de microorganismos en B1 y B2, está compuesto por bacterias tipo *Pseudomonas sp.* Las cuales fueron adaptadas a un medio mineral saturado con diesel comercial mexicano como única fuente de carbono antes de inocularse a los sistemas de biorremediación. El aspecto de este consorcio puede ser observado en la Figura 14 y Figura 15.

El procedimiento de adaptación se realizó de la siguiente manera:

Se preparó 1L de medio reestructivo o solución base de acuerdo a las Tabla 4y Tabla 5.

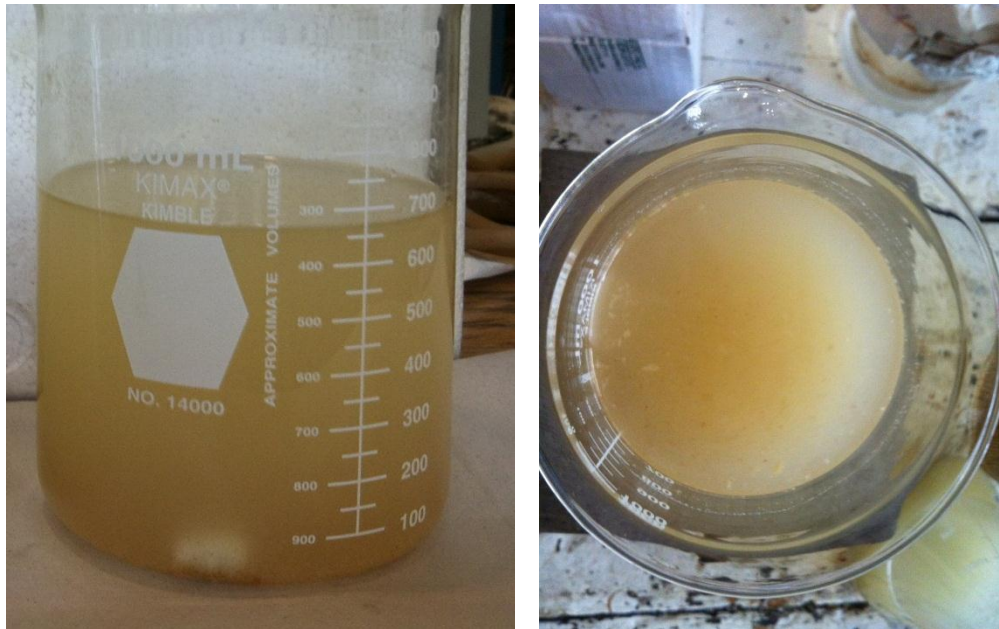
**Tabla 4. Compuestos utilizados para la preparación del medio reestructivo.**

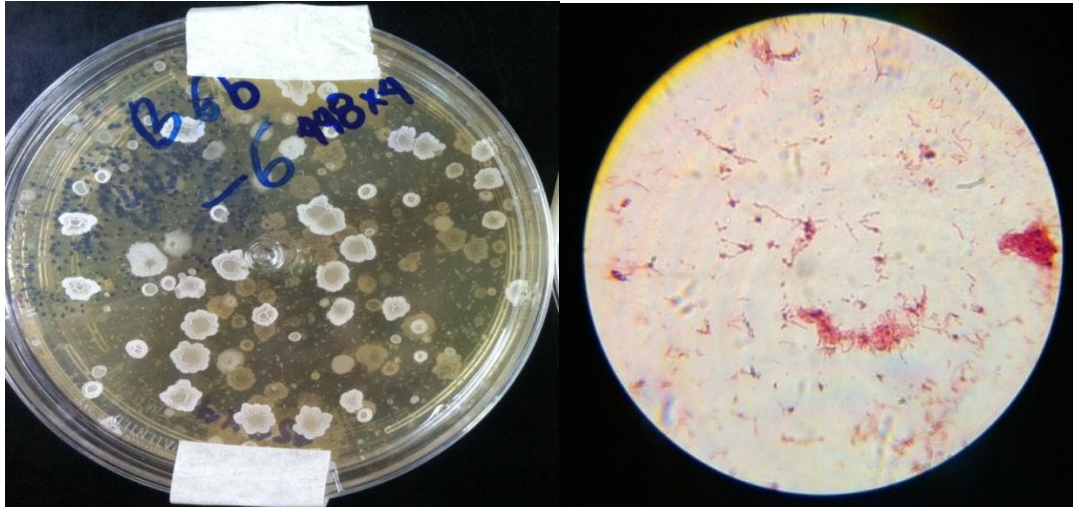
Agua destilada	1.0 L.
FeCl <sub>2</sub>	1.6 g.
NaCl	0.40 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.50 g.
MgCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.40 g.
NH <sub>4</sub> Cl	0.40 g.
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.05 g.
Solución de elementos traza	1.0 mL

**Tabla 5. Compuestos utilizados para preparación de solución de elementos traza**

Agua destilada	1 L.
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.0 mg
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	3.0 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.0 mg
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	20.0 mg
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1.0 mg
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.0 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2H <sub>2</sub> O	3.0 mg

Posteriormente se ajustó el pH de la solución base a 7.2 y se adicionó 100 mL de diesel, la solución se agitó a 20 rpm y 30°C durante 24 horas. Cumplidas las 24 horas la fase acuosa saturada con hidrocarburos del diesel fue separada de la fase orgánica por decantación. A la fase acuosa se adicionó 1 g de producto comercial con las bacterias *Pseudomonas* sp. y se llevó a un agitador magnético a 20 rpm y 30 °C por 3 días para su posterior inoculación al sistema de biorremediación. La inoculación del consorcio a las biopilas 1 y 2 se realizó solo en el primer día de experimentación, adicionando 6 litros a cada una con una densidad de bacterias de  $1.8 \times 10^9$  CFU/mL.

**Figura 14. Aspecto del inculo comercial adaptado previo a su incorporación a B1.**



**Figura 15** Aspecto de las placas sembradas con el consorcio comercial de bacterias (izquierda) y morfología microscópica (100x) de *Pseudomonas sp.* (derecha).

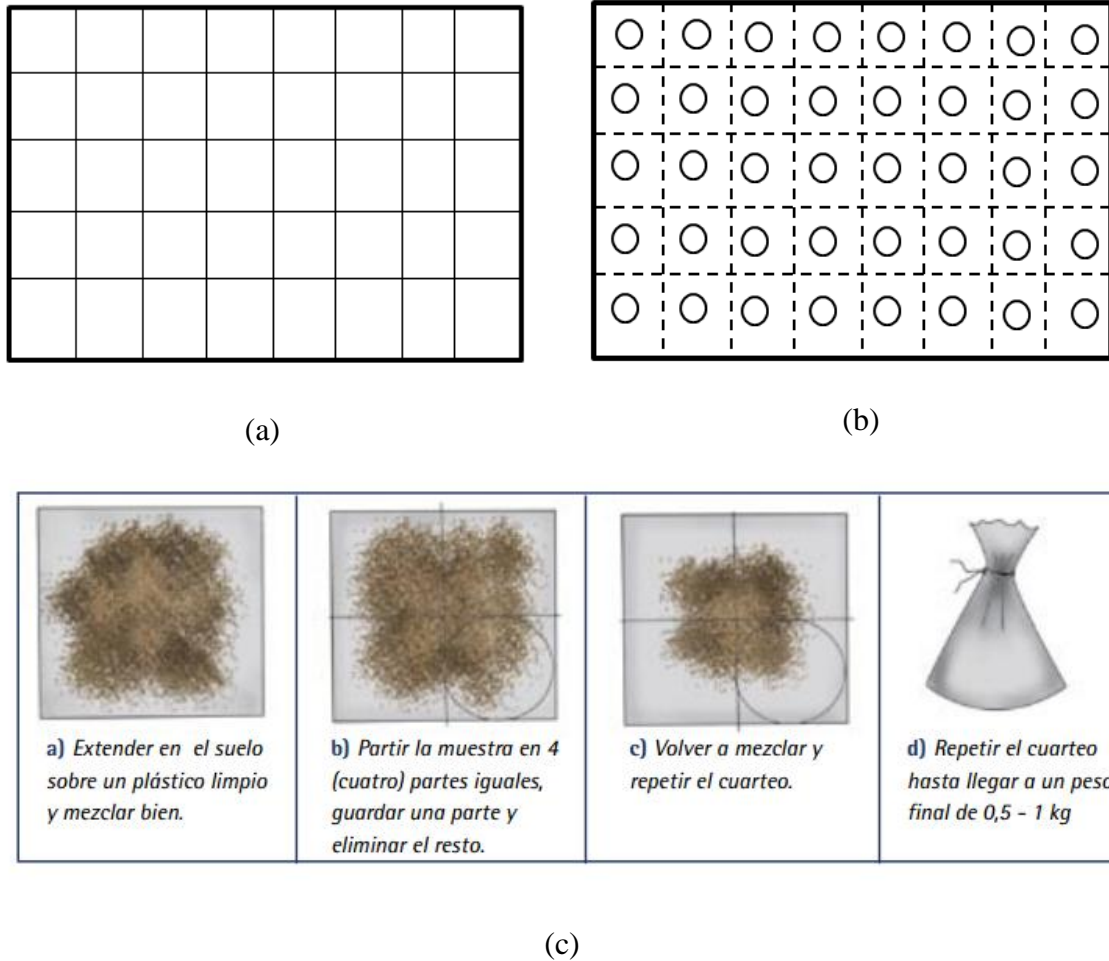
Adición de sustancias húmicas.

Las sustancias húmicas utilizadas fueron proporcionadas por la Universidad Autónoma de Chapingo, las cuales se adicionaron a B2 al inicio de la experimentación (día 1).

Se adicionó un volumen de 3 litros con una densidad de microorganismos de  $1.8 \times 10^6$  CFU/mL al tratamiento B2.

## 2.2 Muestreo

El muestreo se llevó a cabo semanalmente. El tipo de muestreo utilizado fue en rejilla y los puntos de muestreo para extraer las submuestras fue realizado en forma de cuadrícula, posteriormente estas submuestras se extendían sobre una cubierta de plástico limpia y se homogeneizaban, se realizaba un cuarteo del suelo, se tomaba una parte y el resto se volvía a mezclar y se repetía el procedimiento de cuarteo hasta completar aproximadamente 1 kg. de muestra para cada biopila (Figura 16). Posteriormente las muestras eran transportadas al laboratorio en bolsas de plástico selladas y debidamente identificadas. En caso de que las muestras fueran utilizadas para análisis de cuantificación de HTP's, las muestras eran manejadas y preservadas de acuerdo a como lo señala la NOM-138-SEMARNAT-2003.



**Figura 16. Muestreo (a) en rejilla, (b) Puntos de muestreo en cuadrícula para extracción de submuestras y (c) cuarteo y toma de la muestra compuesta.**

Análisis fisicoquímico del suelo.

➤ Textura del suelo.

Para la determinación de la textura del suelo se utilizó el método de Bouyoucos (Bouyoucos, 1962). Para ello se pesaron 50 g. de suelo previamente tamizado, se colocó en una licuadora y se adicionaron 10 mL de solución de hexametáfosfato de sodio, esta mezcla se licuó por 2 min y posteriormente se vertió el contenido en una probeta de 1 L, arrastrando las partículas con agua destilada y hasta completar un volumen de 1 L, se tapó y homogeneizó. Se colocó la probeta en una mesa y se registró el tiempo, inmediatamente se introdujo el densímetro en la probeta y transcurridos 40 s. se registró la primera lectura del densímetro (c), así como la temperatura (T). 120 min. después se registró la segunda lectura de densidad y temperatura (c' y T').

Una vez conocidos los valores de densidad y temperatura se determinó el tipo de textura del suelo con las siguientes ecuaciones (3) y (4).

$$x = \frac{c + (T - 20) \times 0.36}{50} \times 100 \quad 3$$

$$y = \frac{c + (T' - 20) \times 0.36}{50} \times 100 \quad 4$$

Donde:

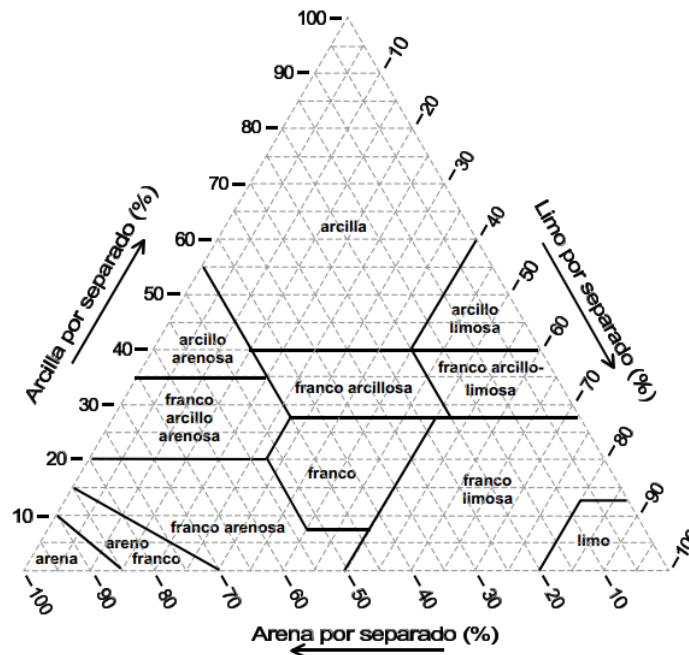
$x$ = porcentaje peso de limo + arcilla.

$y$ =porcentaje peso de arcilla.

$100-x$ =porcentaje peso de arena.

0.36= Factor de corrección por grado de diferencia de temperatura.

Posteriormente con los resultados obtenidos y la Figura 17 se determinó la textura del suelo.



**Figura 17. Triángulo textural del suelo mostrando los porcentajes de arcilla, limo y arena de las clases texturales (USDA, 1999).**

- Humedad del suelo y capacidad de retención de agua (CRA).

La determinación del contenido natural de humedad del suelo se realizó de acuerdo al método ASTM D-2216-98, con los resultados obtenidos y empleando la ecuación 5, se calculó el porcentaje peso de agua.

$$w = \frac{M_{cws} - M_{cs}}{M_{cs} - M_s} \times 100 \quad 5$$

Donde:

$w$  = porcentaje peso de contenido de agua.

$M_{cws}$  = peso de la capsula + suelo húmedo (g).

$M_{cs}$  = peso de la capsula + suelo seco (g).

$M_c$  = peso de la capsula (g).

Para conocer la capacidad de retención de agua del suelo (CRA) se pesaron 20 g de suelo, de humedad conocida. Se colocaron en papel filtro (previamente pesado) sobre un embudo de filtración y se adicionaron 100 mL de agua destilada, se tapó el embudo para evitar pérdidas de agua por evaporación y se dejó reposar por 24 horas, transcurrido este tiempo se pesó el papel filtro con el suelo húmedo y se utilizaron las ecuaciones 6 y 7 para conocer los porcentajes de este parámetro.

$$A_{PF} = \frac{\text{peso del papel húmedo} - \text{peso del papel seco}}{\text{peso del papél seco}} \quad 6$$

$$CRA = \frac{P_m - P_{ss} - P_{FS} - A_{PF}}{P_{ss}} \times 100 \quad 7$$

$CRA$  = capacidad de retención de agua

$P_m$  = peso de la muestra húmeda después de 24h, g.

$P_{ss}$  = peso del suelo seco, g.

$P_{FS}$  = peso del papel filtro seco, g.

$A_{PF}$  = gramos de agua absorbida por gramo de papel filtro

➤ Capacidad de intercambio catiónico (CIC).

Para la CIC se pesó 1g de suelo y se colocó en un tubo de centrifuga, se adicionaron 25 mL de solución de cloruro bórico 0.5 N - trietanolamina 0.2 N. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 min. Se retiró el líquido centrifugado y se adicionaron al mismo tubo de 25 mL de sulfato de magnesio 0.1 N y se centrifugó nuevamente a 3000 rpm durante 5 min. Se

tomaron 10 mL de líquido centrifugado y se vertieron en un matraz enrlenmeyer, se adicionaron 20 mL de agua destilada y 10 mL de solución tampón e indicador de ericromo negro T, posteriormente se valoró la solución con EDTA 0.05 N. Para la determinación de la C.I.C. de los ácidos húmicos se siguió la misma metodología, solo que en lugar de 1g. de suelo se tomaron 10 mL de sustancias húmicas.

Para el cálculo de la capacidad de cambio en miliequivalentes por 100 g de suelo se empleó la ecuación (8).

$$CIC = \frac{(M - N) \times N_{EDTA} \times 2.5 \times 100}{P} = \frac{(M - N) \times 12.5}{P} \quad 8$$

Donde:

$N_{EDTA}$  = Normalidad del EDTA.

$M$  = Mililitros de solución EDTA empleados en valorar 10mL de solución de sulfato de magnesio.

$N$  = Mililitros de solución EDTA empleados en la valoración de los 10mL del extracto.

$P$  = Peso en gramos de la muestra.

2.5 = Factor de dilución (el suelo se extrajo con 25mL de solución de sulfato de magnesio y, para la valoración, sólo se tomaron 10ml del extracto).

➤ Conductividad eléctrica (CE), potencial de hidrogeno (pH) y contenido de humedad.

Para la medición de pH y CE se siguió el siguiente procedimiento (Juárez, *et al.*, 1996): Se pesaron 100 g de suelo en frascos de vidrio y se adicionó agua destilada hasta observar 2 mm de agua por encima de la superficie del suelo. Se tapó con papel aluminio y se dejó reposar. 24 h después se decantó el agua y se colocó en un tubo de ensaye y se tomaron lecturas de pH y CE utilizando un conductímetro marca OAKTON® modelo:WD-35607-40 y un potenciómetro marca: Cole Parmer® modelo: ILLINOIS 60061.

Para las sustancias húmicas se tomaron 20 mL por triplicado de solución en un tubo de ensaye y se midieron lecturas de pH y CE con los equipos antes descritos.

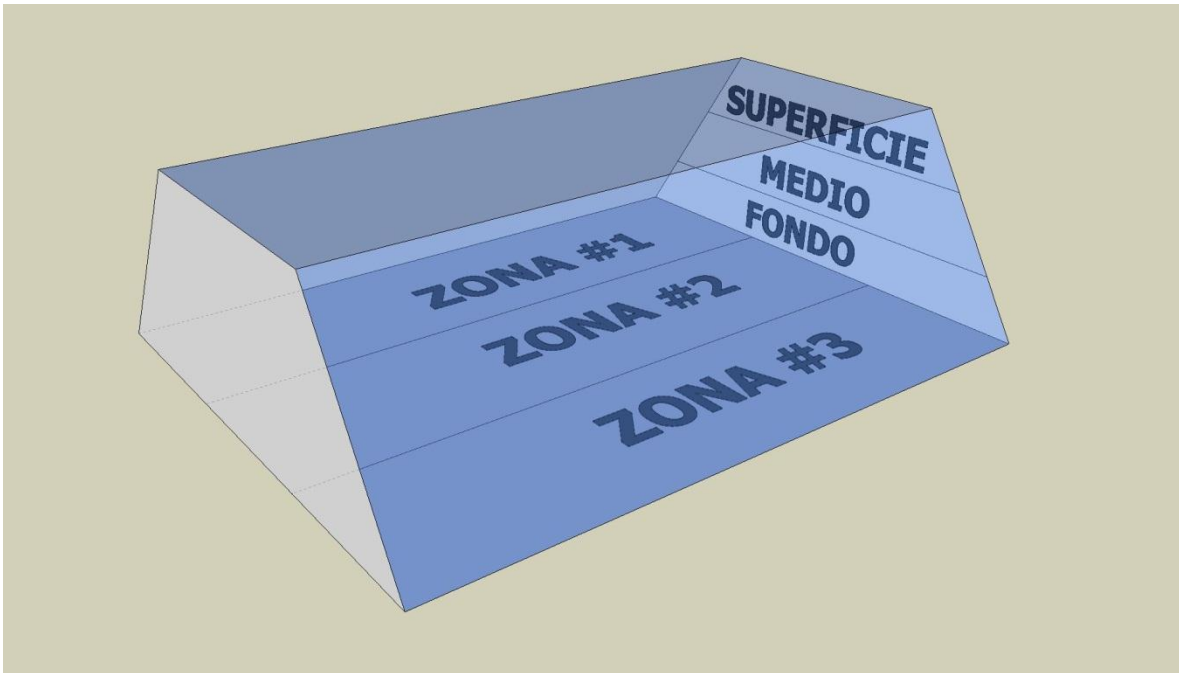
El contenido de agua de los suelos estudiados se estimó gravimétricamente, por diferencia de peso antes y después de haber sometido a una muestra (por triplicado) a calentamiento en estufa a 110 °C durante 48 h. La diferencia de peso respecto al suelo húmedo se expresó como porcentaje de humedad.



➤ Temperatura

Para la medición de temperatura se utilizaron termómetros de mercurio. La base de cada biopila se dividió en tres zonas (1, 2 y 3) al igual que la altura (superficie, medio y fondo) (Figura 18).

A lo largo de cada zona se tomaron 9 lecturas alternando los puntos de registro de temperatura en la superficie, medio y fondo, como se observa en la Figura 18.



**Figura 18. Biopila dividida a lo largo y alto para el registro de temperaturas.**

➤ Carbono orgánico (CO).

La determinación de carbono orgánico se evaluó a través del método de Walkley y Black (Juárez *et al.*, 1996; NOM-021-SEMARNAT-2000; Schulte, 1995). Este método se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácidos, una vez oxidada la materia orgánica el dicromato de potasio residual es valorado con sulfato ferroso amoniacal (SFA), con este procedimiento se detecta entre un 70-84% del carbono orgánico total (NOM-021-SEMARNAT-2000). Para ello se pesaron aproximadamente 0.2 g. de suelo y se adicionaron 20 mL de dicromato de potasio 0.4 N y 10 mL de mezcla de ácidos ( $H_3PO_4:H_2SO_4:H_2O$ , 2.5:2.5:5.0.). Posteriormente se llevaron a autoclave y se calentó durante 15 min a 121°C y 15 atm. Se dejaron enfriar y se titularon con SFA 0.2 N. en presencia de indicador de fenantrolina.

Para el cálculo de la concentración de carbono oxidable total se utilizó la ecuación 9 (Juárez *et al.*, 1996; NOM-021-SEMARNAT-2000; Schulte, 1995):

$$CO = \frac{(B - S)N \times 0.003 \times 1.29}{g} \quad 9$$

*CO* = Carbono Orgánico (g C/Kg suelo)

*B* = Volumen de SFA gastado para valorar blanco (mL).

*S* = Volumen de SFA gastado para valorar muestra (mL).

*N* = Normalidad del SFA

0.003 = peso miliequivalente del carbono.

1.29 = Factor de corrección ya que solo se oxida el 77% del carbono.

*g* = Peso de la muestra empleada seca (kg).

Materia Orgánica (MO)

Una vez obtenido el porcentaje de CO se realiza el cálculo del porcentaje de MO empleando la ecuación 8. En la mayoría de los laboratorios se sigue usando el factor de Van Benmelen de 1.724 (ecuación 10) para estimar la materia orgánica a partir del carbono orgánico, el cual resulta de la suposición de que la materia orgánica contiene un 58% de carbono (NOM-021,2000).

$$\%MO = 1.724 * \%CO \quad 10$$

➤ Nitrógeno total (NT).

La determinación de nitrógeno total se realiza con el método Kjeldahl (Juárez, *et al.*, 1996; NOM-021-SEMARNAT-2000).

El método Kjeldahl lleva las formas orgánicas a formas minerales de nitrógeno de suelo. Comprende tres fases fundamentales: digestión, destilación y valoración del nitrógeno inorgánico (ion  $NH_4^+$ ).

