

Tesis de Maestría



UNIVERSIDAD VERACRUZANA

INSTITUTO DE INGENIERÍA

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE UN FERTILIZANTE Y PAJA DE
AVENA EN UN SISTEMA DE BIOPILAS PARA LA ELIMINACIÓN
DE DIESEL DE UN SUELO

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN INGENIERÍA AMBIENTAL

PRESENTA

MARÍA DEL CARMEN CUEVAS DÍAZ

H. VERACRUZ

SEPTIEMBRE 2001

Proyecto de Digitalización de Tesis
Responsable M.B. Alberto Pedro Lorandi Medina
Colaboradores: Estanislao Ferman Garcia
M.B. Enrique Rodríguez Magaña

Instituto de Ingeniería
Universidad Veracruzana



UNIVERSIDAD VERACRUZANA INSTITUTO DE INGENIERÍA

H. Veracruz, Ver., 31 de agosto del 2001
DI276/01

Al candidato al Grado:
Q. F. B. Ma. del Carmen Cuevas Díaz
Presente

En atención a su solicitud relativa, me es grato transcribir a usted a continuación el tema que aprobado por esta Dirección propuso la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez, para que lo desarrolle como tesis, para obtener el Grado de Maestra en Ingeniería Ambiental.

Tema:

"EFECTO DE LA ADICIÓN DE UN FERTILIZANTE Y PAJA DE AVENA EN UN SISTEMA DE BIOPILAS PARA LA ELIMINACIÓN DE DIESEL DE UN SUELO"

1. Introducción
 2. Objetivos
 3. Hipótesis
 4. Generalidades
 5. Material y métodos
 6. Análisis de resultados
 7. Costos estimados del tratamiento
- Conclusiones
Recomendaciones y aportaciones
Referencias bibliográficas
Anexos

Sin otro particular, me es grato reiterarle la seguridad de mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente
"Lis de Veracruz: Arte, Ciencia, Luz"

Dr. Bonifacio C. A. Peña Pardo
Director

Tesis de Maestría

AGRADECIMIENTOS PARA:

Mi esposo Mario, mis hijos Lilia Andrea y Mario Jesús
por su cariño, comprensión y paciencia durante esta
etapa de nuestra vida.

A mis padres, hermana y tías por estar siempre conmigo.



Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por sus enseñanzas, apoyo,
confianza y amistad.

Dra. Asunción Usón M. por sus acertados
consejos y valiosa ayuda.

Tesis de Maestría

Mi jurado por sus recomendaciones y entusiasmo:

M en I. Gloria Inés González López

M.I. María Estela Montes Carmona

M.C. Bernardo Hernández Bernal

Lolís, Alex, Manuel, Graciela, Tere, Betty, Ania, Claudia y Alfredo por su gran disponibilidad, cooperación y alegre compañía.

Dr. Arnulfo Alboreo M. por las facilidades brindadas para mi preparación.

Mis amigos y compañeros de la Universidad Veracruzana y del CBTIS 85, así como autoridades, los cuales me alentaron en la conclusión de mis estudios.

ÍNDICE

	PÁGINA
ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE GRÁFICAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ABSTRACT	VII
RESUMEN	vIII
1 INTRODUCCIÓN	1
2 OBJETIVOS	3
3 HIPÓTESIS	4
4 GENERALIDADES	
4.1 Contaminación del suelo y tecnologías de tratamiento	5
4.2 Biorremediación	7
4.2.1 Biorrecuperación por vía sólida	8
4.2.2 Bioestimulación	11
4.3 Composición del diesel	12
4.3.1 Toxicidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos	13
4.4 Metabolismo de degradación de hidrocarburos	13
4.4.1 Degradación de alcanos y alicíclicos	13
4.4.2 Degradación de hidrocarburos aromáticos	14



Tesis de Maestría

4.4.3	Degradación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA's)	15
4.4.4	Factores físicos y químicos que afectan la degradación de hidrocarburos	18
4.5	Fertilizantes y nutrientes	21
4.5.1	Fertilizantes nitrogenados	22
4.5.2	Nitrógeno del suelo	22
4.5.3	Fertilizantes fosforados	23
4.5