Para la determinación del nitrógeno total se pesaron 0.5 g. de suelo en un matraz Kjeldahl. y se adicionaron 0.5 g de sulfato de potasio y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, posteriormente se calentó en una unidad digestora. Una vez digerida la muestra los matraces se dejaron enfriar y se adicionó agua destilada transfiriendo la solución a un matraz erlenmeyer, adicionando 400 mL de agua destilada y 50 mL de hidróxido de sodio

al 50%. Se colocaron en un equipo de destilación y se recolectaron aproximadamente 75 mL del destilado en un matraz erlenmeyer que contenía 10 mL de solución de ácido bórico + indicadores (verde de bromocresol y rojo de metilo). Una vez obtenidos los 75 mL de destilado se titularon con ácido sulfúrico 0.1 N. Para la determinación de NT en las sustancias húmicas se tomaron 5 mL de la solución para digestión y se siguió la misma metodología descrita.

Para el cálculo del porcentaje de NT se empleó la siguiente ecuación (11):

$$\%NT = \frac{(T - B) \times N \times 0.014 \times 100}{S} \quad 11$$

Donde:

*%NT= porcentaje de nitrógeno total.*

*T = mL de ácido sulfúrico valorado gastados en la muestra.*

*B = mL de ácido sulfúrico valorado gastados en el blanco.*

*N = Normalidad del ácido sulfúrico.*

*S = Peso de la muestra de suelo.*

*0.014= Miliequivalentes de nitrógeno*

*100= Factor para convertir a porcentaje.*

- Nitratos.
- Extracción

Se pesaron 10 g de suelo en un frasco de plástico de 100 mL y se adicionaron 80 mL de sulfato de potasio 0.5 M, se taparon y agitaron durante 20 min a 240 rpm. Posteriormente los frascos se dejaron reposar durante 5 min, se filtraron 20 mL de extracto en frascos de vidrio y se llevaron a un horno a 100°C por 24 h.

- Desarrollo de color.

Trascurridas las 24 h se sacaron los frascos del horno con los cristales formados y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 2 mL de ácido 2-4 fenildisulfónico y 9 mL de solución de hidróxido de potasio 12 N. La solución con cristales se filtró sobre papel filtro y se adicionó agua destilada hasta un aforo de 50 mL. Por último se leyó en un espectrofotómetro de UV a 410 nm. Se preparó una curva tipo para el cálculo de la concentración de nitratos (Figura 34).

Para el cálculo de concentración de nitratos se utilizó la siguiente ecuación (12):

$$\frac{\text{mg NO}_3^{-1}}{\text{kg suelo}} = \frac{C_{N-\text{NO}_3^{-1}} \times VT_{K_2SO_4}}{a \times w_{ss}} \quad 12$$

Donde:

$C$  = Concentración de  $\text{NO}_3^-$  obtenidos de la curva tipo ( $\mu\text{g/mL}$ ).

$VT$  = Volumen total del extracto de suelo con  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0.5 M. (mL)

$a$  = Alícuota usada en la determinación (mL).

$w_{ss}$  = Peso de muestra (g).

Amonio.

Para la determinación de amonio se tomaron 3 mL del extracto obtenido en la filtración para la determinación de nitratos y se transfirieron a tubos de ensaye adicionando 7 mL de sulfato de potasio 0.5 M, 1 mL de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 4 mL de nitroprusiato-salicilato, 4 mL de agua destilada, 2 mL de buffer de hipoclorito y 3 mL de agua destilada, posteriormente se calentaron a baño maría a  $40^\circ\text{C}$  durante 30 min., se dejaron enfriar a temperatura ambiente para después leer a 667 nm en un espectrofotómetro de UV-VIS. Se preparó una curva tipo (Figura 35). para el cálculo de la concentración de amonio (ecuación 13).

$$\frac{\text{mg NH}_4^+}{\text{kg suelo}} = \frac{C_{N-\text{NH}_4^+} \times VT_{K_2SO_4}}{w_{ss}} \quad 13$$

$C$  = Concentración de  $\text{NH}_4^+$  obtenidos de la curva tipo ( $\mu\text{g/mL}$ ).

$VT$  = Volumen total del extracto de suelo con sulfato de potasio 0.5 M. (mL)

$w_{ss}$  = Peso del suelo seco (g)

- Fosforo.
- Extracción.

Para la determinación de fosforo soluble se pesaron 10 g de suelo en un frasco de plástico de 100 mL y se adicionaron 100 mL de  $\text{NaHCO}_3$  0.5M, se taparon y se agitaron durante 20 min a 240 rpm en un agitador mecánico. Se dejó reposar la suspensión y posteriormente se filtró sobre papel filtro de poro medio hasta completar un volumen de 5 mL.

Para la determinación de este parámetro contenido en las sustancias húmicas se tomaron 100 mL y se llevaron a una concentración 0.5 M de NaHCO<sub>3</sub>, para posteriormente continuar con el desarrollo de color.

- Desarrollo de color.

Se tomó 1 mL del extracto en un tubo de ensaye adicionando 9 mL de agua y 1.6 mL de reactivo combinado (5 mL de ácido sulfúrico 5N + 1 mL de solución de tartrato de K Y Sb + 3 mL de solución de molibdato de amonio y 6 mL de la solución de ácido ascórbico). Posteriormente se agito y leyó en un espectrofotómetro de UV a 880 nm. Se preparó una curva tipo (Figura 36) para el cálculo de la concentración de fosforo (ecuación 14).

$$\frac{mg PO_4^{-3}}{kg suelo} = \left[ \frac{(C_{PO_4^{-3}} \times VT_{NaHCO_3})}{w_{ss}} \right] \quad 14$$

$C$  = Concentración de  $PO_4^{-3}$  del suelo obtenidos de la curva tipo ( $\mu g/mL$ ).

$VT$  = Volumen total del extracto de suelo con  $K_2SO_4$  0.5 M. (mL)

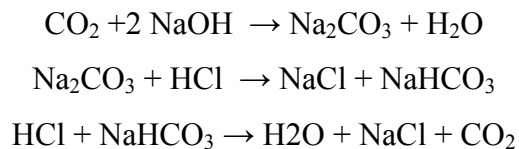
$w_{ss}$  = peso del suelo seco (g).

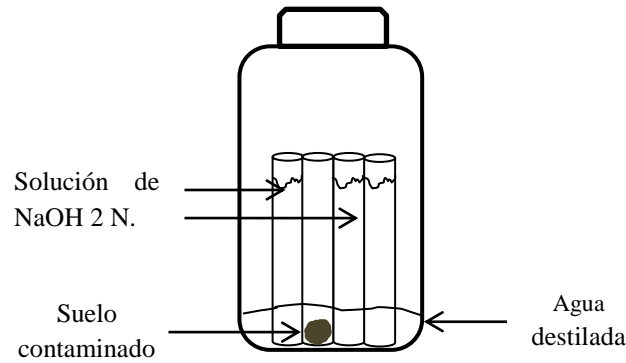
- Microcosmos: cuantificación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

Para la cuantificación de la respiración de los microorganismos del suelo se pesó 1 g de suelo en tubos de ensaye acondicionando previamente al suelo a un porcentaje de CRA de 50%. Los tubos fueron colocados dentro de frascos de vidrio de 200 mL de capacidad que contenían 5 mL de agua destilada, para mantenerlos en condiciones de humedad. Se utilizaron 21 mL de NaOH 2N, dentro de 3 tubos de ensaye, que se ubicaron en el frasco para la absorción del CO<sub>2</sub>, como se muestra en la Figura 19. Los frascos fueron tapados y guardados en cajas y mantenidos a temperatura ambiente.

Esto fue realizado para los tres tratamientos más un blanco con una duración de 7 semanas.

Se determinó la cantidad de CO<sub>2</sub> producido semanalmente mediante titulación del NaOH libre con HCl según las reacciones químicas que se muestran a continuación:





**Figura 19. Esquema experimental del monitoreo de CO<sub>2</sub> emitido por los microorganismos del suelo contaminado.**

Para el cálculo de la concentración de CO<sub>2</sub> emitido por los microorganismos se utilizó la siguiente ecuación (15):

$$\frac{\text{mg CO}_2}{\text{kg suelo}} = \frac{(Gm - Gb) * N * 0.022 * FD * 1000}{w} \quad 15$$

Donde:

*Gm*= Volumen de HCL utilizado en la muestra (mL).

*Gb*= Volumen de HCL utilizado en el blanco (mL).

*N*=Normalidad del HCL

*FD*=Factor de dilución

*w*= Peso del suelo (kg)

0.022=Peso equivalente del CO<sub>2</sub>.

1000=Factor para convertir a mg.

- Conteo en placa de unidades formadoras de colonias (CFU).

Para la cuantificación de microorganismos presentes en las biopila se siguió la técnica de conteo en placa de acuerdo a la NOM-092-SSA1-1994.

En realidad esta técnica no pretende poner en evidencia todos los microorganismos presentes. La variedad de especies y tipos diferenciables por sus necesidades nutricionales,

temperatura requerida para su crecimiento, oxígeno disponible, etc., hacen que el número de colonias contadas constituyan una estimación de la cifra realmente presente (NOM-092-SSA1-1994).

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o CFU presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que se desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una CFU (Camacho *et al.*, 2009).

- Procedimiento

Para el conteo en placa se pesaron 20 g de suelo contaminado de cada biopila y se adicionaron en 90 mL de solución salina (NaCl) estéril al 0.85%, contando esta como dilución  $10^{-1}$ , se tomó 1 mL de esta dilución y se realizaron diluciones sucesivas en tubos de 9 mL con solución salina estéril hasta una dilución de  $10^{-6}$ . Posteriormente de las diluciones de  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  se tomó 1 mL y se depositaron en cajas petri (por duplicado) a las cuales se les adicionó de 15 a 20 mL de agar soya tripticaseina. Se homogeneizaron y se dejaron incubar a temperatura ambiente.

Para el conteo en placa de las sustancias húmicas se realizó bajo el mismo procedimiento tomando 10 mL de muestra.

El aspecto de las placas puede ser observado en el anexo III, Figura 38.

- Tinción de Gram.

La técnica de la tinción Gram es un tipo de tinción empleado en microbiología que permite diferenciar rápida y fácilmente las bacterias según sus características morfológicas. El principio del método se basa en la tinción de todas las bacterias mediante cristal violeta o violeta de genciana y posteriormente decolorar los microorganismos con alcohol-acetona, lo que sucede con los Gram-, mientras que los Gram+ siguen manteniendo la coloración (Mora X., 2012).

Para realizar la tinción de Gram se hizo previamente una fijación de bacterias (frotis):

Se seleccionaron diferentes tipos de colonias de las cajas petri del conteo de CFU y una pequeña porción de cada una de estas se transfirieron a portaobjetos limpios y desengrasados, se homogeneizaron con un mL de agua destilada, se secaron al aire y se fijaron con ayuda de un mechero. Una vez fijadas en el portaobjetos se realizó la tinción: Se colocó una gota de cristal violeta sobre el frotis por 1 min y se enjuagó con agua, después se adicionó una gota de lugol por 1 min y se enjuagó nuevamente con agua. Posteriormente

se colocaron 2 gotas de etanol-acetona al 50% durante 30 s y se enjuagó con agua, por último se colocó una gota de safranina enjuagando nuevamente y dejando secar el portaobjetos. Una vez secos se adicionó una gota de aceite de inmersión al portaobjetos y se observaron en un microscopio óptico.

➤ Análisis de hidrocarburos: Extracción de hidrocarburos del suelo

Los hidrocarburos fueron cuantificados el día 1, 42, 84 y 112 de experimentación. Para ello, de cada biopila se pesaron 2g de muestra en un matraz erlenmeyer, se adicionaron 15 mL de  $\text{CCl}_4$  y se llevó a un equipo de agitación por ultrasonido marca: BRANSON, modelo: 2510 durante 30 min (Ruberto *et al.*, 2009). Posteriormente las muestras fueron filtradas tres veces, la primera en fibra de vidrio y algodón, y las dos siguientes por papel filtro en pipeta pasteur que contenía 2 mm de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para la eliminación de humedad (U.S. EPA, 1996). Una vez clarificadas las muestras y libres de partículas se realizaron diluciones con  $\text{CCl}_4$  (0.5:1.5) y se analizaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama.

Preparación de curva tipo de concentración de hidrocarburos totales del petróleo.

Para la curva tipo se pesaron 5 g de diesel en un matraz de 100 mL y se aforó con de  $\text{CCl}_4$ , esta solución contenía una concentración de 50,000 ppm. Posteriormente de esta solución se realizaron diluciones de 25,000; 10,000 y 5,000 ppm y se analizaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama. La construcción de la curva tipo puede verse en el anexo II Figura 37.

➤ Cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's)

Para conocer el contenido de hidrocarburo los extractos y las muestras de la curva tipo fueron analizadas en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama, marca PERKIN ELMER modelo: Clarus 500, equipado con un detector de ionización de llama (FID - GC). Se utilizó la columna de gases capilar Elite - 5HT (di 0.32 mm longitud 30 m). Se inyectaron 1.0  $\mu\text{l}$  a 270 °C y se llevó a cabo el siguiente programa del horno: 50 ° C durante 1 min, rampas de 15 °C/min a 280 °C, 7°C/min a 230 y 30°C/min a 380 ° C. Se utilizó nitrógeno como gas de arrastre con un flujo de 20 mL/min. El método y el análisis cromatógrafo se realizaron de acuerdo al catálogo publicado por Agilent Technologies (2013).



## CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo se muestran los resultados del proceso de biorremediación de suelos contaminados con diesel comercial mexicano y además se da la discusión de los diferentes parámetros de este proceso que influyen directamente en la recuperación de superficies afectadas por contaminantes del petróleo.

### 3.1 Caracterización de sustancias húmicas

Los valores de la caracterización de las sustancias húmicas empleadas en este proceso se muestran en la Tabla 6, de donde se observa que estas sustancias poseen una baja conductividad eléctrica, por lo que tienen baja concentración de sales. De acuerdo al resultado de pH estas sustancias se clasifican medianamente alcalinas, poseen un alto contenido de fósforo y nitrógeno, además el contenido de carbono orgánico es menor que el contenido en el suelo a tratar, en tanto que la cantidad de microorganismos alcanza valores cercanos a 2 millones por mL de SH.

**Tabla 6. Resultados obtenidos de la caracterización de las SH.**

Parámetro	Resultado
CE (ds/m)	0.59
pH	8.1
NT (mg/L))	107.33
P-PO <sub>4</sub> (g/L)	6.29
CO (mg / L)	382
CFU/ mL	1.8x10 <sup>6</sup>

### 3.2 Caracterización del suelo antes de ser contaminado.

Los resultados de la caracterización del suelo después de ser extraído se muestra en la Tabla 7.

El suelo se clasifica como franco-arenoso ya que el contenido de partículas mayores a 0.05 mm de diámetro son más abundantes (68.96%) en comparación con las partículas de limo (16.72%) y arcilla (14.32%). Este tipo de textura presenta una excelente aireación debido a que las partículas dominantes son de gran tamaño y facilitan la penetración del aire (Rodríguez y Rodríguez, 2002), ya que los espacios entre partículas son mayores y por lo tanto el porcentaje del volumen de poros también.

En base al resultado de pH (6.7) el suelo se clasifica como neutro (NOM-021,2000), con una baja conductividad eléctrica (0.4 dS/m) por lo que se clasifica como suelo no salino (INE, 2006).

La CIC es igual a 4.7 meq / 100 g de suelo contaminado, siendo un resultado razonable ya que esta propiedad se incrementa con el contenido de arcilla, ya que entre mayor sea el porcentaje de arcilla mayor será la relación área superficial a volumen (IMP, 2002). Los suelos que presentan este tipo de textura tienen una baja capacidad de retención de agua (Rodríguez y Rodríguez, 2002), sin embargo, la CRA que posee el suelo en estudio fue de 65.3%, el cual no se considera un valor bajo, esto debido al alto contenido de materia orgánica que tiene la propiedad de aumentar esta propiedad del suelo (Coyne, 2000).

El suelo se clasifica agronómicamente con un alto contenido de carbono y materia orgánica, lo que indica su gran capacidad potencial para proporcionar nutrimentos como nitrógeno y fósforo, que este proyecto presentaron altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ . Además, tal contenido de MO indica la capacidad relativa del suelo para el movimiento de agua y aireación así como la capacidad amortiguadora del suelo para resistir variaciones de pH o salinidad (Rodríguez y Rodríguez, 2002).

En cuanto a los resultados de los macro nutrientes N ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) y P ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), el suelo tuvo altas concentraciones, por lo que no fue necesario adicionar material para abastecer la demanda de los microorganismos por estos dos elementos.

El tamaño de la comunidad microbiana en suelos minerales está relacionado directamente con el contenido de materia orgánica, por lo que la densidad de microorganismos presentes en el suelo caracterizado es abundante ( $1.7 \times 10^5$ ).

Se realizó también un análisis inicial de concentración de HTP's siendo el resultado igual a 5442.3 mg/kg ss, que puede estar relacionado con las estructuras de compuestos que forman parte de la materia orgánica presente en el suelo antes de que este fuera contaminado. La misma microflora del suelo, puede sintetizar una gran variedad de hidrocarburos o de moléculas semejantes a hidrocarburos. Algunas especies de bacterias contienen tanto hidrocarburos alifáticos como materiales estructuralmente semejantes a hidrocarburos (Alexander, 1980).

La caracterización inicial del suelo permitió conocer y establecer las condiciones de los factores más importantes de la matriz donde se tendría lugar el proceso de eliminación de diesel, ya que la naturaleza del suelo y la presencia de microorganismos en una densidad adecuada son determinantes para lograr la degradación de los compuestos contaminantes (Gómez, 2009).

**Tabla 7. Caracterización del suelo antes de ser contaminado.**

Parámetro	Resultado
Textura	Franco – arenosa 68.96 % arena 14.32 % de arcilla 16.73 % limo
pH	6.7
CE (dS/m)	0.4
CIC meq/100 g suelo	4.7
CRA (%)	65.3
CO (g/kg ss)	86.1
MO (%)	14.81
NT (g/kg suelo)	18.6
C:N	4:1
HN <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg /kg ss)	96.4
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg /kg ss)	261.6
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup> mg /kg ss	67
CFU	1.7x10 <sup>5</sup>
TPH (mg / kg ss)	5442.3

Porcentajes dados en peso

### 3.3 Análisis de los parámetros físicos químicos y biológicos del proceso de biorremediación

- Potencial de hidrogeno (pH) y conductividad eléctrica (CE).

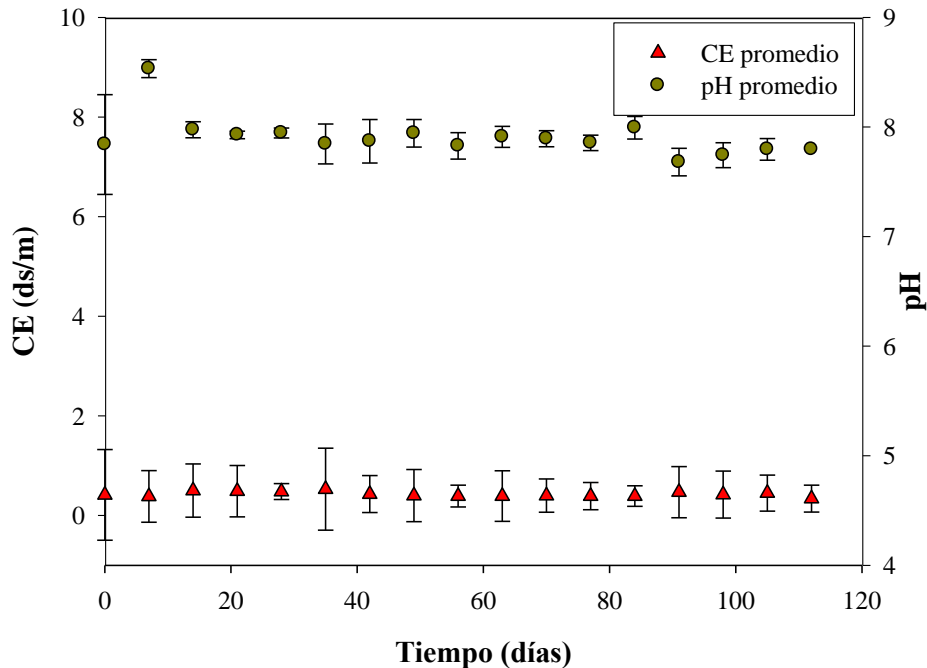
El comportamiento de pH y CE a lo largo del proceso se muestran en la Figura 20, cada punto corresponde al valor promedio entre las biopilas. La Tabla 8 muestra los resultados experimentales de pH de cada biopila. El suelo previo a su contaminación presentó un pH neutro (6.74) (Tabla 7), posterior a su contaminación el pH se incrementó en los tres tratamientos, pasando de neutro a ligeramente alcalino (NOM-021, 2000). Este aumento en los primeros días pudo ser causado por la contaminación del suelo con hidrocarburos del diesel, se ha establecido que cierto tipo de compuestos poseen un pH alto, elevando este parámetro en el suelo (Dueñas y Santos, 2006), además en el caso del tratamiento B1 que presentó un aumento mayor de pH que B2 y BC pudo deberse a la adición de las SH, ya que éstas SH poseían un valor de pH igual a 8.1 (Tabla 6), se ha encontrado en la bibliografía que la adición de nutrientes a tratamientos de remediación de suelos se traduce en un aumento de pH (Atagana *et al.*, 2003). Después del día 7 el suelo presenta un descenso de pH en las 3 biopilas, pudo ser debido a la descomposición de la materia

orgánica ya que produce  $\text{NH}_4^+$ , que es desprotonado a  $\text{NH}_3$  (como compuesto intermediario para la producción de  $\text{NO}_3^-$ , proceso conocido como nitrificación) liberando iones  $\text{H}^+$  causando un descenso de pH (Coyne, 2000). A medida que la nitrificación avanza durante un periodo prolongado, el suelo resulta cada vez más ácido, inhibiendo a su vez la nitrificación (Coyne, 2000). En términos generales, después del día 15 el pH no tuvo grandes variaciones y se mantuvo cercano a 8 en los tres casos, valor que se encuentra dentro de los valores óptimos que la bibliografía recomienda en trabajos de biorremediación de suelos (Gómez *et al.*, 2008 ; Mukut y Arundhuti, 2012), además se sabe que en medios neutros la producción de nitrógeno inorgánico es mayor (amonio y nitratos) (Alexander, 1980).

La CE que el suelo registró a lo largo del tratamiento se mantuvo en valores cercanos a 0.5 dS/m, por lo que se clasifica en suelo no salino (INE, 2006). Este parámetro no mostró grandes variaciones en las tres biopilas en todo el proceso (Figura 20) y los resultados indican que el suelo utilizado contenía baja concentraciones de sales. Si bien se plantea que la conductividad eléctrica no puede identificar un contaminante en particular, es una medición de gran utilidad para determinar la distribución y la concentración de contaminantes como sales en un suelo (Bermúdez, 2009). El valor de la CE de las sustancias húmicas es igual a 0.59 dS/m por lo que el valor de este parámetro no se vio afectado al ser adicionadas en la biopila 1.

**Tabla 8 Valores de pH de cada biopila determinados semanalmente.**

Día	B1	B2	BC
0	8.22	7.61	7.31
7	8.42	8.61	8.57
14	7.94	8.05	8.02
21	7.88	7.94	7.93
28	7.88	7.97	7.98
35	7.75	8.06	7.92
42	7.67	8.12	7.93
49	7.80	7.99	8.09
56	7.65	7.92	7.87
63	7.77	7.93	7.98
70	7.81	7.92	7.98
77	7.93	7.79	7.90
84	7.90	7.97	8.14
91	7.59	7.82	7.75
98	7.58	7.75	7.81
105	7.69	7.82	7.92
112	7.65	7.80	7.89



**Figura 20. Variación de pH y CE a lo largo del tratamiento. Las barras corresponden a la desviación estándar de los valores promedio de las 3 biopilas. ● pH promedio, ▲ CE promedio.**

#### ➤ Temperatura

Los resultados de las temperatura registradas de cada biopila se presentan en la Figura 21, en donde cada punto corresponde al promedio de las lecturas semanales tomadas *in situ* de los tres tratamiento. En esta misma figura se graficaron los valores promedio de la temperatura ambiente, los cuales fueron extraídos del análisis climatológico emitido por el servicio meteorológico nacional.

El comportamiento de la temperatura en las tres biopilas fue muy similar, lo que sugiere que probablemente los tratamientos estuvieron sujetos a variaciones estacionales creando una gran dependencia de la temperatura ambiente, esto quizás debido a las dimensiones de las biopilas.

En los primeros días se registraron las temperaturas más altas de todo el proceso en las tres biopilas ( $>30^{\circ}\text{C}$ ), coincidiendo con el valor más alto de la temperatura ambiente ( $22.8^{\circ}\text{C}$ ) de los meses en que fue realizada la descontaminación del suelo.

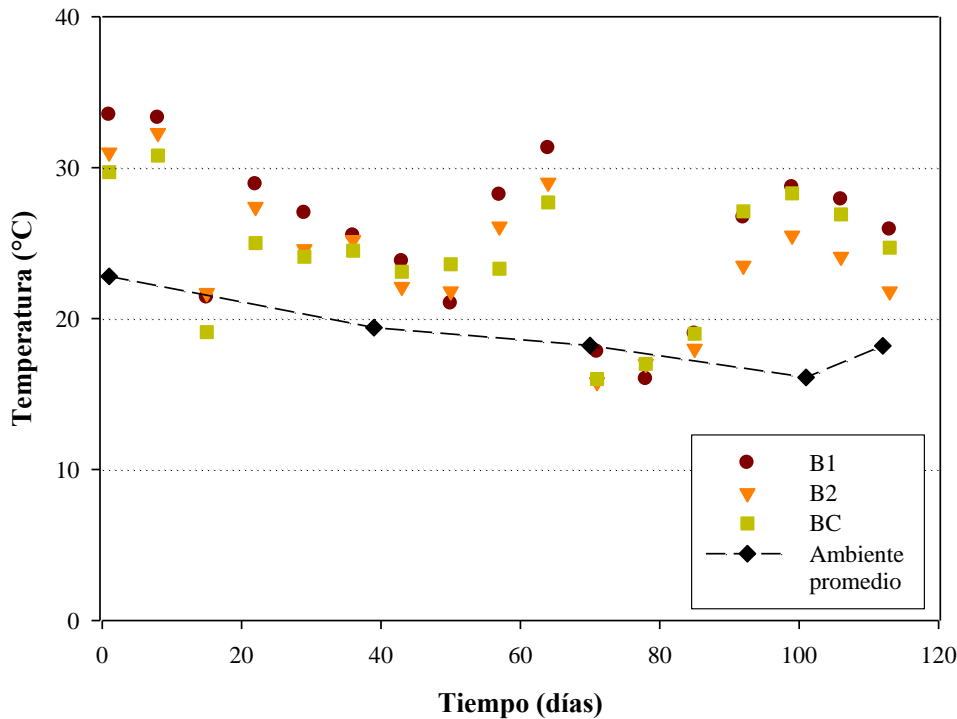
El tratamiento B1 presentó mayoritariamente temperaturas más altas en todo el proceso, alcanzando valores máximos ( $33^{\circ}\text{C}$ ) en los primeros días, que coincide con el periodo de mayor crecimiento de microorganismos en esta biopila (Figura 26). El aumento de

temperatura resulta en un incremento en la actividad de los microorganismos, de esta manera se acelera la tasa de degradación de hidrocarburos, presentando un mayor porcentaje total de biodegradación y por lo tanto una gran disminución en las concentraciones de TPH. Ferguson *et al.*, (2003) encontraron una correlación positiva entre la temperatura y la tasa de mineralización, ya que demostraron que las tasas más rápidas ocurrían en muestras que incubaron a temperaturas más altas.

Los tratamientos B2 y BC alcanzaron temperaturas máximas 1 semana después que B1, pero presentaron la misma tendencia de disminución cerca del día 15, sin embargo, en días posteriores tal parece que los microorganismos fueron capaces de adaptarse a las variaciones de temperatura ambiente y consumir el sustrato mostrando un aumento de temperatura que se mantuvo entre 20 y 30°C, alcanzando cerca del día 60 un máximo de temperatura que posteriormente descendería hasta por debajo de los 20°C, lo cual se relaciona con la disminución de la temperatura ambiente, ya que según el reporte climatológico del Sistema Meteorológico Nacional la temperatura mensual promedio en esos días fue de 16.1°C, siendo esta la temperatura más baja registrada en los meses en los que fue realizado el proceso de biorrecuperación, sin embargo, en días posteriores, la temperatura de las biopilas vuelve a aumentar manteniéndose entre 20 y 30°C hasta el final del proceso.

Aún con los gradientes de temperatura ambiente, los valores de temperatura de las biopilas estuvieron mayoritariamente por encima de la temperatura ambiente durante todo el proceso de remediación, esto indica que hubo una gran actividad metabólica de los microorganismos en el suelo, ya que el calor generado se producía en gran cantidad que era suficiente para mantener los tratamientos en intervalos de temperatura adecuados para el desarrollo de la flora bacteriana.

Los valores promedio de temperatura registrados (23.7°C para B1, y de 22.3°C para B2 y BC) estuvieron dentro del intervalo que diferentes autores señalan como óptimos para un proceso de remediación (Gómez *et al.*, 2008; Ercoli, 2008), estos resultados de temperaturas pueden ser comparados con los de (Vásquez *et al.*, 2010) quienes registraron temperaturas promedio entre 22-26°C en los meses de Diciembre – Enero utilizando la misma técnica de remediación para el tratamiento de aceites lubricantes en suelos. (Chambers *et al.*, 1991) indican que la mayoría de los microorganismos degradadores de hidrocarburos son mesófilicos, siendo más activos en intervalos de temperatura de 20-35 °C y una capacidad de crecimiento entre 15 y 45°C (Alexander, 1999) y por regla general, las poblaciones microbianas más extensas se encuentran a temperaturas mesofílicas o moderadas (Coyne, 2000).



**Figura 21. Variación de temperatura de las biopila a lo largo del tratamiento.● Biopila 1,▲ Biopila 2 , ■ Biopila control y + ambiente.**

➤ Carbono orgánico (CO<sub>2</sub>) y materia orgánica (MO).

Durante los 112 días de experimentación se determinó la concentración de carbono orgánico en el suelo a los 0, 1, 21, 42, 91 y 112 días. Los cambios de concentración fueron graficados respecto al tiempo experimental, que pueden ser observados en la Figura 22, en tanto que los porcentajes del contenido de M.O. al inicio y final del tratamiento se dan en la Tabla 9.

Después de ser contaminado con diesel, el suelo presentó un incremento en la cantidad de CO<sub>2</sub> y MO. Al día 21 de transcurrido el experimento, B1 disminuyó casi 19 g/kg ss de CO<sub>2</sub>, que de acuerdo a los cromatógramas de este tratamiento (Figura 31) podría ser resultado de la degradación en la concentración de hidrocarburos con números de carbono en su estructura que van de C<sub>10</sub> a C<sub>17</sub>, y de C<sub>24</sub> a C<sub>27</sub>. Para el día 42, el CO en B1 aumentó poco más de 15 g/kg ss, resultado de la probable descomposición de la materia orgánica intrínseca del suelo, así como de las sustancias húmicas adicionadas.

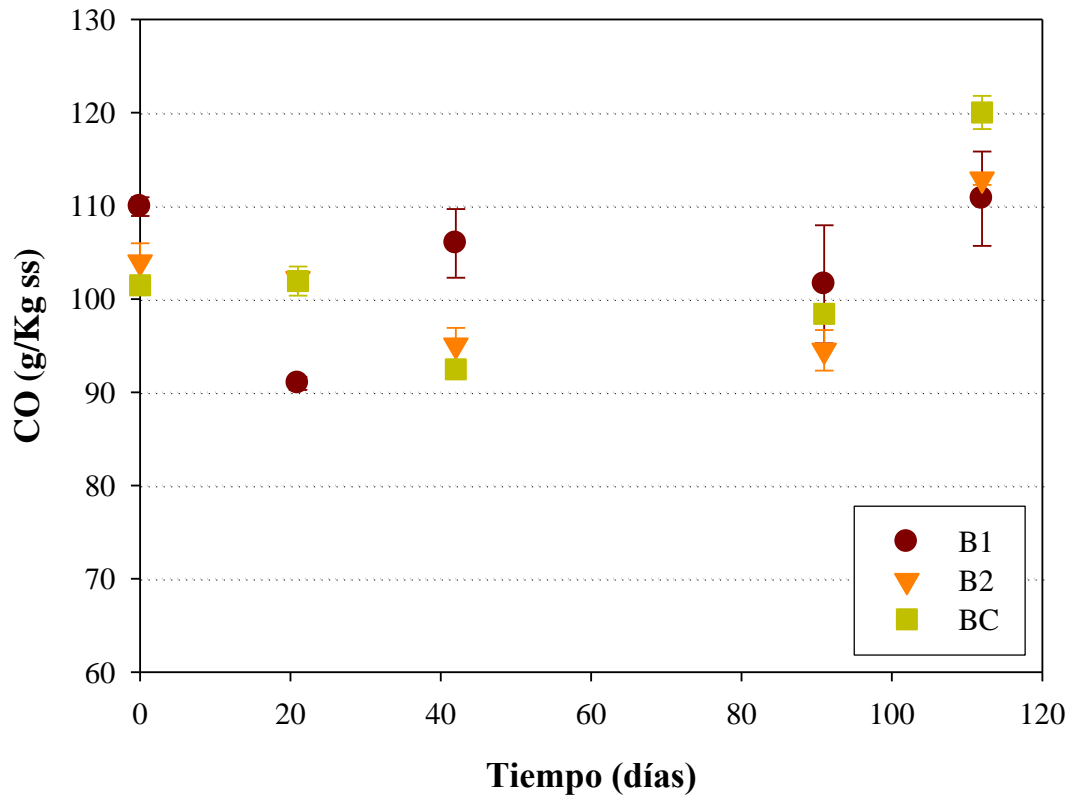
Al día 21, B2 descendió 1.78 g CO/ kg ss mientras que la concentración en BC era prácticamente igual. B2 muestra una tendencia de disminución en los primeros 42 días, que

se relaciona con la degradación de compuestos del diesel al igual que sucede con BC, esto puede ser observado en la (Figura 32 y Figura 33). En el día 92 de experimentación estas dos biopilas presentan un comportamiento similar, siendo prácticamente iguales en sus concentraciones (127.52 y 127.49 mg CO/kg ss respectivamente).

Al final del proceso (día 112), B1 contiene 110.7, B2 112.82 y BC 120.01 g CO/kg ss, resulta difícil relacionar directamente estas cantidades con las concentraciones finales de TPH, debido a que los resultados finales de CO alcanzadas por los tratamientos son más altas que al inicio de la remediación, sin embargo, al tratar de vincular los dos parámetros se deduce que a mayor concentración de CO<sub>2</sub> (Figura 22), mayor es la concentración de HTP's contenidos en el suelo al final de la biorremediación (Figura 28). Además este aumento de CO<sub>2</sub> puede ser debido a que algunos compuestos orgánicos son relativamente resistentes al ataque enzimático; los hay que pueden incluso ser recalcitrantes, es decir, no aptos para la degradación enzimática. (Bartha y Atlas, 2002), además el humus del suelo es resistente a la degradación, ya que en su estructura contiene partículas, formando a veces estructuras inmóviles, y en ocasiones hidrofóbicas. El humus tiene un carácter poliaromático con estructura de enlaces cruzados, aleatorios, variados y desordenados debido a las reacciones químicas de condensación. Este material puede unirse y desactivar las enzimas atacantes, continuando este material en el suelo durante mucho tiempo (Coyne, 2000) y por lo tanto el contenido de MO y CO<sub>2</sub> también. La velocidad de descomposición también está regida por el tamaño de las partículas orgánicas sujetas a ataque. Como regla general, los materiales de partículas pequeñas son degradados más fácilmente que los de partículas más grandes.

El porcentaje de materia orgánica que el suelo presentó antes de ser contaminado (8.61%) es considerado como un valor muy alto según la clasificación agronómica (Rodríguez y Rodríguez, 2002; IMP, 2002 ; NOM-021, 2000). En el día 0 el porcentaje de MO en el suelo aumentó 2.3% en B1, 1.78% B2 y 1.53% en BC, esto es debido a las grandes cantidades de diesel adicionadas al suelo, así como de sustancias húmicas. Este comportamiento ha sido observado por (Martínez y López, 2001; Gómez, *et al.*, 2009) donde comprobaron que al adicionar diesel al suelo el contenido de materia orgánica era mayor. Al final del proceso la Tabla 9 muestra un porcentaje mayor de MO que al inicio, esto como probable resultado de la degradación de materiales orgánicos más grandes (como la lignina) que muchas veces desactivan las enzimas atacantes de los microorganismos, lo que provoca la recalcitrancia de estos materiales en el suelo, además es importante señalar que la presencia de arena, limo, pueden influenciar la descomposición. Estas estructuras pueden servir como barreras mecánicas para el movimiento microbiano o las partículas orgánicas nutritivas o prevenir el contacto entre las células potencialmente activas o sus enzimas, con un sustrato depositado en un micrositio escudado por partículas que no contienen carbono orgánico (Alexander, 1980) pudiendo ser liberadas en un determinado tiempo.





**Figura 22. Variación de carbono orgánico a lo largo del tratamiento. Las barras indican la desviación estándar entre las 3 repeticiones de cada punto. ● Biopila 1, ▲ Biopila 2 y ■ Biopila control.**

**Tabla 9. Porcentaje de MO del suelo al inicio (día 0) y al final de la experimentación (día 112).**

Día	% peso de MO		
	B1	B2	BC
0	18.90	17.88	17.45
112	19.05	19.41	20.64

➤ Nitrógeno total (NT).

De acuerdo con la clasificación de la (NOM-021, 2000), el contenido de nitrógeno total al inicio de la biorremediación del suelo fue alto (Tabla 10). Como se observa en la tabla, al final de la experimentación hay una gran disminución de nitrógeno en los 3 casos, cerca de

9 g NT / kg suelo en cada biopila, lo que indica que parte del NT contenido en la MO resultó mineralizada por los microorganismos presentes en esta matriz.

La concentración de NT en B1 se mantuvo prácticamente igual al adicionar las sustancias húmicas, esto quizás al bajo contenido de NT (Tabla 6) en comparación con el que poseía el suelo.

Las concentraciones de nitrógeno presentes en el suelo con contenido de MO derivada de composta madura fueron lo suficientemente altas para satisfacer la demanda de este nutriente en los tratamientos en donde no se adicionaron SH, ya que al final del proceso el nitrógeno sigue siendo suficiente para satisfacer la necesidad nutrimental de este elemento requerida por los microorganismos. La disminución de concentración por la asimilación del nitrógeno realizada por la flora bacteriana se corrobora con las concentraciones de amonio y nitrato a lo largo del proceso, que serán explicadas más adelante.

**Tabla 10. Concentración de NT al inicio y al final del tratamiento.**

g NT/ Kg suelo			
Día	B1	B3	BC
0	18.6	18.5	16.6
112	9.0	8.5	8.6

➤ Relación Carbono : Nitrógeno (C:N)

Los resultados de las relaciones C:N antes y después del proceso de descontaminación (Tabla 11) indican una relación baja de estos dos elementos, lo que se traduce en una alta concentración de nitrógeno disponible para los microorganismos.

Cuando se tienen relaciones de C:N elevadas, se produce la inmovilización del nitrógeno, ya que no existe suficiente disponibilidad de este macro nutriente en la sustancia en cuestión que permita convertir todo el carbono en biomasa, en cambio cuando la relación es poco elevada se produce la mineralización neta. De esta manera, la cantidad de nitrógeno en el sustrato es suficiente para que los microorganismos conviertan el carbono en biomasa, acumulándose el excedente en el suelo (Coyne, 2000).

Relaciones óptimas de C:N cercanas a 100:10 son recomendadas para procesos de degradación exitosos (Gómez *et al.*, 2008 ; Margesin y Schinner, 2001 ; Maletić *et al.*, 2013). En cambio, cuando se adiciona material orgánico con una relación C:N entre 20 y 30 generalmente hay un desequilibrio y el balance tiende a inmovilizar el N (Álvarez D. *et al.*, 2006, Coyne, 2000). En este trabajo las relaciones C:N de los tratamiento al inicio de la

biorrecuperación estuvieron por debajo de la relación óptima marcada en la literatura, sin embargo los niveles de C:N de este proyecto mostraron ser suficientes para que los microorganismos asimilaran el carbono y nitrógeno de forma eficiente y de esta manera disminuir la concentración de los contaminantes.

**Tabla 11. Relación C:N al inicio y al final del proceso de biorremediación.**

Día	Relación C:N		
	Biopila 1	Biopila 2	Biopila C
0	5:1	6:1	6:1
112	12:1	13:1	14:1

➤ Nitratos y amonio.

El seguimiento de la variación de nitrógeno amoniacal y de nitratos se realizó para conocer indirectamente la transformación de los compuestos de carbono. Como ya se mencionó anteriormente, si la concentración de nitrógeno es mayor que la de carbono entonces los microorganismos tienen suficiente fuente de nitrógeno para satisfacer la demanda requerida para su crecimiento, y si la concentración de nitrógeno es menor que la de carbono entonces este no podrá ser convertido a biomasa y a otros compuestos, debido a que los microorganismos no tienen el nitrógeno suficiente para hacerlo. Por lo tanto se esperaba que en los resultados el carbono fuera convertido a biomasa y otros compuestos, disminuyendo la concentración de nitrógeno.

La concentración de nitratos fue mayoritariamente más alta que la de amonio en todo el proceso de biorremediación del suelo, lo que comprueba que efectivamente se trató de un proceso aerobio, con una buena aireación manual, ya que el suministro de oxígeno fue el adecuado para provocar la oxidación de amonio hasta nitratos y por esta razón la concentración de nitratos predominó respecto a la de amonio.

Es importante señalar que tanto la amonificación como la nitrificación están en función de varios parámetros como el pH y humedad del suelo, clima y temperatura del medio ambiente, siendo estos factores entre otros los que determinan la velocidad de la tasa de producción de amonio y nitratos.

El comportamiento de la dinámica de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  fue similar en los 3 casos (Figura 23, Figura 24 y Figura 25). La disminución de  $\text{NH}_4^+$  en B1 al inicio de la experimentación no fue tan significativo probablemente a la adición de sustancias húmicas que pudieron haber contribuido al incremento de  $\text{NH}_4^+$ , sin embargo en el resto del proceso, B1 no mostró un efecto significativo en su comportamiento respecto a B2 y BC.

Durante casi 60 días la concentración de  $\text{NH}_4^+$  se mantuvo por debajo de 50 mg/kg ss, siendo mayor la concentración en el caso de  $\text{NO}_3^-$ , valores similares reportados por (Rivera y Dendooven, 2004).

Existen varias razones por las cuales la concentración de  $\text{NH}_4^+$  pudo ser menor. La primera es que los iones amonio pueden ser utilizados por muchos microorganismos, que los incorporan a sus aminoácidos y a otros compuestos bioquímicos que contienen nitrógeno, para posteriormente incorporarse a las proteínas, las cuales son fundamentales en su crecimiento (Bartha y Atlas, 2002). La segunda razón es que el ion  $\text{NH}_4^+$  es oxidado a iones nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y estos a su vez son transformados a iones  $\text{NO}_3^-$ . Además en las gráficas de amonio se observa una gran variación debido a que el amonio es oxidado a nitratos, siendo entonces dependiente de la cantidad de oxígeno presente en el suelo.

La gran concentración de nitratos pudo ser debido también a la influencia de que el suelo presentaba un pH cercano a 8, ya que en ambientes que tienen una reacción casi neutra, el nitrato se produce a mayor velocidad (Alexander, 1980). La baja capacidad de intercambio catiónico del suelo y de conductividad eléctrica pudo haber influido en el aumento de los nitratos, ya que por lo general, en suelos alcalinos con un alto contenido de sales, la producción de nitrato se retarda, ya que los nitrificadores no tienen mucha tolerancia hacia la salinidad (Alexander, 1980)

Biopila 1

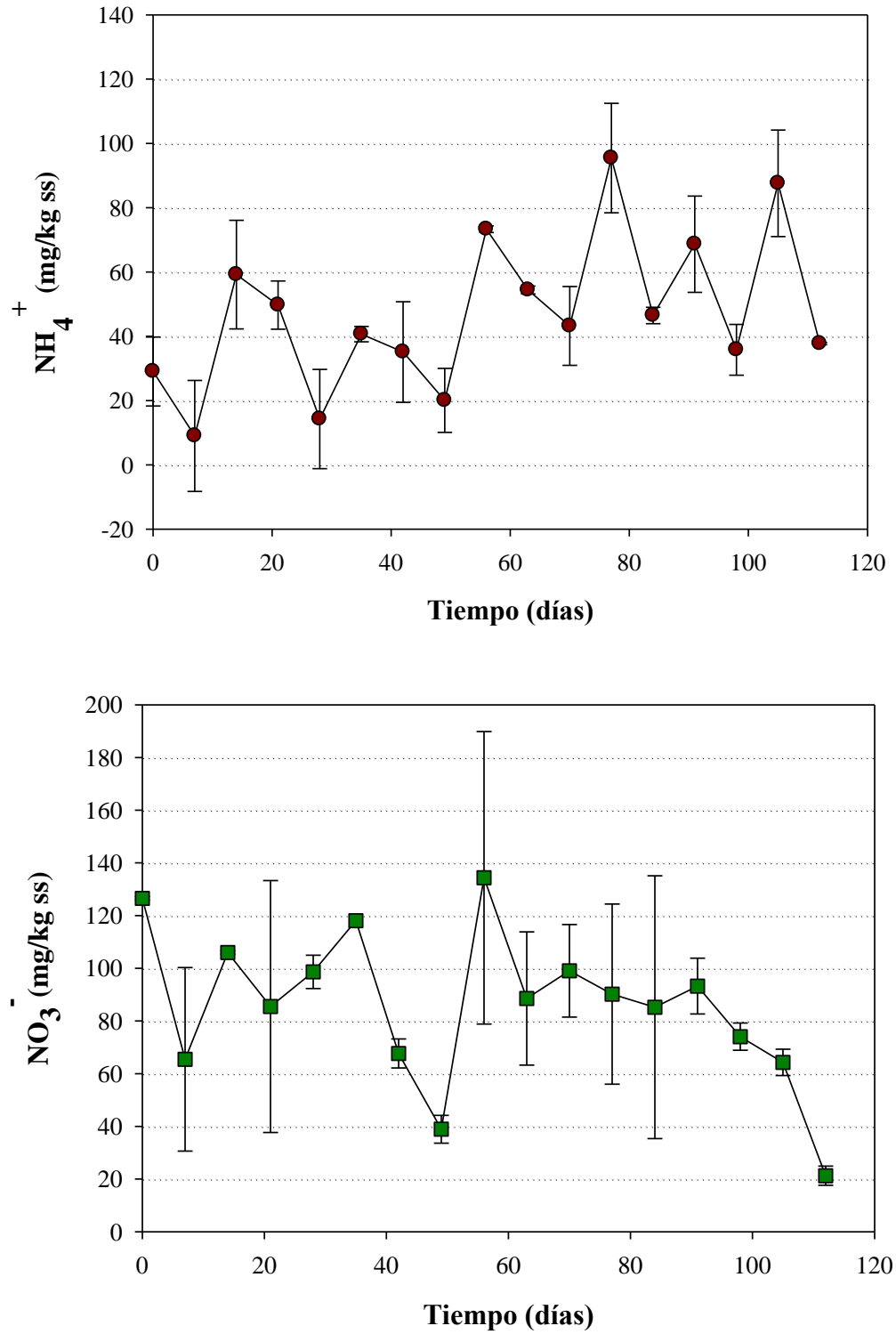


Figura 23 Perfil de concentración de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  respecto al tiempo de B1.

Biopila 2

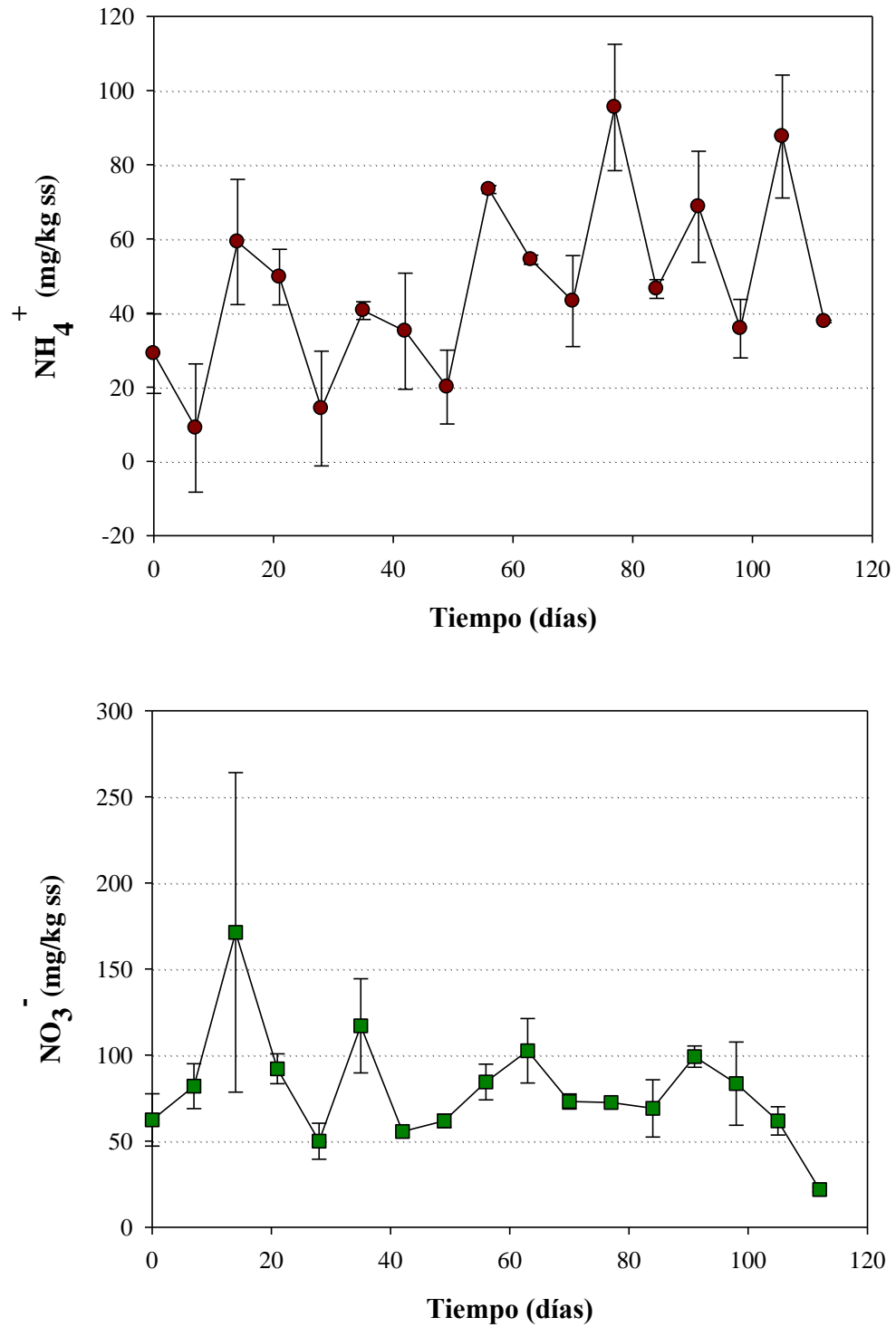


Figura 24 Perfil de concentración de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  respecto al tiempo de B2.

Biopila control

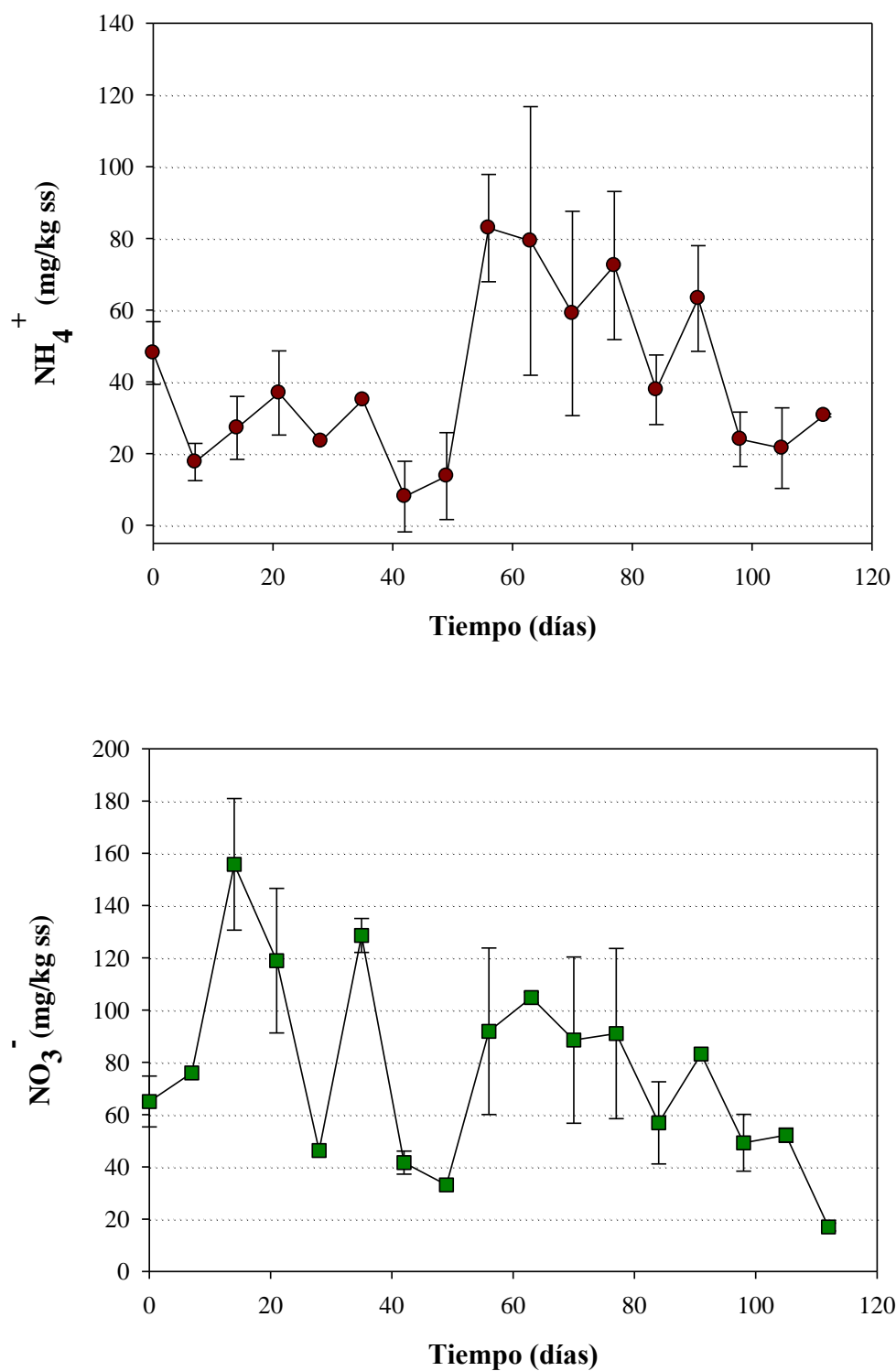


Figura 25. Perfil de concentración de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  respecto al tiempo de BC.

➤ Fosforo

El fosforo fue analizado antes y después de la contaminación, así como al final del tratamiento, aunque el fosforo tiene una baja movilidad y es el que utilizan en menor concentración los microorganismos, las variaciones indicarían que los microorganismos del suelo están siendo muy afectados por el medio. Los valores de la Tabla 12 señalan una disminución en el contenido de este nutriente, lo cual indica una utilización por parte de los microorganismos del suelo, este es un buen resultado ya que después del nitrógeno el fosforo es el segundo nutriente inorgánico requerido tanto por los microorganismos como por las plantas; su principal función radica en algunos pasos esenciales en la acumulación y liberación de energía durante el metabolismo microbiano (Alexander M., 1980), sin embargo, es fósforo soluble es un nutriente limitado para la producción de biomasa en un ecosistema natural (Hameeda *et al.*, 2006).

Existen distintos mecanismos de solubilización de fosforo, asociados a materia orgánica mediado por microorganismos, el principal que realizan los microorganismos para solubilizar el fósforo es mediante producción de ácidos orgánicos, que actúan sobre compuestos insolubles de fosfato inorgánico. Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular se producen en el suelo como resultado de la descomposición de la materia orgánica (Bobadilla y Rincón, 2008) razón por la cual la concentración de fosforo en las sustancias húmicas fue alta y por la que la concentración al final del proceso en la B1 fue mucho menor en comparación con las otras dos biopilas.

**Tabla 12. Concentración de  $PO_4^{-3}$  al inicio y final de la remediación.**

Día	mg $PO_4^{-3}$ / Kg suelo		
	B1	B2	BC
0	71	67	68
112	27	42	44

### 3.3 Crecimiento de microorganismos.

El crecimiento de los microorganismos presentes en las biopilas se muestra en la Figura 26

Las unidades formadoras de colonias (CFU) del suelo de cada biopila fueron cuantificadas al día: 0, 28, 62 y 112.

El aspecto físico de las placas utilizadas para el recuento puede verse en anexo III, Figura 38, donde al inicio se puede observar que no hay gran variedad de colonias en comparación del conteo realizado en el día 28, 62 y 112. La aparición de colonias con diferentes características morfológicas se asocia a una adaptación a los diferentes sustratos presentes



en el suelo (hidrocarburos del diesel y compuestos de la materia orgánica) por parte de los microorganismos y por lo tanto al saneamiento del suelo.

En el día 0 hay incrementos en el recuento de microorganismos en todas las biopilas, siendo mucho mayor en el tratamiento B1, que prácticamente no mostró una etapa de adaptación de los microorganismos hacia el sustrato, en cambio, B2 y BC mostraron una fase de aclimatación al sustrato más lenta de (aproximadamente 28 días) (Figura 26).

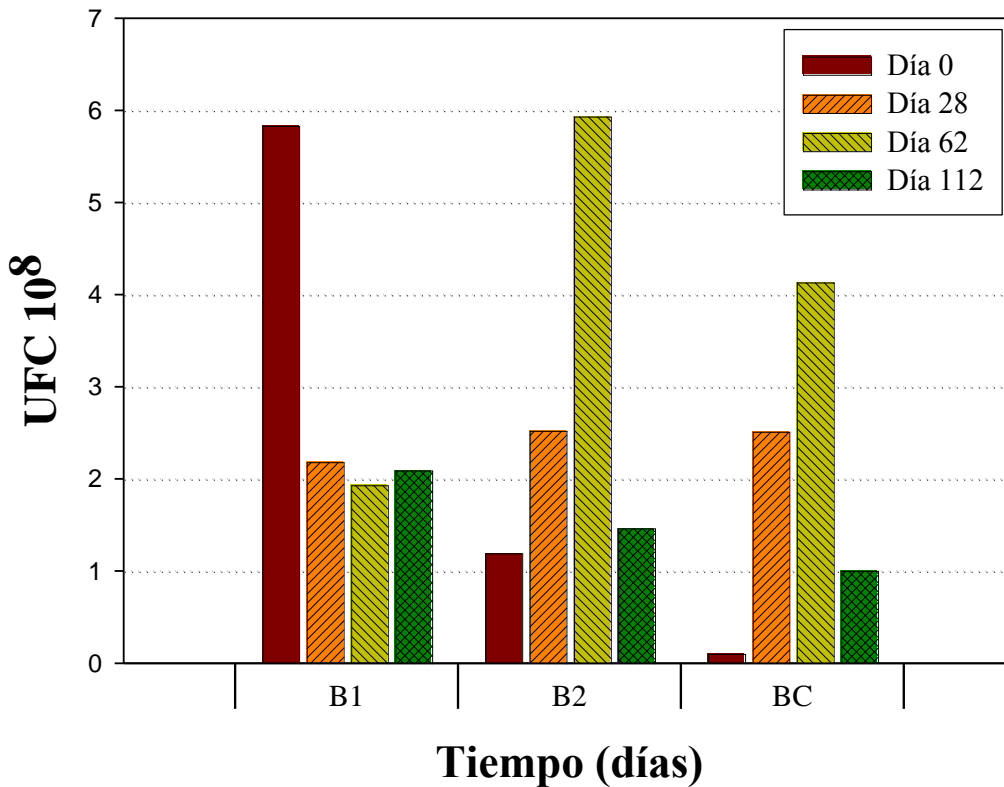
El aumento de microorganismos al inicio del bioproceso resulta ser mucho mayor en B1, probablemente debido a la adición de sustancias húmicas, las cuales contenían un valor de  $1.8 \times 10^6$  CFU/mL, además de la inoculación del consorcio de bacterias tipo *Pseudomonas sp.*, sin embargo, en el día 28 hubo una disminución en el conteo de CFU, que puede asociarse con diferentes sucesos como por ejemplo al agotamiento del material orgánico más fácilmente asimilable como son los hidrocarburos de menor número de carbono.

En días subsecuentes B1 prácticamente no presenta grandes variaciones de densidad de microorganismos, se cree que las colonias se adaptaron al sustrato utilizándolo como fuente de carbono para su mantenimiento aunque no precisamente para su crecimiento, sin embargo, los porcentajes de remoción de contaminantes fueron mayores (Figura 29).

En los tratamientos B2 y BC, los microorganismos presentaron un comportamiento similar de crecimiento con etapas de adaptación, crecimiento y muerte al final del proceso. El conteo de microorganismos al día 62 fue mayor en la biopila 2, lo que indica que el aporte de microorganismos del consorcio inoculado en esta biopila tuvo un efecto retardado en comparación con el de las SH, pero significativo a mitad del proceso.

En cuanto a la biopila control esta presentó un máximo crecimiento al día 63, lo que indica que los microorganismos presentes en el suelo utilizado, fueron capaces de degradar los compuestos contaminantes utilizándolos como fuentes de carbono y energía, este comportamiento se corrobora con la cuantificación de  $\text{CO}_2$  realizada en microcosmos, que será explicado más adelante. (Bento et al., 2005) señalan que el control de los microorganismos indígenas dentro de un sitio contaminado es el método más sencillo para la limpieza de hidrocarburos.

A largo del tratamiento se encontraron valores del orden de  $10^8$ , 3 órdenes de magnitud por arriba del conteo inicial de microorganismos del suelo antes de ser contaminado. Los valores alcanzados en este parámetro estuvieron por encima de las cuentas microbianas típicas reportadas de suelos contaminados con hidrocarburos (Velasco, 2004).



**Figura 26. Crecimiento de los microorganismos del suelo de cada biopila a diferentes tiempos.**

➤ Clasificación de bacterias según tinción de Gram.

En base a los resultados obtenidos de las características morfológicas macroscópicas y a la tinción de Gram (Tabla 13), la mayor parte de los microorganismos contenidos en los tratamientos fueron bacilos tipo Gram (-), las cuales han sido reportadas como las más eficientes en la biorremediación (Dueñas y Santos, 2006).

En el anexo III Figura 40 y Figura 41, se pueden observar algunas imágenes de las placas sembradas con los microorganismos de las tres biopilas, vistos en un microscopio óptico.

**Tabla 13. Características morfológicas macroscópicas de las CFU presentes al inicio y final del proceso de descontaminación del suelo, así como del consorcio utilizado.**

Características morfológicas macroscópicas					
Consortio <i>Pseudomonas</i>					
	Forma	Borde	Superficie	Consistencia	Color
<b>Bacilos G(-)</b>	Irregular	Sierra	Plana	Rugosa	Blanco
<b>Día 1</b>					
<b>Bacilos G(-)</b>	Circular	Liso	Convexa	Lisa	Amarillo
<b>Día 112</b>					
<b>Bacilos G(-)</b>	Irregular	Liso	Elevada	Rugoso	Beige
<b>Bacilos G(-)</b>	Circular	Liso	Convexa	Lisa	Café
<b>Bacilos G(-)</b>	Irregular	Sierra	Plana	Grumosa	Beige
<b>Bacilos G(-)</b>	Circular	Liso	Convexa	Grumosa	Blanco
<b>Cocos G(-)</b>	Circular	Liso	Papilar	Lisa	Amarillo
<b>Bacilos G(-)</b>	Irregular	Sierra	Elevada	Rugoso	Beige
<b>Bacilos G(-)</b>	Circular	Liso	Plana	Lisa	Beige-transparente
<b>Bacilos G(-)</b>	Circular	Liso	Plana	Grumosa	Café oscuro
<b>Bacilos G(-)</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Beige transparente
<b>Bacilos G(-)</b>	Circular	Liso	Convexa	Lisa	Blanca
<b>Cocos G(-)</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Grumosa	Amarillo transparente
<b>Bacilos G(-)</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Lisa	Amarillo transparente
<b>Cocos G(-)</b>	Irregular	Sierra	Elevada	Grumosa	Beige
<b>Bacilos G(-)</b>	Circular	Liso	Papilar	Lisa	Anaranjado
<b>Cocos G(-) y Bacilos G(-)</b>	Irregular	Ondulado	Convexa	Grumosa	Beige
<b>Bacilos G(-)</b>	Circular	Sierra	Lisa	Filamentosa	Blanca
<b>Bacilos G(-)</b>	Circular	Sierra	Convexa	Grumosa	Blanca
<b>Bacilos G(-)</b>	Irregular	Ondulado	Plana	Grumosa	Amarillo claro

<b>G(-)</b> <b>Bacilos</b>	Irregular	Ondulado	Elevada	Grumosa	Blanco
<b>G(+)</b> <b>Bacilos</b>	Irregular	Liso	Elevada	Grumosa	Beige
<b>G(+)</b> <b>Bacilos</b>	Irregular	Sierra	Plana	Rugoso	Blanco
<b>G(+)</b>					

### 3.4 Dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) emitido por los microorganismos.

Los resultados de la cuantificación de CO<sub>2</sub> emitido por los microorganismos en microcosmos se muestran en la (Figura 27). La Tabla 14 resume las tasas de velocidad de producción de CO<sub>2</sub> durante casi 50 días.

El modelo matemático utilizado para la descripción del consumo de O<sub>2</sub> o la tasa respiratoria, en los procesos de biodegradación son las regresiones lineales (Ahumada y Gómez, 2009). Con las curvas de la Figura 27 se determinaron las tasas de producción de CO<sub>2</sub>. Con los datos del día 0 al día 30 (fase exponencial) se realizó una regresión lineal para cada una de las curvas. La pendiente determinada corresponde a la tasa de producción de CO<sub>2</sub> en mg/kg suelo /día (Tabla 14).

El comportamiento de las curvas en cuanto a producción de CO<sub>2</sub> es muy similar en los tres casos experimentales, siendo prácticamente iguales en B1 y BC, esto se ve reflejado en las constantes cinéticas determinadas, siendo de 366.8 para B1 y 366.7 mg/kg suelo /día, para BC. Del día 0 al 30 la Figura 27 muestra una etapa de máxima emisión de CO<sub>2</sub>, después del día 30 estas dos biopilas no presentan una variación significativa en la emisión de CO<sub>2</sub>, por lo que puede considerarse como etapa de estabilidad, esto podría ser probablemente vinculado al agotamiento de nutrientes disponibles o la producción de metabolitos tóxicos (Abdulsalam *et al.*, 2011). La B2 tiene una tasa de producción de CO<sub>2</sub> menor (305 mg/kg suelo /día), el comportamiento de emisión de CO<sub>2</sub> en esta biopila es creciente aunque al final del proceso disminuye. La diferencia entre las 3 biopilas no es significativa, por lo que en general se puede decir que el nivel de actividad microbiana fue similar en los tres casos, además se comprueba que los compuestos de diesel adicionados al suelo no resultaron ser tóxicos para los microorganismos, sino más bien como fuente de carbono y energía para su crecimiento.

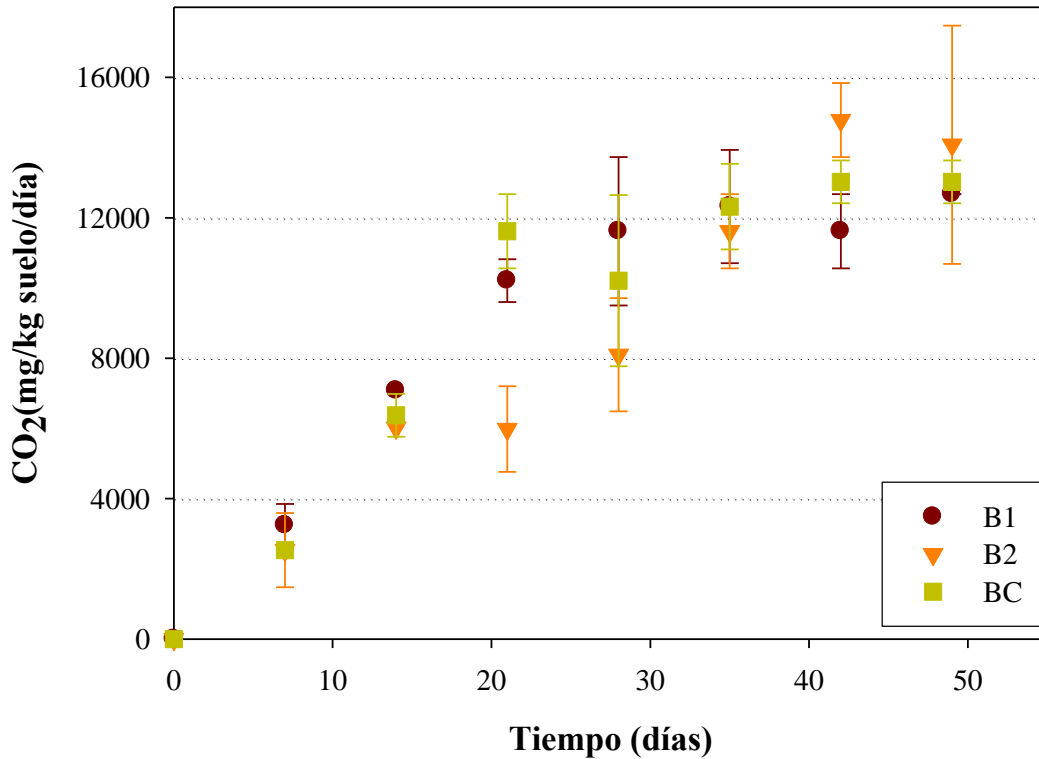


Figura 27. Producción de CO<sub>2</sub> acumulado en microcosmos con diferentes sustancias adicionadas. ● Biopila 1, ▲ Biopila 2 y ■ Biopila control. Las barras representan la desviación estándar entre 4 réplicas.

Tabla 14. Producción de CO<sub>2</sub> emitido por los microorganismos del suelo.

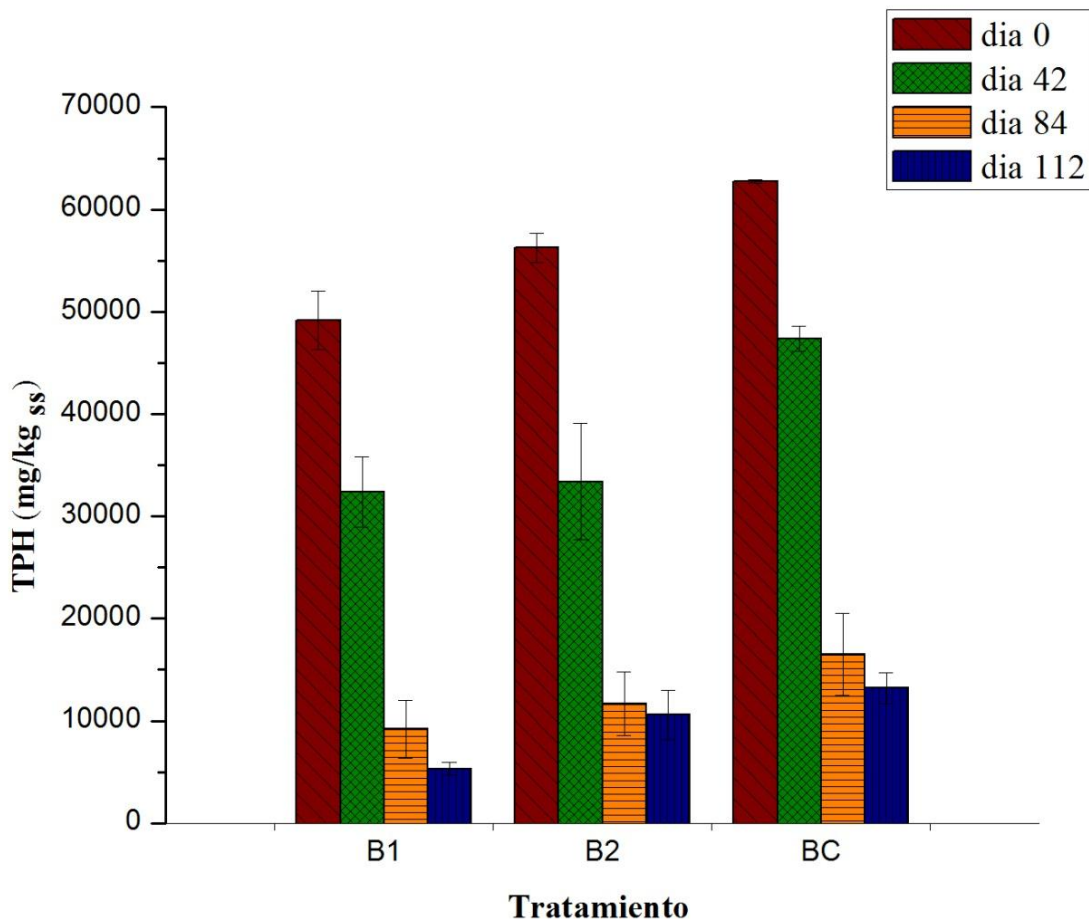
Biopila	Tasa de producción de CO <sub>2</sub> (mg/kg suelo /día)	DE	r <sup>2</sup>
1	366.8	44.1	0.9315
2	305.0	32.6	0.9452
C	366.7	63.1	0.8674

DE Desviación estándar

### 3.5 Biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo.

En el tratamiento B1 se logró reducir la concentración de HTP's con una mayor eficiencia (88.22%), seguida del tratamiento B2 (79.25%) y por último la biopila BC (78.97%) (Figura 28).

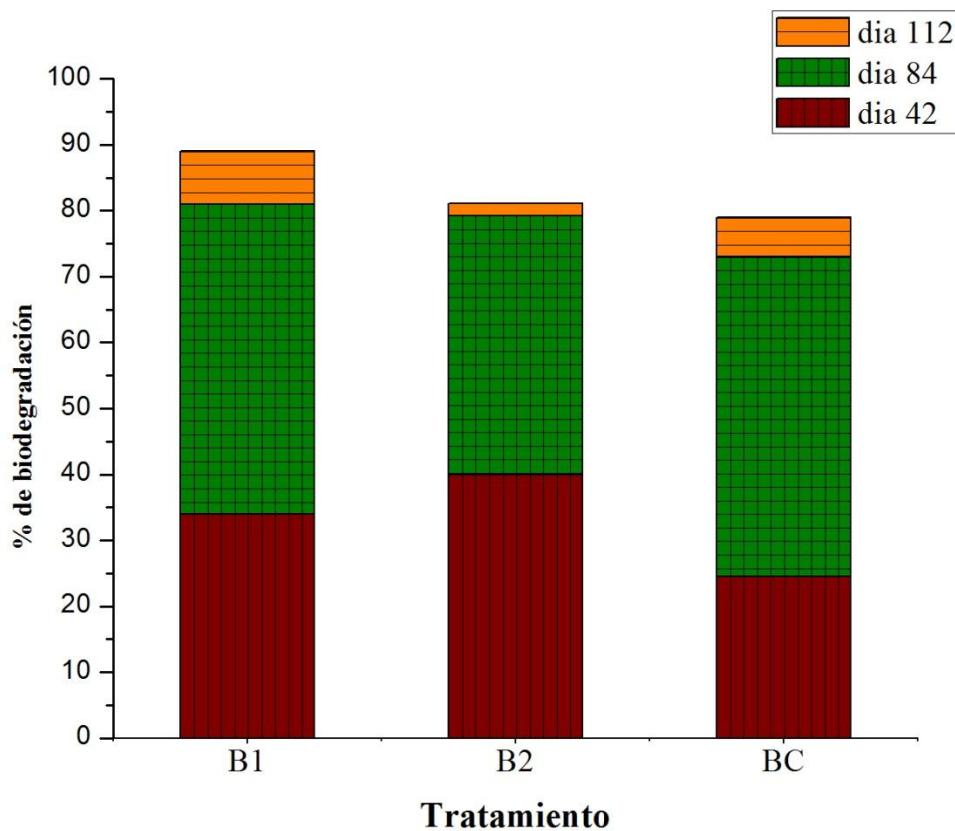
El tratamiento B2 con inoculación del consorcio de *Pseudomonas* sp no mostró una degradación significativa de hidrocarburos respecto al tratamiento BC. Este hecho, va en concordancia con otros estudios, donde la inoculación de poblaciones microbianas exógenas en suelos contaminados, no causaron una mayor biodegradación de los hidrocarburos que la propia población indígena adecuadamente bioestimulada (Viñas, 2005; Pérez N., Saval S.). La población microbiana natural, especialmente en enclaves con contaminación crónica de hidrocarburos, suele ser capaz de degradar los hidrocarburos, si se optimizan las condiciones ambientales y los hidrocarburos son biodisponibles o de fácil asimilación (Alexander, 1999).



**Figura 28. Variación de la concentración de HTP's de cada biopila, respecto al tiempo de biorremediación. Las barras corresponden a la desviación estándar de tres muestras analizadas.**

Se compararon los resultados obtenidos en este proyecto con el de Rojo (2010), en donde se aplicó la misma técnica de remediación con condiciones similares de nutrientes e

inoculación de un consorcio comercial. Rojo en 2010, alcanzó porcentajes de degradación de TPH de fracción media de 85% en 84 días, pasando de 6119.4 mg/kg ss a 909.2 mg/kg ss. En este proyecto se degradaron 16,784.9 mg/kg ss en 42 días. Se debe recalcar que el tipo de suelo de utilizado en este proyecto contenía materia orgánica proveniente de composta madura, por lo que se comprueba la aceleración del proceso con enmiendas de este tipo de material. Roldán *et al.*, (2005) reporta eficiencias de 69% de degradación de HTP's utilizando el compostaje de 23 kg de suelo contaminado con adición de granos de café, mientras que cuando trató concentraciones de 50,000 ppm a mayor escala obtuvo eficiencias de 49%. Pérez y Saval , reportan eficiencias de 23.45% de remoción de diesel en suelo en 150 días con adición de composta.



**Figura 29. Porcentajes de biodegradación alcanzados a los 42, 84 y 112 días de cada tratamiento.**

### 3.6 Cinética de biodegradación.

Es difícil predecir el comportamiento cinético de una mezcla compleja de contaminantes en el suelo, sin embargo informes anteriores indican que la degradación de compuestos derivados del petróleo contenidos en suelo puede ser descrito por una reacción de primer orden (Xu, 2012; Maletić *et al.*, 2013; Yudono *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2011; Namkoong *et al.*, 2002), que se adapta al modelo biológico propuesto por Michaelis-Menten, considerando la concentración de la enzima constante (Cardona e Iturbe, 2003).

De acuerdo con el modelo cinético de la ecuación 2, se graficaron los datos de  $\ln$  de la relación de concentraciones de TPH's (concentración inicial entre concentración a diferentes tiempos) vs tiempo y por medio de una regresión lineal se determinaron las constantes cinéticas para cada biopila, los resultados se muestran en la Tabla 15.

La biodegradación de TPH observada en las biopilas durante 4 meses siguió una cinética de primer orden, en donde la mayor tasa de degradación corresponde a B1 ( $k=0.020 \text{ d}^{-1}$ ) siendo 20% más rápida que la de los tratamientos B2 y BC que presentaron valores de  $k=0.016$  y  $0.015 \text{ d}^{-1}$  respectivamente (Tabla 15). El tratamiento B1 con adición de nutrientes presentó una biodegradación más rápida, que puede atribuirse al efecto sinérgico entre los microorganismos de las sustancias húmicas y los microorganismos autóctonos. Además con las constantes cinéticas de los tratamientos B2 y BC nos sugieren la gran aportación de los microorganismos autóctonos ya que presentan tasas de degradación muy similares entre ellas.

**Tabla 15 Resumen de tasas de utilización de sustrato de los tres tratamientos.**

Biopila	$k \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$r^2$
B1	0.020	0.94
B2	0.016	0.93
BC	0.015	0.91

### 3.7 Cromatogramas del suelo

Los cromatogramas del suelo antes de ser contaminado, y al día 0, 42 y 112 se muestran en la Figura 31, Figura 32 y Figura 33 que corresponden a los tratamientos B1, B2 y BC respectivamente. Los cuales resumen la disminución de la concentración de HTP's a través del tiempo de degradación en los tres tratamientos.

Debido a un análisis previo de concentración de HTP's, se obtuvieron datos de concentración inicial de 55,000 mg/kg ss; por lo tanto para la cuantificación por cromatografía de gases, se decidió realizar diluciones en las muestras iniciales y finales de



cada biopila, ya que la curva de calibración se realizó a una concentración máxima de 50,000 mg/kg ss. En el cromatograma de la Figura 30, se observa la composición del diesel mediante los picos identificados a diferentes tiempos de retención y que corresponden a cada hidrocarburo con diferente número de carbono, y el área bajo la curva indica la concentración. Es evidente que la adsorción de compuestos de diesel fue mayor en el tratamiento B2 y BC. El cromatograma del tratamiento B1 (b) indica que hubo una mayor adsorción de compuestos del diesel con números de carbono entre 17 y 25. Mientras que en el tratamiento B2 (b) y BC (b), se observa un gran contenido de contaminantes que en su estructura presentan hidrocarburos entre  $C_{11}$ - $C_{27}$ . Los cromatogramas correspondientes al día 42 de las tres biopilas indican que en los tratamientos B1, B2 y BC se degradaron los compuestos de  $C_{10}$ - $C_{16}$ , ya que los picos de los cromatogramas correspondientes prácticamente desaparecieron. En el tratamiento B1 también hubo una rápida disminución en compuestos de  $C_{22}$ - $C_{27}$  al inicio del proceso indicándonos que hubo una gran actividad microbiana. Estos compuestos pudieron ser convertidos a compuestos de menor peso molecular, aumentando el área de  $C_{17}$  a  $C_{21}$ . Se cree que los microorganismos presentes en las SH pudieron ser capaces de utilizar los compuestos del diesel de mayor peso molecular  $C_{22}$ - $C_{27}$ , degradándolos más rápidamente en comparación con los otros dos tratamientos, esto debido probablemente a que los microorganismos estaban adaptados a SH como fuente de carbono. Las SH presentan estructuras más complejas que las de los compuestos del diesel, por lo que probablemente, estos últimos resultaron ser para los microorganismos, compuestos más fácilmente asimilables como fuente de carbono y energía.

La degradación de compuestos de  $C_{22}$ - $C_{27}$  en los tratamientos B2 y BC fue después del día 42, lo que se relaciona con una adaptación más lenta de los microorganismos hacia sustratos más complejos (Hernández, 2013).

Al final del proceso los cromatogramas de todas las biopilas muestran señales más grandes en  $C_{18}$ ,  $C_{21}$  y  $C_{23}$  principalmente, siendo entonces estos los compuestos más recalcitrantes al final del proceso de remediación.

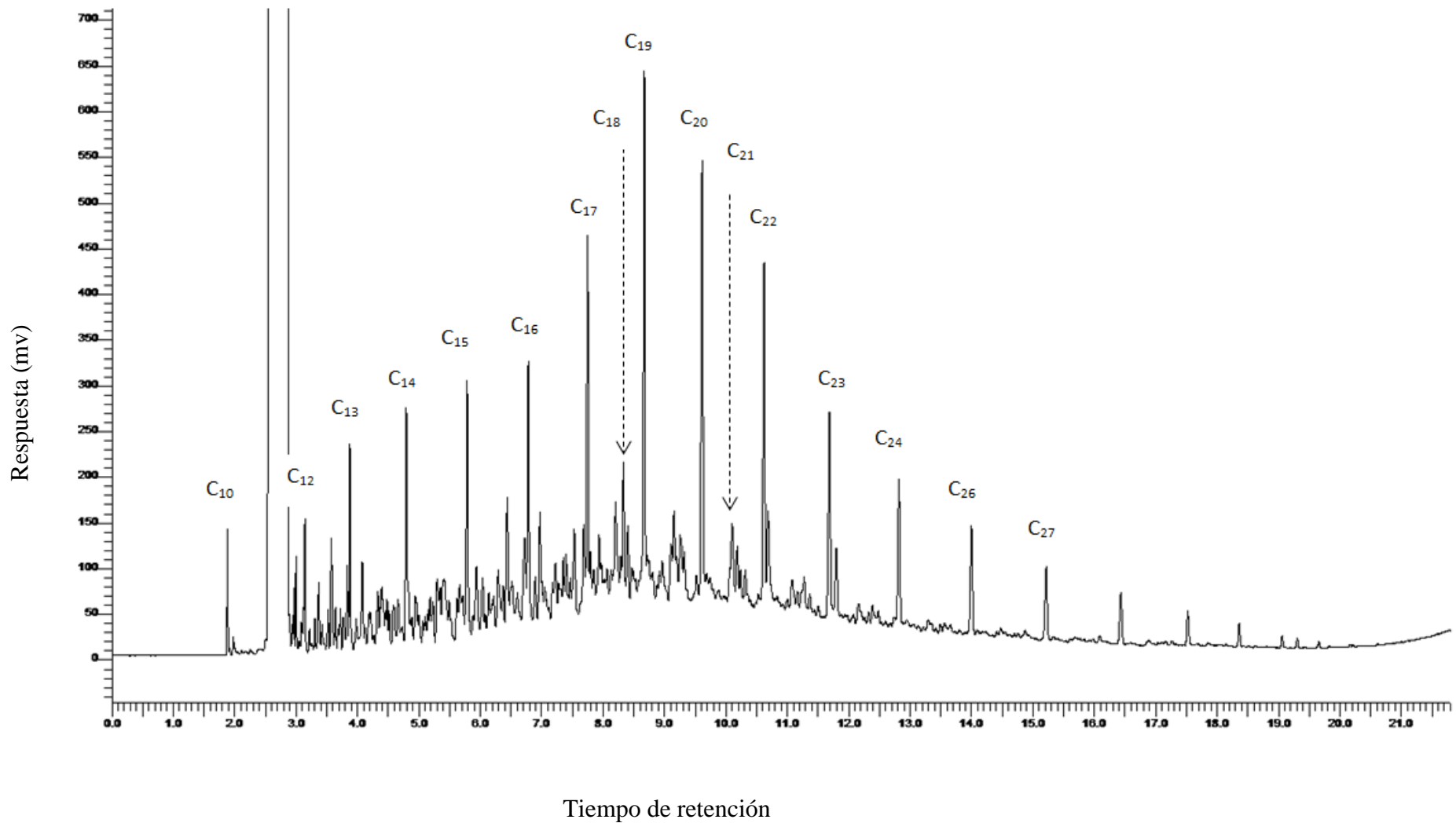


Figura 30 Cromatograma de estándar de 25,000 ppm de diesel puro, con identificación de números de carbono de C<sub>10</sub> – C<sub>27</sub>.

Biopila 1

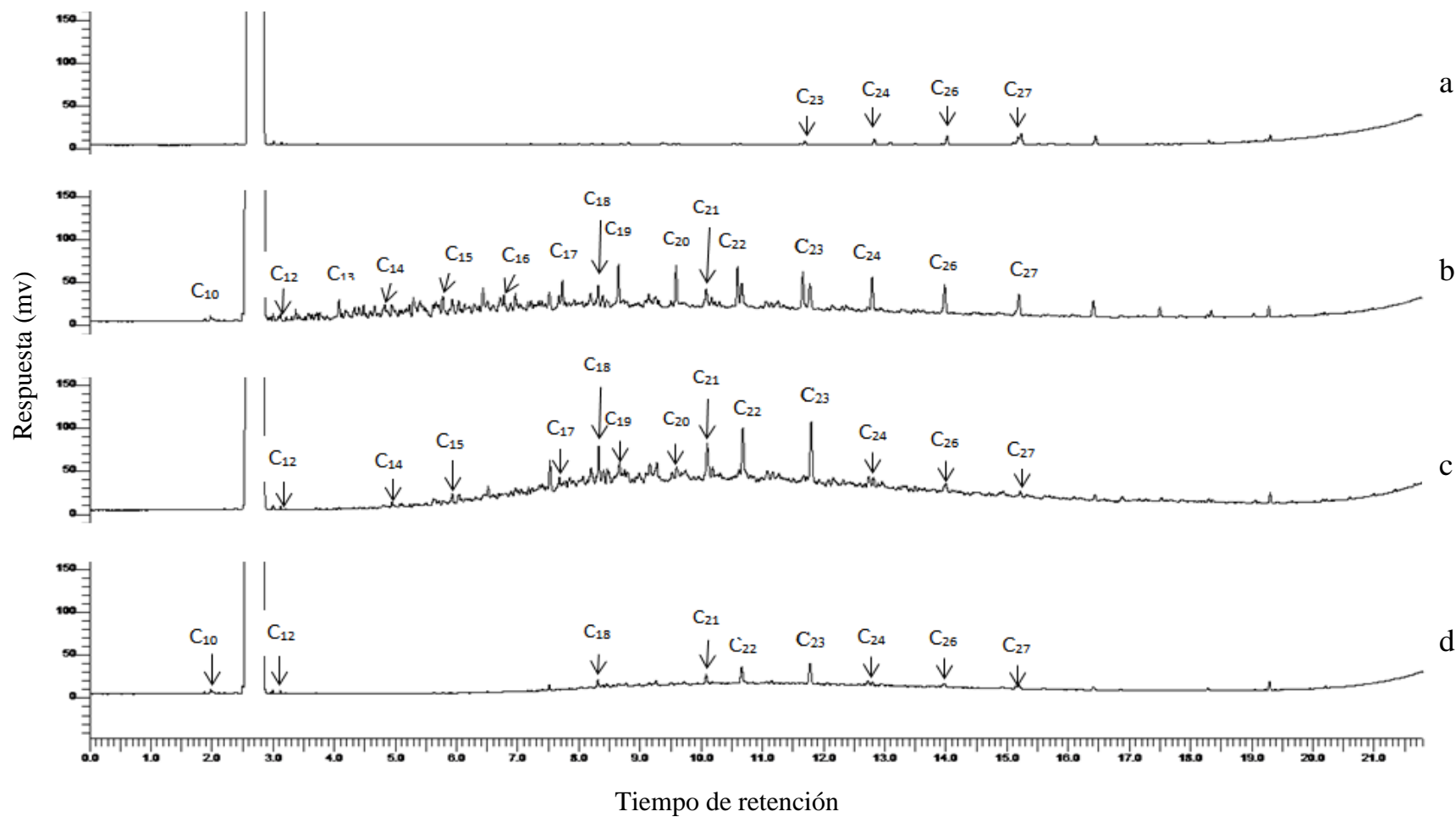


Figura 31 Cromatogramas de la biopila 1 (a) antes de ser contaminado, (b) día 0, (c) día 42, (d) día 112.

Biopila 2

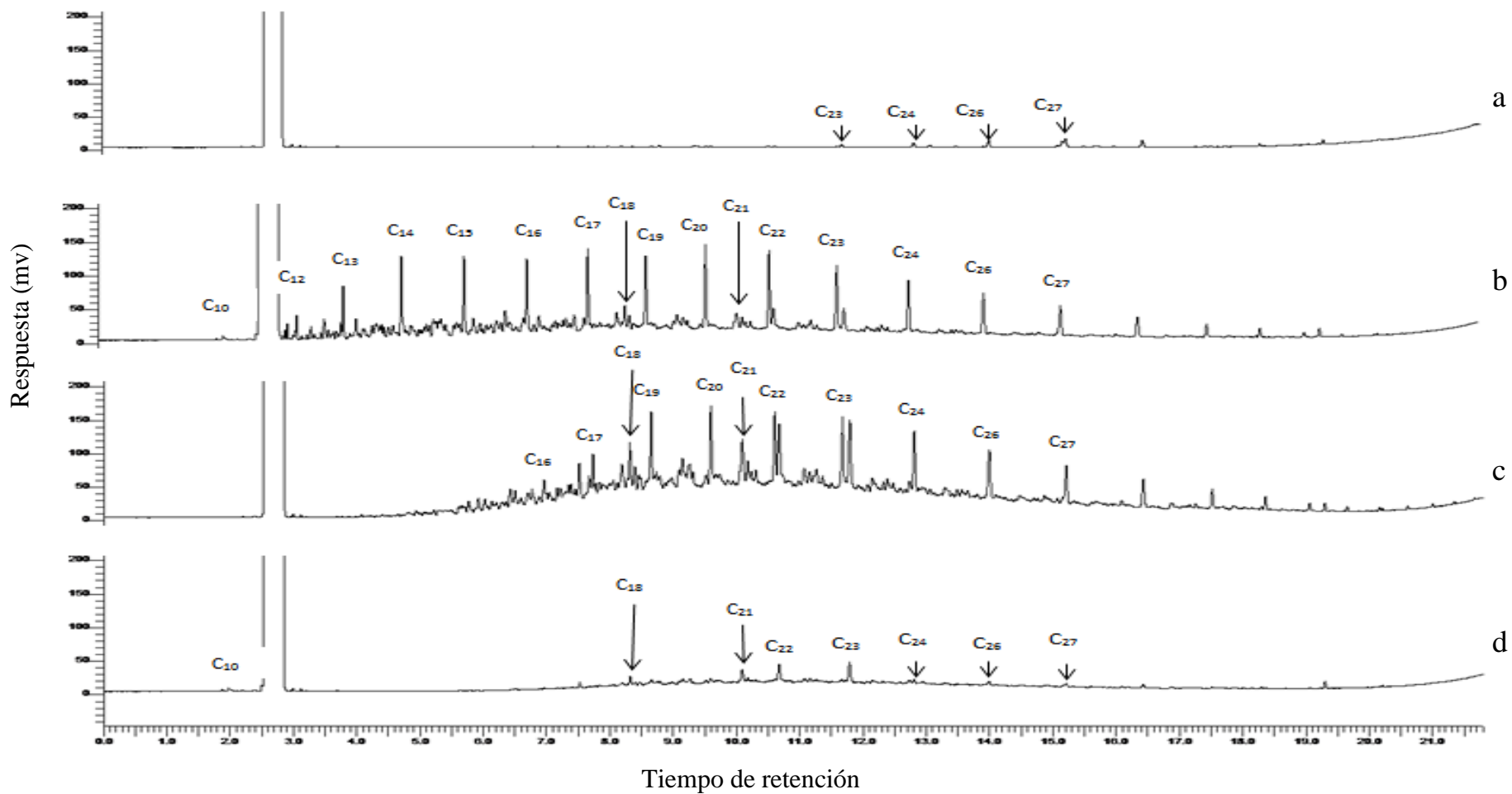


Figura 32 Cromatogramas de la biopila 2 (a) antes de ser contaminado, (b) día 0, (c) día 42, (d) día 112.

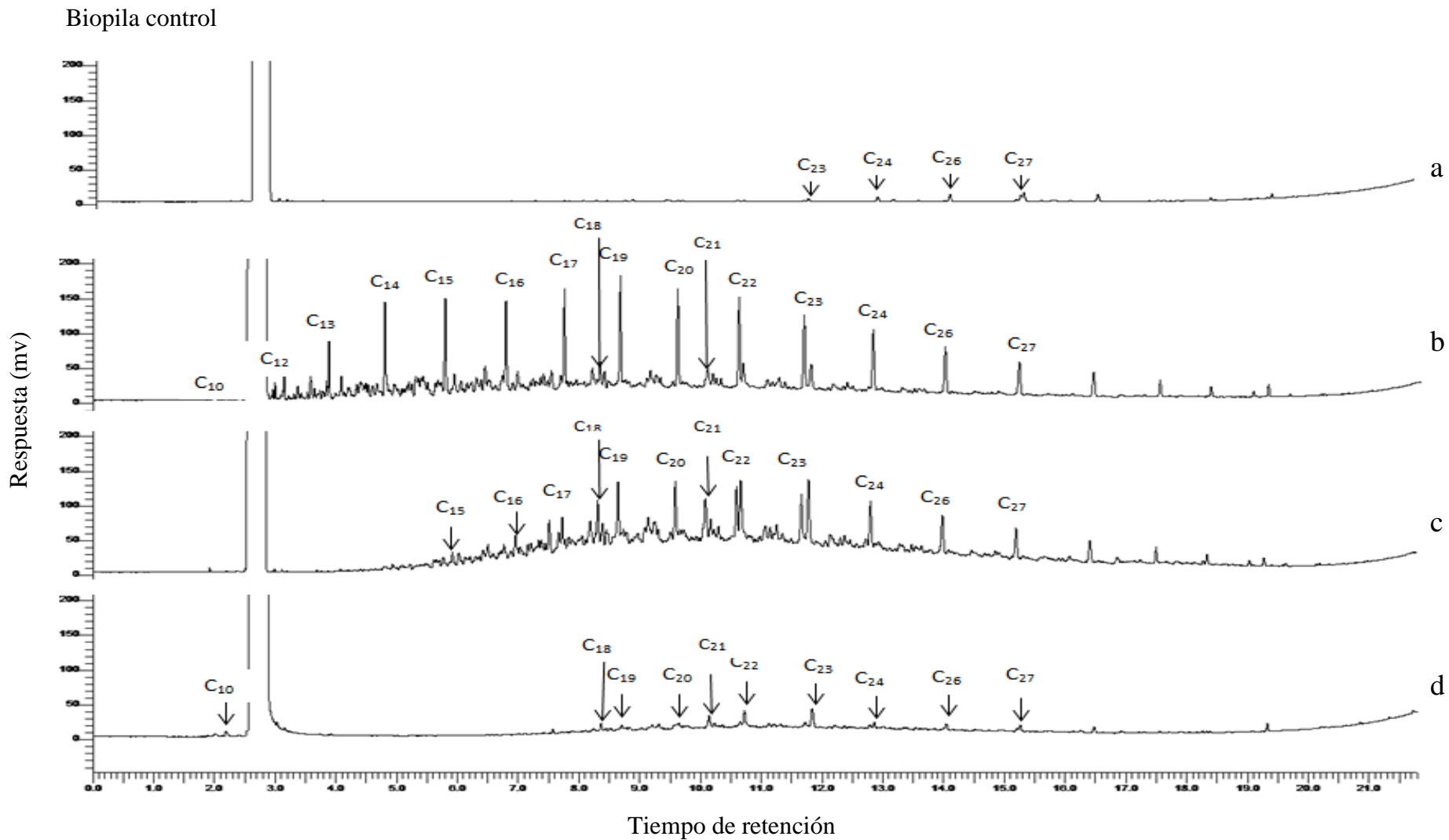


Figura 33 Cromatogramas de la biopila control (a) antes de ser contaminado, (b) día 0, (c) día 42, (d) día 112.

## CONCLUSIONES

- Se implementó un sistema de biorremediación basado en biopilas aireadas manualmente, construidas a la intemperie para la recuperación de suelos con materia orgánica derivada de composta, contaminado con diesel.
- Los porcentajes de degradación indican que el tratamiento B1 (88.22%) fue el proceso más eficiente seguido del tratamiento B2 (79.25%) y BC (78.97%).
- La cinética presentó un comportamiento lineal, adaptándose al modelo de primer orden. La constante de degradación fue mayor en B1 ( $k=0.020$ ), en un 20% por arriba de B2 y BC ( $k=0.016$  y  $0.015$ ).
- Los microorganismos autóctonos del suelo con composta fueron capaces de adaptarse y degradar a los compuestos derivados del petróleo con altas tasas de remoción.
- La adición de sustancias húmicas aceleró el proceso de degradación por el alto contenido de nutrientes y microorganismos presentes en este tipo de material orgánico.  
La máxima tasa de remoción de hidrocarburos se obtuvo en los primeros 84 días, donde se observó la efectividad del tratamiento de la biopila 1. Sin embargo a los 112 días todos los tratamientos presentaron el mismo comportamiento.
- En este proyecto se comprobó que la composta como material orgánico, puede ser utilizado para enriquecimientos de nutrientes y microorganismos en suelos contaminados con hidrocarburos.

## RECOMENDACIONES

- Es importante realizar pruebas de remoción de este tipo de contaminantes probando diferentes relaciones de SH- suelo contaminado con y sin composta para encontrar un óptimo en donde la degradación pueda ser mayor a menor tiempo.
- Es recomendable el monitoreo de parámetros físico-químico, biológicos en todo el proceso, ya que aporta información sobre las condiciones en que se encuentra el sistema de saneamiento.
- Debido a que se presentaron grandes porcentajes de remoción de hidrocarburos con la utilización de composta madura se recomienda la caracterización de

microorganismos contenidos en la misma, con el fin de identificar los degradadores potenciales de hidrocarburos y preservarlos como consorcios que puedan ser utilizados como flora autóctona en la remediación de sitios contaminados en México.

- Se recomienda el estudio de biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos en microcosmos, con condiciones de humedad y temperatura controladas para observar las tasas de degradación., probando enmiendas como composta y SH por separado.
- En caso de utilizar la técnica biológica de biopilas es importante tener en cuenta las dimensiones ya que factores ambientales como la temperatura y la humedad pueden tener un efecto directo en el proceso.

## ANEXO I

### Preparación de soluciones

#### Textura

- Solución dispersante de hexametáfosfato de sodio: Se disuelven 37 g de Hexametáfosfato de sódico y 7.94 g de carbonato de sodio en 300 mL de agua destilada y se diluye hasta un litro de agua destilada. (El hexametáfosfato sódico puede prepararse calentando fosfato monosódico a 650 °C.).

#### CIC

- Cloruro bórico, 0.5 N-trietanolamina, 0.2 N: Se disuelven 62 g de  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 500 mL de agua destilada. Se añaden 25 mL de trietanolamina ( $d= 1.125 \text{ g/mL}$ , 8N). Se añade agua destilada hasta unos 800mL. Se ajusta el pH a 8.1 por adición de HCl 1 N (unos 70-90 mL de esta solución son suficientes). Se afora a 1 litro.
- Solución de sulfato magnésico, aprox. 0.1 N: Se disuelven 12.5 g de sulfato de magnesio ( $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) en agua y se afora a un litro.
- EDTA 0.05 N: Se disuelven 9.305 g de etilendiaminotetracetato disódico en agua y se afora a 1 litro con agua destilada.
- Solución Tampón: Se mezcla una parte de solución de cloruro amónico 1N (Preparada disolviendo 26.75g en 500ml de agua) con cinco partes de solución de hidróxido amónico 1N (Preparada disolviendo 33.4mL de hidróxido de amoniaco en 500mL de agua).

#### Nitratos

- Solución de Ácido 2-4 fenildisulfónico: Disolver 25 g de fenol blanco puro en 150 mL de Ácido Sulfúrico concentrado R.A; agitar bien y se calienta en baño maría durante dos horas.
- Solución de Amonio 6 N: Se toman 100 mL de amoniaco concentrado y se diluye hasta 200 mL con agua destilada.



## Fosforo Soluble

- $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N: 70 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado a 500 mL con agua bidestilada (libre de fósforo).
- Tartrato de antimonio y potasio : disolver 1.3715 g de  $\text{C}_8\text{H}_4\text{K}_2\text{O}_{12}\text{Sb}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  en 400 mL de agua destilada. Guardar en un frasco con tapón de vidrio.
- Molibdato de Amonio: Disolver 20 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en 500 mL de agua destilada. Guardar en un frasco con tapón de vidrio.
- Ácido Ascórbico: Disolver 1.76 g de ácido ascórbico en 100 mL de agua destilada. Almacenar a 4 OC por no más de una semana.
- Reactivo combinado:

1.- 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N

2.- 1 mL de la solución de Tartrato de K Y Sb

3.- 3 mL de la solución de Molibdato de Amonio

4.- 6 mL de la solución de ácido Ascórbico

## Carbono Orgánico

- Mezcla de ácidos ( $\text{H}_3\text{PO}_4:\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}$ , en proporción 2.5:2.5:5.0). No olvidar adicionar primero el agua y después los ácidos lentamente y por las paredes del recipiente. Preparar en la campana de extracción y en baño de hielo.

## Nitrógeno total

- Solución de ácido bórico con indicador. Pesar 20 g de ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) y disolver en 750 mL de agua destilada. Calentar para la completa disolución del ácido. Dejar enfriar y agregar 20 mL de la siguiente mezcla de indicadores: 0.099 g de verde de bromocresol y 0.066 g de rojo de metilo disueltos en 100 mL de alcohol etílico al 96%. Aforar a 1 L.
- Solución de hidróxido de sodio al 50%: Pesar 500 g de hidróxido de sodio (NaOH), disolver en agua destilada y aforar a 1 L.

- Solución de HCl 0.1 N: Diluir 8.3 mL de HCl concentrado hasta completar un volumen de 1 L con agua destilada. La concentración del ácido debe ser estandarizada con la solución valorada de carbonato de sodio.

## Amonio

- Nitroprusiato-Salicilato: Pesar 0.125 g de Nitroprusiato de Sodio disolverlo en 70 ml de agua destilada y agregar 7.813 g de Salicilato de Sodio; llevar a un volumen de 100 mL. Mezclar a fondo, y transfiera la solución a un frasco ámbar, para protección a la luz. Almacene en el refrigerador.
- EDTA-disódico: Pesar 0.6 g de EDTA-disódico, disolver en 100 mL de agua destilada.
- Buffer de Hipoclorito *de sodio*: Pesar 9.96 g de fosfato de sodio dibásico disolver en 65 mL de agua destilada en agitación magnética hasta que esté completamente disuelto y transparente.
- Disolver 2.96 g de Hidróxido de Sodio en 10 mL de agua destilada y agregar a la solución anterior lentamente en agitación magnética. Posteriormente agregar 10 mL de hipoclorito (cloralex) agitar hasta homogenizar.

Medir pH, en caso necesario ajustar hasta 13 con solución de hidróxido de sodio 1M.

- Solución estándar de amonio: Disolver 0,4717 g de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en agua destilada y diluir la solución en 1 litro en un matraz volumétrico. Si es usado en seco  $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ , la solución contiene  $100 \mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4^+$   $\text{mL}^{-1}$ . Almacenar la solución en refrigeración. Prepare para trabajar con estándar que contiene  $2\mu\text{g}$  de  $\text{NH}_4^+$   $\text{mL}^{-1}$ , diluya 4 mL de la solución concentrada en 200 mL en un frasco volumétrico con agua destilada.

## ANEXO II

### Curva tipo Nitratos

- Solución patrón 10 ppm de Nitrógeno:** Se pesan 0.7221 g de nitrato de potasio (R. A.), se disuelven en agua destilada y se diluye hasta un litro. (Esta solución contiene 100 ppm de nitrógeno). Se toman 25 mL de esta solución y se diluyen, en un matraz aforado, hasta 250 mL con agua destilada. (Esta última solución contiene 10 ppm de nitrógeno). De acuerdo a la sig. tabla es como se realiza la curva tipo.

Número de tubo	Volumen de la solución de nitrato de potasio (ml)	Volumen del extracto de muestra	Secar en horno a 105°C 24 h	Ac. Fenildisulfónico (ml)	Agua destilada (ml)	KOH 12N ml	Filtrar y aforar a 50 ml Leer A
B	0	0	√	2	10	9	410 nm
1	1	0	√	2	10	9	
2	2	0	√	2	10	9	
3	3	0	√	2	10	9	
4	4	0	√	2	10	9	
5	5	0	√	2	10	9	
6	6	0	√	2	10	9	
7	7	0	√	2	10	9	
8	8	0	√	2	10	9	
9	9	0	√	2	10	9	
10	10	0	√	2	10	9	

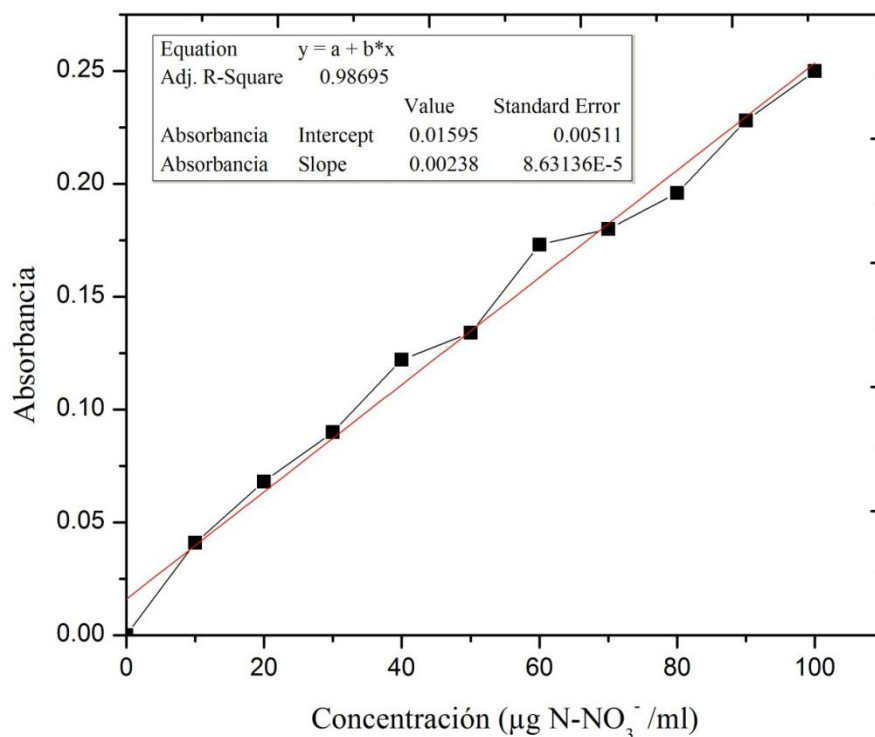
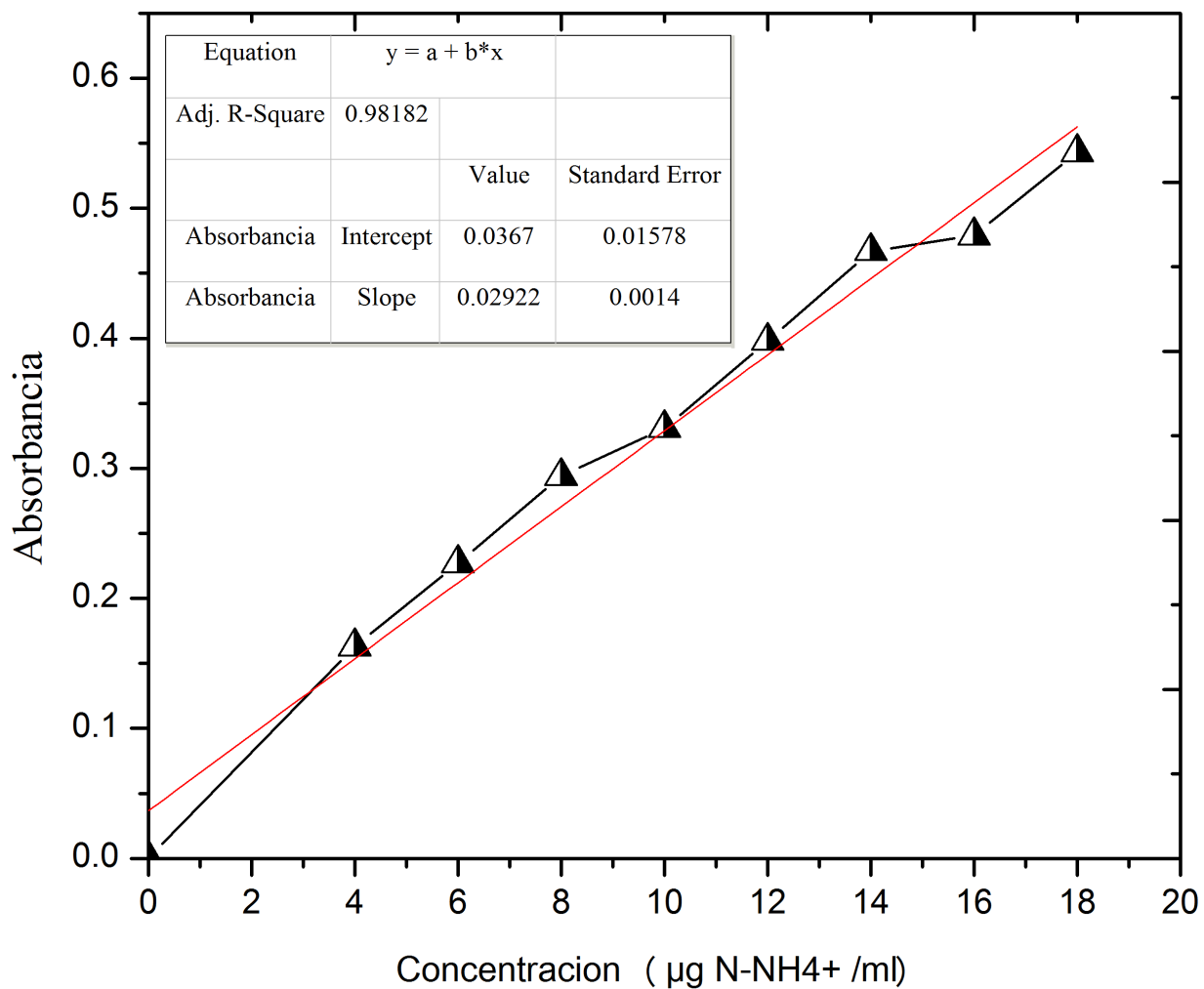


Figura 34. Curva tipo para la determinación de la concentración de N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> del suelo.

**Curva tipo amonio.**



**Figura 35. Curva tipo para la determinación de la concentración de  $\text{NH}_4^+$  del suelo.**

### Curva tipo fosforo soluble.

Se pesó con exactitud 0.0685 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , aforar a 100 mL. En esta solución se tendrán 0.15 mg de  $\text{PO}_4^{-3}$ /mL. Se tomó 1 mL de la solución de fosfato de potasio y se aforó con agua destilada en un matraz volumétrico de 100 mL; la preparación de la curva se llevó a cabo respetando el contenido y orden que se muestra en la siguiente tabla. Con esta solución se tiene una concentración de  $1.5 \mu\text{g PO}_4^{-3}$ /mL.

Número de tubo	Volumen de la solución de fosfato de potasio (mL)	Volumen de agua destilada (mL)	Volumen del extracto de muestra	Volumen del reactivo combinado (mL)	Agitar y dejar reposar (min)	Leer A
B	0	10	0	1.6	10	880 nm
1	1	9	0			
2	2	8	0			
3	3	7	0			
4	4	6	0			
5	5	5	0			
6	6	4	0			
7	7	3	0			
8	8	2	0			
9	9	1	0			
10	10	0	0			

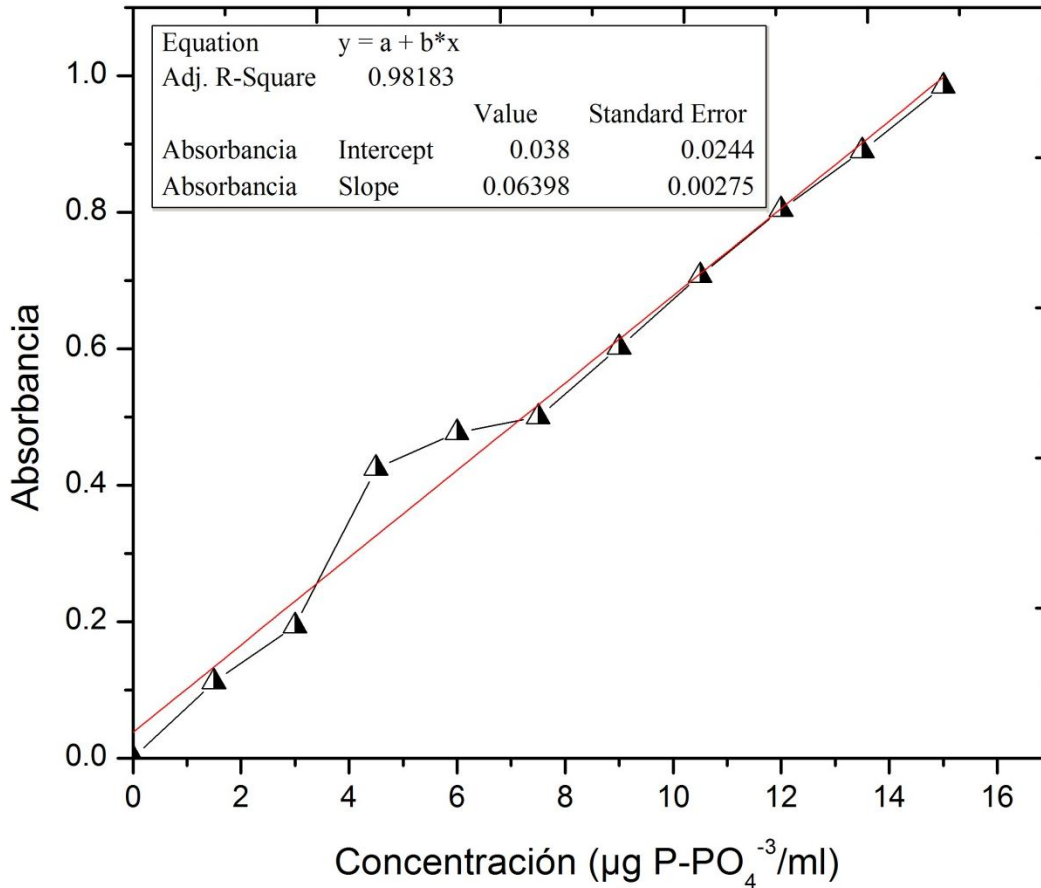


Figura 36. Curva tipo para la determinación de la concentración de  $\text{P-PO}_4^{-3}$  del suelo.

## Determinación de concentración de TPH's.

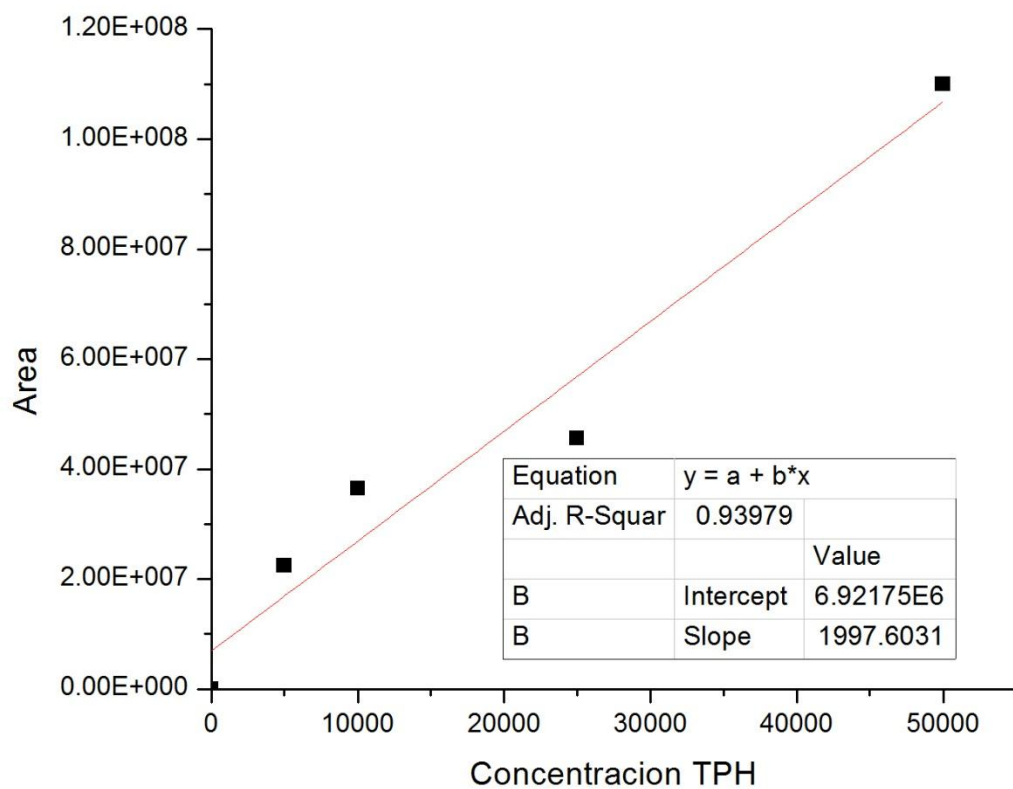


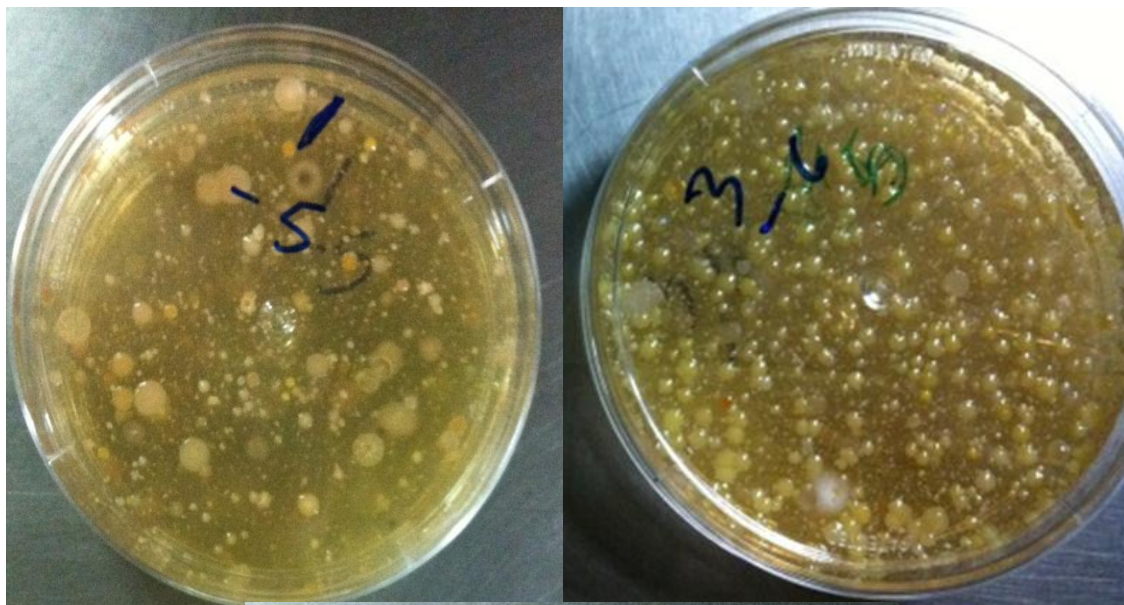
Figura 37. Curva tipo para la determinación de la concentración de HTP's.

### ANEXO III Fotografías

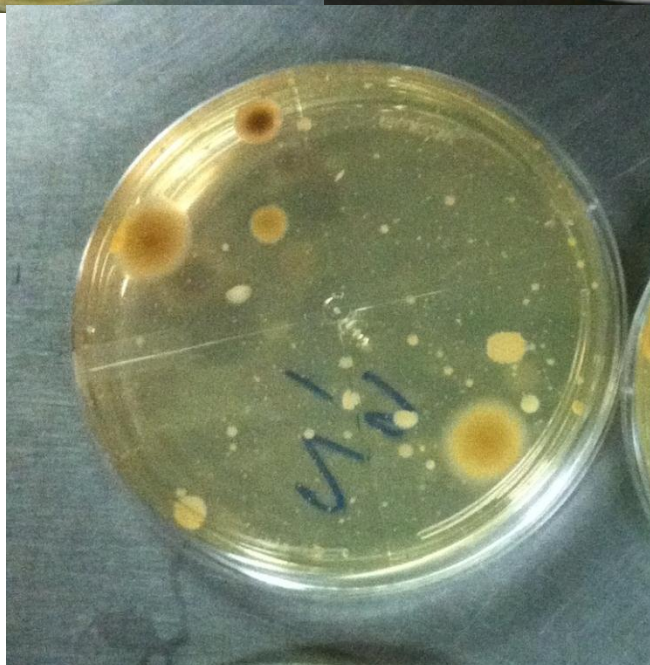
En este apartado se muestran las fotografías tomadas de las cajas petri utilizadas en los conteos de FCU a diferentes tiempos. Se puede observar la variación de características macroscópicas de forma y color al paso del tiempo de biorrecuperación.

**Biopila 1**

**Biopila 2**

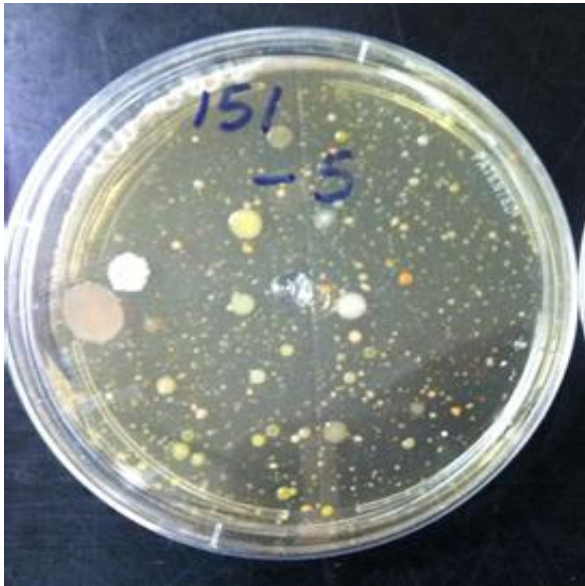


**Biopila control**

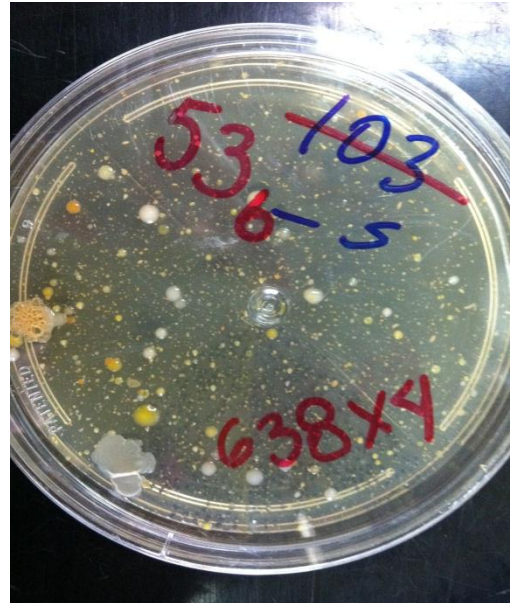


**(a)**

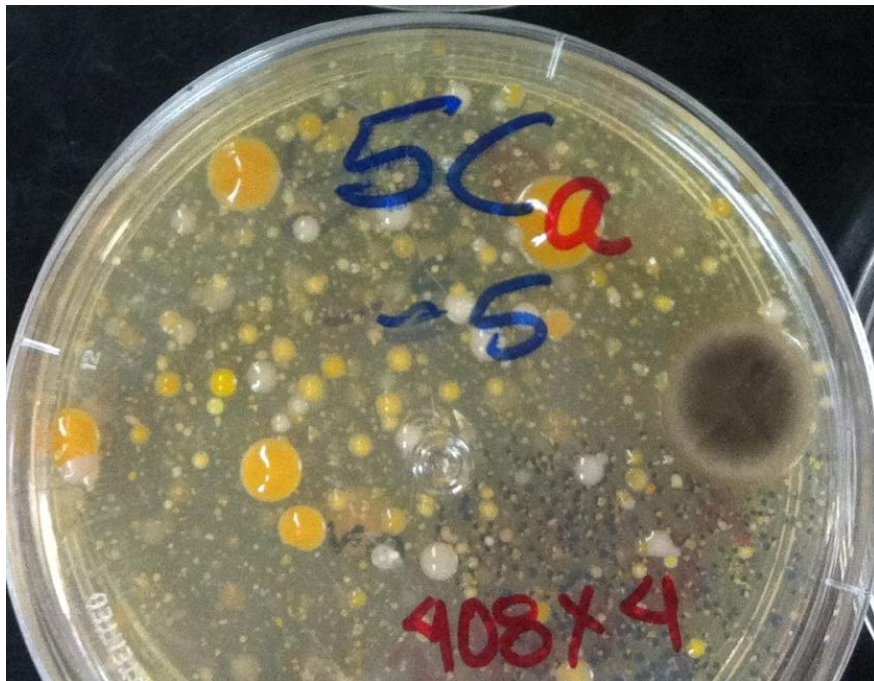
Biopila 1



Biopila 2



Biopila control



(b)



Biopila 1



Biopila 2



Biopila control

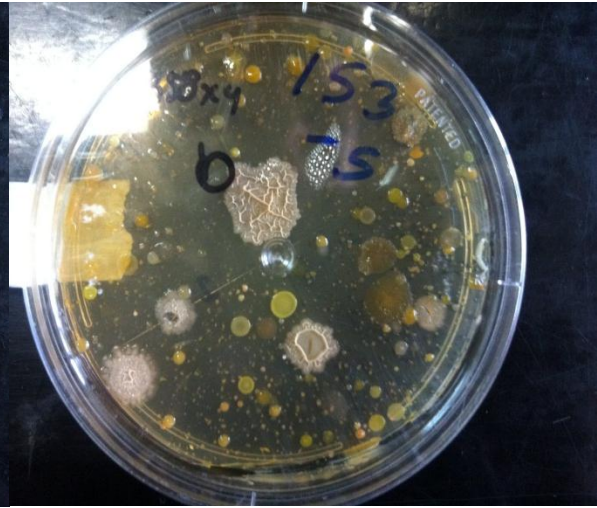


(c)

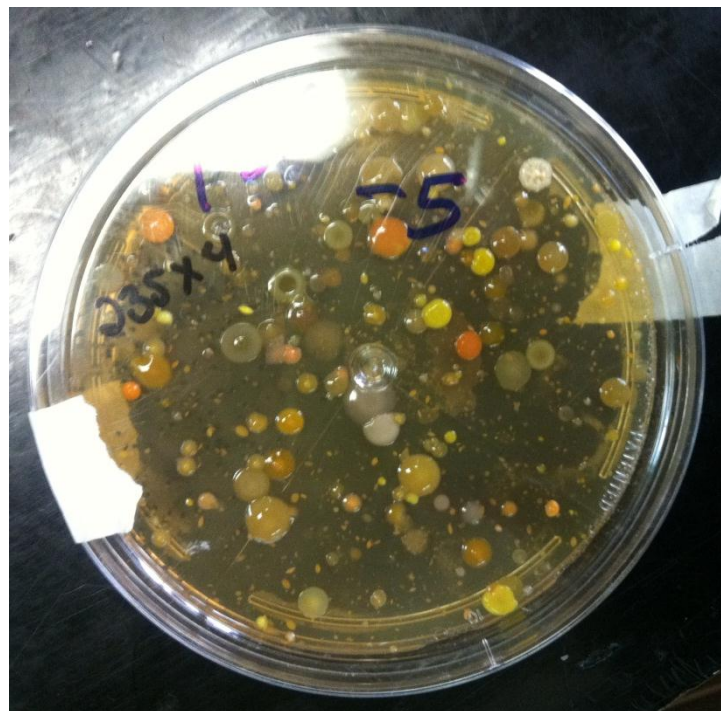
Biopila 1



Biopila 2



Biopila control

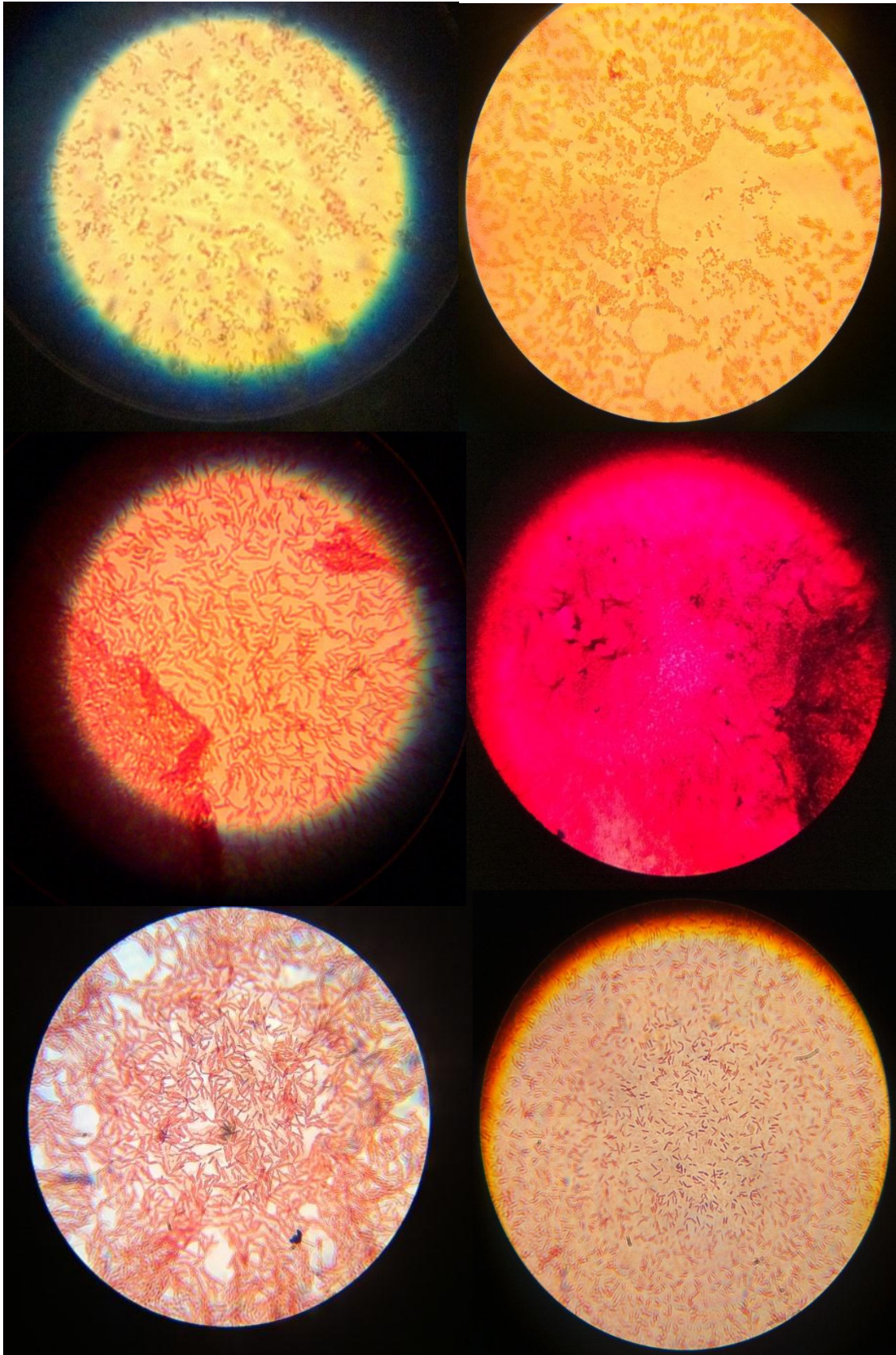


(d)

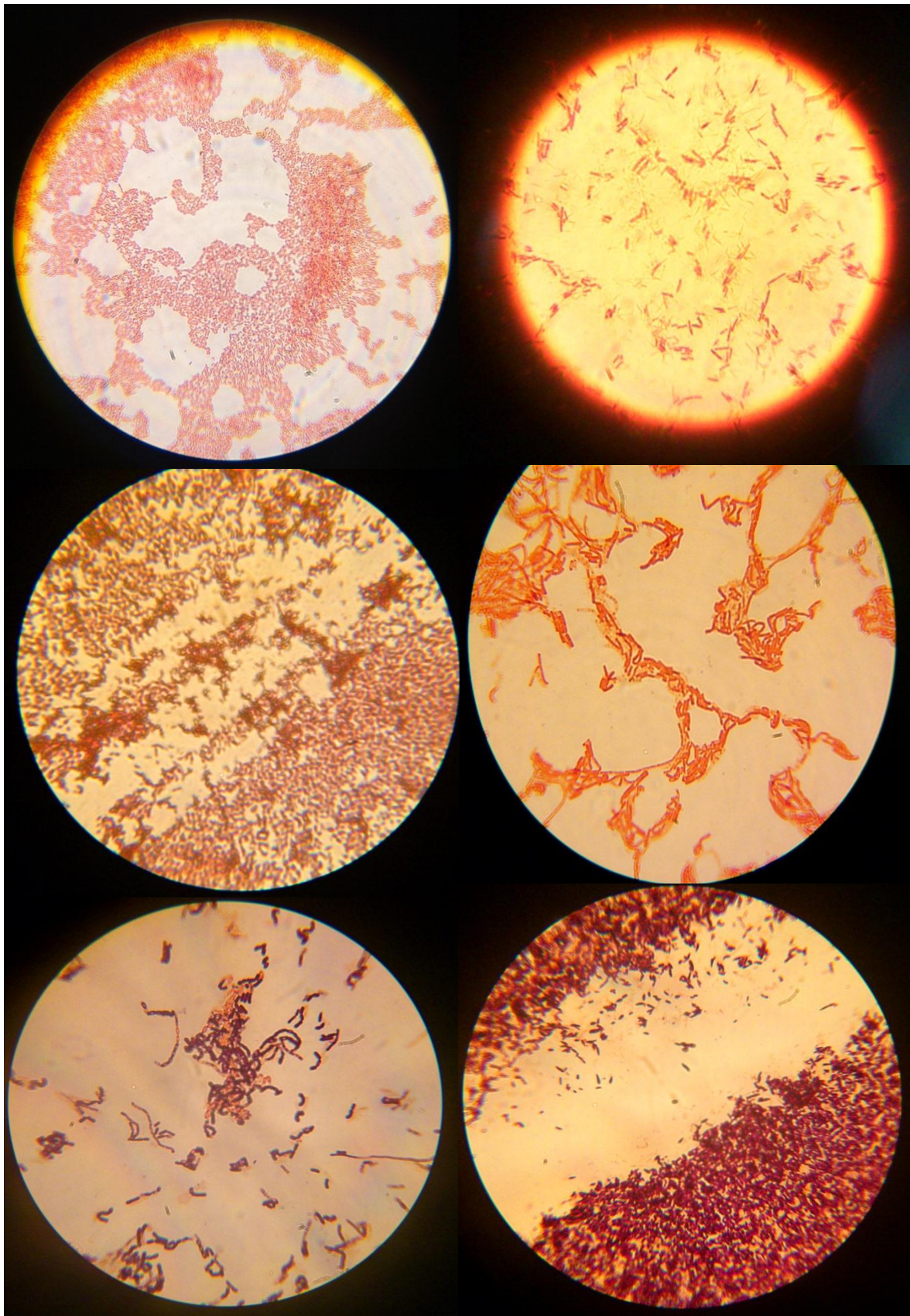
Figura 38. Aspecto de las placas sembradas para recuento de CFU a diferentes días experimentales. Día 1 (a), 28 (b), 62(c) y 112 (d).



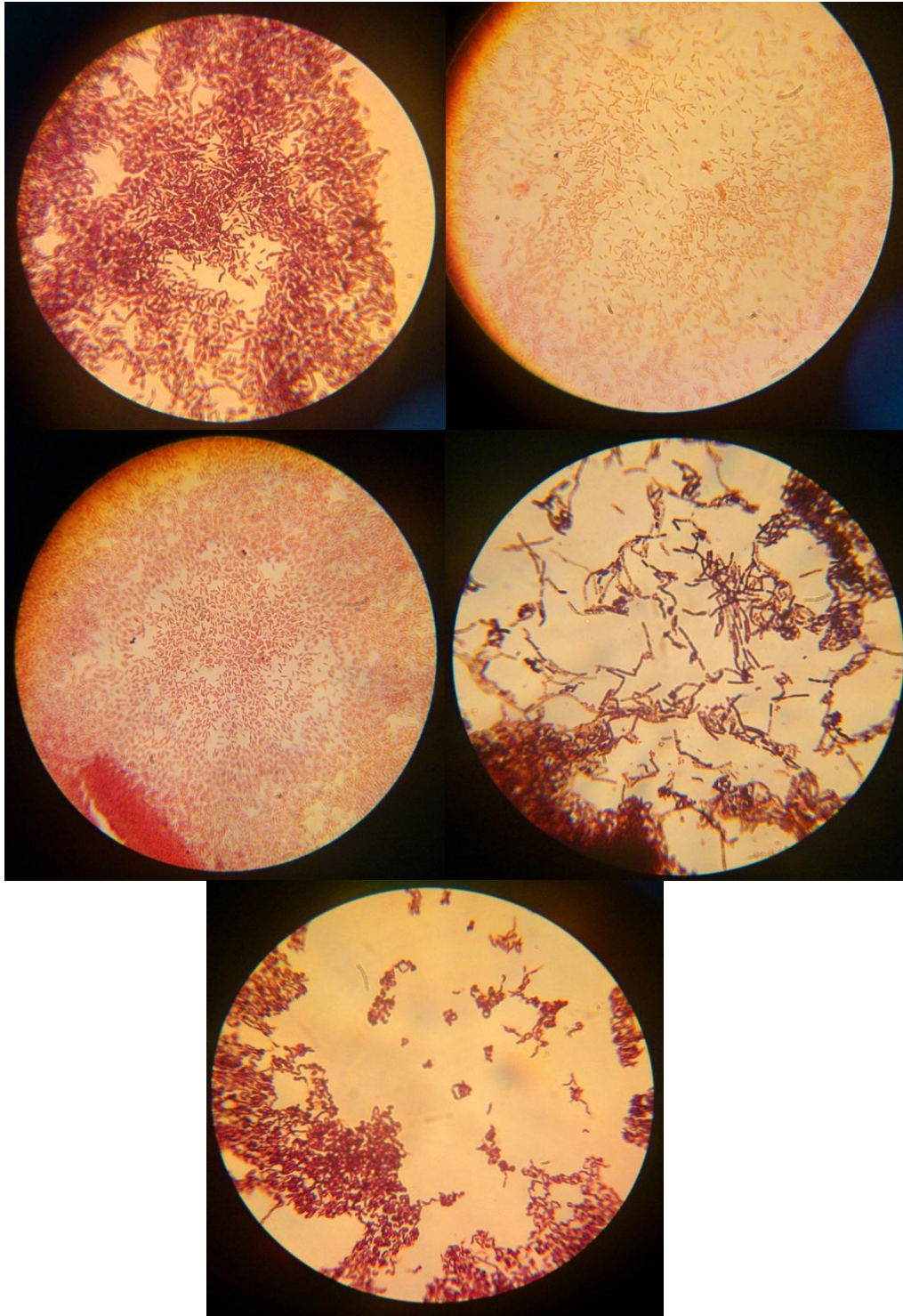
**Figura 39. Aspecto del suelo al inicio (izquierda) y al final (derecha) de la experimentación.**



(a)

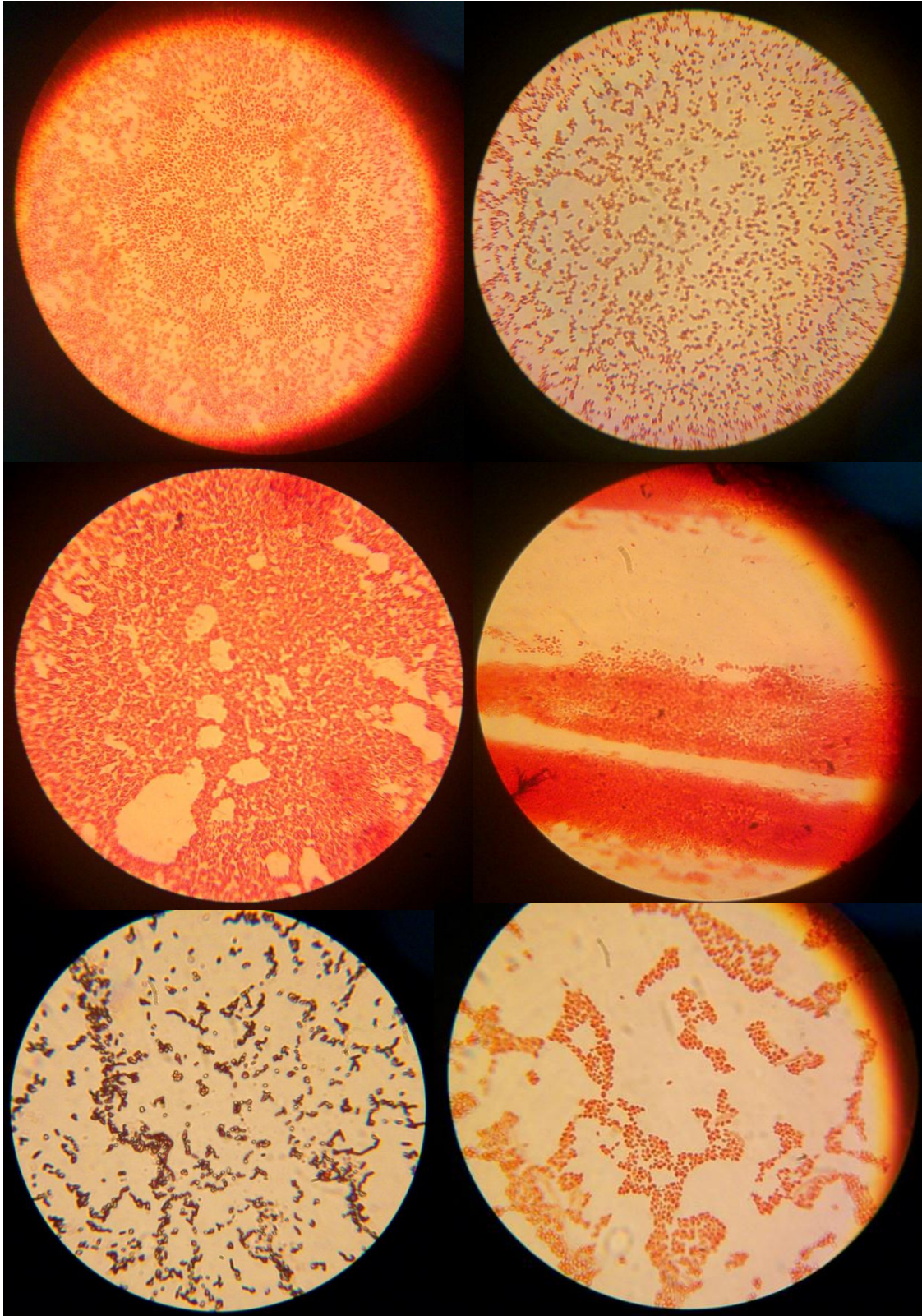


(b)



(c)

Figura 40. Imágenes tomadas en microscopio óptico (100 X) de diferentes microorganismos tipo bacilos GRAM (-), presentes en los tratamientos.



**Figura 41. Imágenes tomadas en microscopio óptico (100 X) de diferentes microorganismos tipo cocos GRAM (-), presentes en los tratamientos.**

## BIBLIOGRAFIA

Abdulsalam S., Bugaje I.; Adefila S., Ibrahim S., 2011. Comparison of biostimulation and bioaugmentation for remediation of soil contaminated with spent motor oil. *International Journal Environmental. Science Technology*, 8 (1), 187-194. ISSN: 1735-1472.

Agilent Technologies. 2013. GC and GC/MS, Your Essential Recourse for Columns & Supplies. En línea: [www.interch.fr/cat/5991-1058EN%20GC\\_Applications.pdf](http://www.interch.fr/cat/5991-1058EN%20GC_Applications.pdf)

Ahumada M. y Gómez R., 2009. Evaluación y selección de bacterias degradadoras de fenol por respirometría. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Alessandra C., Chagas S., Mario K., de Lima Edmilson y Gavazza S., 2012. Bioremediation of a tropical clay soil contaminated with diesel oil. *Journal of Enviromental Management*. 113: 510-516.

Alexander M, 1980. Introducción a la microbiología del suelo. 2ª ed. Libros y editoriales S.A. ISBN: 968-462-002-0.

Álvarez-Bernal, D., García-Díaz, E.L., Contreras-Ramos, S.M., Dendooven, L., 2006. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil added with manure or vermicomposta. *Chemosphere*. 65, 1642–1651.

American Standards for Testing of Materials. D-2216-98: Standard Test Methods for Laboratory Determination of Water (Moisture) Content of Soil and Rock by Mass, 1998 USA.

Arrieta O., Rivera A., Arias L., Rojano B., Ruíz O., Cardona S., 2012. Biorremediación de un suelo con diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. 15 (1): 27-40. ISSN:0124.177X.

Asha A. Juwarkar , Sanjeev K. Singh M., 2010. A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Rev Environ Sci Biotechnol* , 9:215–288.

Atagana H., Haynes R. y Wallis F., 2003. Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation*. 14:297-307.

Atlas R. y Bartha R., 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. PEARSON ADUCACIÓN, S.A. Madrid. ISBN: 84-7829-039-7.

Auxilia M., Domínguez M. y De Sousa L., 2002. Evaluación del tratamiento de los suelos contaminados con fueloil empleando el proceso de biorremediación en un complejo termoeléctrico. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Cancún, México, 27 al 31 de octubre, 2002



Bendeck M. Origen y formación del humus. Agrilab, Colombia.

Bento, F., Camargo, F., Okeke, B. y Frankenberger W., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 96: 1049-1055.

Bermúdez R., 2009. Optimización de la degradación d hidrocarburos en el área de biotratamiento de suelo de la empresa petrolera “Petrozuata C. A.”. Tesis de grado. Venezuela.

Betancur L., Alvarez D., Bernal A., Ramos C. y Dendooven L., 2006. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated saline-alkaline soils of the former Lake Texcoco. *Chemosphere* 62: 1749–1760.

Blaise Ch., Chijioke G. y Ositadinma B., 2011. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. *Biotech.* 1:117–138.

Bobadilla C. y Rincón S., 2008. Aislamiento y producción de bacterias fosfatos solubilizadoras a partir de compost obtenidos de residuos de plaza. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.

Bouyoucos, G.J., 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agron. J.* 54:464-465.

Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. *Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

Cardona S., Iturbe R., 2003. Biodegradación de diesel mexicano por un consorcio de bacterias de un suelo agrícola. *DYNA*, 138, 13-26, Medellín, Marzo 2003, ISSN 0012-7353.

Carla A, Nicholson M, Fathepure B., 2004. Biodegradation of benzene by halophilic and halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (2):1222-1225.

Coyne M., 2000. *Microbiología del Suelo: un enfoque exploratorio*. Madrid, Paraninfo. 397 pp.

Chambers, C., Willis, J., Gitipour, S., Zieleniewski, J., Rickabaugh, J., Mecca, M., 1991. In situ treatment of hazardous waste contaminated soils, second edition (pollution technology review). Park Ridge: Noyes Data Corporation.

David P., 2008. Extracción, caracterización de sustancias húmicas y su empleo en procesos fotoquímicos de interés ambiental. Tesis de grado.

Dueñas M. y Santos L., 2006. Evaluación de la bioestimulación y bioaumentación (bacterias nativas y comerciales) en la biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados. Tesis de grado. Colombia: Universidad Industrial de Santander.

EPA, 2004. Biopiles.

Ercoli E, 2008. Biorremediación de suelos: desde el concepto hasta su aplicación. *Foro internacional. Supervisión y Fiscalización Ambiental en el sector Hidrocarburos*: 17 y 18 de Julio. Lima Perú.

Eweis J, Ergas S, Chag D, Schoroeder E., 1999. Principios de Biorrecuperación. 1ª ed. McGraw-Hill. Madrid, España. 327 pp.

Fatima M., Flávio A., Benedict C., William T., 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96:1049–1055.

Ferguson S., Franzmann P., Snape I, Revill A., Trefry M., Zappia L., 2003. Effects of temperature on mineralization of petroleum in contaminated Antarctic terrestrial sediments. *Chemosphere*. 52:975–987

Flavio B, Leonardo F, Zachia M., 1999. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus erythropolis*. *Revista de microbiología*. 30 (3).

García C., F. Gil, T. Hernández, C. Trasar, 2003. *Parametros bioquímicos en suelos: Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana*. España.

Genovese M., Denaro R., Cappello S., Di Marco G., La Spada G., Giuliano L., Genovese L. y Yakimov M., 2008. Bioremediation of benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes-contaminated soil: a biopile pilot experiment. *Journal of Applied Microbiology* . 105 (5): 1694–1702. ISSN 1364-5072

Gómez S., Gutiérrez D., Hernández A., C. Hernández, Losada M, Mantilla P., 2008. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. *Publicación científica en ciencias biomédicas*. 6 (9): 76-84, Enero- Junio, 2008:101-212. ISSN: 1794-2470.

Gómez W., Gavira J. y Cardona S., 2009. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina – diesel. *Dyna*. 160: 83-93. ISSN 0012-7353

Grace P., Chain T., Ming L., Hsuan Ch., Tseng Po y Cheng S., 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 65 (8):1119-1127.

Grady L., 1985. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. *Biotechnology and Bioengineering* Vol. XXVII: 660-674 pp.

Hameeda B., Harini G., Rupela O., Wannu P. y Reddy G., 2006. Growth promotion of Maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from compost and macrofauna. *Microbial research*.

Hazen, T., Tien A., Worsztynowicz A., Altman D., Ulfing K, y Manko T., 2003. Biopiles for Remediation of Petroleum-Contaminated Soils: A Polish Case Study. *NATO Advanced Research Workshop Volume on The Utilization of Bioremediation to Reduce Soil Contamination: Problems and Solutions*. V. Sasek, J. Glaser, and P. Bevaye. (eds). 229-246 pp, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Hideki K, Katsuyuki U, Hisako H, Horikoshi K., 2002. Novel toluene elimination system in a toluene-tolerant microorganism. *Journal of Bacteriology*. 182: 6451-6455.

John R., Itah A., Essien J., y Ikpe D., 2011. Fate of Nitrogen-Fixing Bacteria in Crude Oil Contaminated Wetland Ultisol. *Bull Environ Contam Toxicol* 87:343–353.

Joo HS, Shoda M, Phae CG , 2007. Degradation of diesel oil in soil using a food waste composting process. *Biodegradation* 18:597-605.

Kaifer, M. J., Aguilar, A., Arana, A., Balseiro, C., Torá, I., Caleyá, J. M. y Pijls, C., 2004. Guía de Tecnologías de Recuperación de Suelos Contaminados. Comunidad de Madrid, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Madrid. 175 pp.

Leiva M. y Rodríguez N., 2013. El diesel [En línea]  
<http://www.ref.pemex.com/octanaje/24DIESEL.htm>

Liu W, Luo Y, Teng Y, Li Z y Ma LQ, 2010. Bioremediation of oily sludge-contaminated soil by stimulating indigenous microbes. *Environ Geochem Health* 32:22-29.

Maletić S., Dalmacija B. y Rončević S., 2013. Petroleum Hydrocarbon Biodegradability in Soil – Implications for Bioremediation. *Hydrocarbon*. 210 pp. ISBN 978-953-51-0927-3.

Margesin R. y Schinner F., 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Applied and environmental microbiology*. 67 (7): 3127-3133.

Maroto A. M. E., Rogel Q.J.M. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. GEOCISA. Div. Protección Ambiental de Suelos. [En línea] En: <http://aguas.igme.es/igme/publica/pdflib15/028.pdf>

Martínez H, Fuentes E, Juan Pablo y Acevedo H., 2008. Carbono orgánico y propiedades del suelo. *R.C. Suelo Nutr. Veg.* 8(1):68-96. ISSN 0718-2791.

Martínez V. y Lopez F., 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas del suelo arcilloso. *Terra*. 19:9-17.

Miller, T. 1994. *Ecología y medio ambiente*. Grupo Editorial Iberoamérica. México, D.F. 867 pp.

Meléndez F., (1982). El origen del petróleo. [En línea]  
<http://revistas.ucm.es/geo/11321660/articulos/COPA8282110061A.PDF>

Melin ES, Jarvinen KT, Puhakka JA (1998) Effects of temperatura on chlorophenol biodegradation kinetics in fluidized- bed reactors with different biomass carriers. *Water Res* 32:81-90.

Mérida J. y Rodríguez Francisco, 2011. Biorremediación de lodos de recortes de perforación base aceite, contaminados con hidrocarburos mediante un consorcio bacteriano y la adición de ácidos húmicos como surfactantes. *Hacia la sustentabilidad: Los residuos sólidos como fuente de energía y materia prima*. pp 560-569. ISBN 978-607-607-015-4

Molina L., Rodríguez R., Hernández M., Vega G., Zapata O., Mendoza A. y Albores A (2004) Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Appl Soil Ecol* 27:165-175.

Moorman T., Cowan J., Arthur E., Coats J., (2001) Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. *Biol Fertil Soils* 33:541-545.

Mora X., 2012. Diferenciando bacterias Gram (+) y GRAM (-). *Secciones avícolas*. 25-26 p.

Mukut K., Arundhuti D., 2012. Study on the effects of soil ph and addition of N-P-K fertilizer on degradation of petroleum hydrocarbon present in oil contaminated soil. *International Journal of Chemical and Petrochemical Technology* .2, (3): 9-21, 2012. ISSN 2277-4807.

Namkoong W., Young H., Seok J., Youg J., 2002. Bioremediation of diesel-contaminated soil with composting. *Environmental pollution*. 119 :23-31.

Narváez S., Gómez M., y Martínez M., 2008. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del caribe colombiano. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR*. 37 (1): 61-75. ISSN: 0122-9761.

Nelson k, Weinel C, Paulsen I, Dondson R, Hilbert H, Martins dos Santos V, Fouts D, Grill S, Pop M, Holmes M, 2002. Complete genoma sequence and comparative analysis of the metabolically versatile pseudomonas putida KT2440. *Enviromental Microbiology*. 4:799.813

Norma oficial mexicana NOM-092-SSA1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.

Ñustez D., 2012. Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible. Tesis de grado.

Obando F., 2003. El transporte de oxígeno en el suelo. Relaciones agrofísicas básicas. Manizales: Universidad de Caldas, centro editorial. 80 pag. ISBN: 958-8041-51-1.

Ortíz O., Ize I., Gavilán A., 2007. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. INE

Ortiz I., Sanz J., Dorado M. y Villar S., 2007. Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Informe de vigilancia tecnológica. Madrid.

Pérez B, Loera O., Fernández L., Esparza F., Rodríguez R., 2004. Biostimulation of microorganisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Lett Appl Microbiol* 38:373-377.

Pérez N., Saval S. Seguimiento a escala de demostración en campo de la degradación de diesel por atenuación natural y por bioincremento.

Picó G., 2002. Composta. Recinto Universitario de Mayagüez. Puerto Rico

Quinn J. y Reinhart D., 1997. Bioremediation of Diesel Contaminated Soil Using Biopiles. *Pract. Period Hazard Toxic Radioact. Waste Manage.* 1(1), 18-25.

Rivera Y. y Dendooven L., 2004. Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. *Chemosphere* 54 (2004) 379-386.

Roche K, Chee-Sanford J, Sanford R, Brian P, James T, Staleyand S., 2003. Anerobic naphthalene degradation by microbial pure cultures under nitrate-reducing conditions. *Applied and Enviromental Microbiology.* 69 (11): 6715-6722.

Rodríguez N., 2005. Las Características de los Combustibles y su Comportamiento en la Altura: Experiencia de la Ciudad de México. Seminario Internacional: Contaminación del Aire en Ciudades de Altura. Cusco, Perú, 20 y 21 de Abril de 2005.

Roldán M., Rodríguez R., Del río P., 2005. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos adicionando granos de café en un sistema de biopilas. VI congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería. ISBN 959-212-158-3.

Rojo S., 2010. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos por medio de biopilas aireadas mecánicamente. Tesis de grado. Instituto Politécnico Nacional. México. 87 p.

Ruberto L., Dias R., Lo Balbo A., Vazquez S., Hernandez E., y Mac Cormack W., 2009. Influence of nutrients addition and bioaugmentation on the hydrocarbon biodegradation of a chronically contaminated Antarctic soil. *Journal of Applied Microbiology*. 106 (2009) 1101–1110. ISSN 1364-5072.

Ryan J., Loehr R. y Rucker R., 1991. Biorremediation of Organic contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*, 28: 159-169.

Santamaría O. D.M. La formación del petróleo en el golfo de México, 2008. Disponible en: <http://www.ai.org.mx/archivos/coloquios/5/La%20Formacion%20del%20Petroleo%20en%20el%20Sur%20del%20Golfo%20de%20Mexico.pdf>

Santillan M., 2012. Suelos contaminados con hidrocarburos, riesgo para la salud humana. UNAM. DGDC. Disponible en: [http://ciencia.unam.mx/leer/107/Suelos\\_contaminados\\_con\\_hidrocarburos\\_riesgo\\_para\\_la\\_salud\\_humana](http://ciencia.unam.mx/leer/107/Suelos_contaminados_con_hidrocarburos_riesgo_para_la_salud_humana)

Saval S., 1998. Biorremediación: Alternativa para la limpieza de suelos y acuíferos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería y ciencias ambientales*. (34):6-9.

Seklemova, E., Pavlova, A., Kovacheva, K., 2001. Biostimulation-based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation* 12, 311–316.

SEMARNAT, 2003. Norma oficial mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación.

Sistema meteorológico Nacional. Reporte climatológico del periodo Octubre 2012-Febrero 2013. Disponible en: [http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=99&Itemid=78](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=99&Itemid=78)

Snelgrove J., 2010. Biopile Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon Contaminated Soils from a Sub-Arctic Site. Department of Civil Engineering and Applied Mechanics McGill University, Montreal.

Stainer R., Adelberg E. e Ingraham J., 1986. *Microbiología*. Editorial Reverté. S.A., Barcelona, España. 836 pag. ISBN 84-291-1867-5.

Stevenson F. 1994. *Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions*. John Wiley and Sons, New York.

Straube W., Nestler C., Hansen L., Ringleberg D., Pritchard P. and Meehan J. 2003. emediation of Polyaromatic Hydrocarbons (PAHs) through Landfarming with Biostimulation and Bioaugmentation. *Acta Biotechnologica*. 23(2-3):179–196.

Torres R. y Castro J., 2003. Analisis y simulación de Procesos de refinación del petróleo. 1<sup>a</sup> ed. ALFAOMEGA GRUPO EDITOR S.A. de C.V. México D. F. ISBN: 970-15-0836-2.

Tortora G., Funke B., y Case Ch., 1993. Introducción a la microbiología. Ed. ACRIBIA S.A. ZARAGOZA (España). ISBN 84-200-0735-8.

U.S. EPA, 1996. Method 3550 B Ultrasonic Extraction. US Environmental Protection Agency. Washington D. C.

USDA (United States Department of Agriculture), 1999. Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo.

Valderrama B., Téllez J., 2002. Microbios. UNAM. ISBN 968-36-8879-9. Disponibles en:

[<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>]

Valencia C., 2010. Enzimas. Disponible en:

[http://www.biologia.arizona.edu/biochemistry/problem\\_sets/energy\\_enzymes\\_catalysis/energy\\_enzymes\\_catalysis.html](http://www.biologia.arizona.edu/biochemistry/problem_sets/energy_enzymes_catalysis/energy_enzymes_catalysis.html)

Van Deuren, J., Lloyd T., Chetry S., Liou R. y Peck J., 2002. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide, 4th Edition. Technology Innovation Office, EPA Platinum International.

Vásquez M., Figueroa J. y Quintero A. 2010. Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. Revista Colombiana de Biotecnología. 12(1): 141-157.

Velasco N, 2004. “Efecto de pretratamientos fisicoquímicos en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un suelo intemperizado, por composteo”. Tesis maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F.

Venosa A., Stephen J., Macnaughton S., Chang Y., White D.C., 1999. *Microbial Population Changes during Bioremediation of an Experimental Oil Spill*. Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada, 1999.

Venosa, A., Suidan M., Wrenn B., Strohmeier K., Haines J., Eberhart B., King D. y Holder E., 1996. *Bioremediation of an experimental oil spill on the shoreline of Delaware bay*. Environ. Sci. Technol 30:1764-1775.

Viñas M., 2005. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica. Tesis de grado. Barcelona.

Voet D. y Voet J. G., 1995. *Biochemistry*. John Wiley and sons, Inc 667-669 pp. Torres K., 2009. *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. Tesis de grado. Colombia.

Windevoxhel R., Sánchez N., Bastardo H. y Malaverb N., 2011. Bioaugmentación y sustancias húmicas en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo. *Revista INGENIERÍA UC*. 18 (1): 23-27.

Xu J., 2012. *Bioremediation of Crude Oil Contaminated Soil by Petroleum-Degrading Active Bacteria, Introduction to Enhanced Oil Recovery (EOR) Processes and Bioremediation of Oil-Contaminated Sites*, Dr. Laura Romero-Zerón (Ed.), ISBN: 978-953-51-0629-6.

Yudono B., Said M., Hakstege P., Suryadi F., 2009. Kinetics of Indigenous Isolated Bacteria *Bacillus mycoides* Used for Ex-Situ Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil in PT Pertamina Sungai Lilin South Sumatera. *Journal of Sustainable Development*. 2 (3); 64-71.

Zanaroli G., Toro S., Todaro D., Varese G., Bertolotto A., Fava F., 2010. Characterization of two diesel fuel degrading microbial consortia enriched from a non acclimated, complex source of microorganisms. *Microbial Cell Factories*, 9:10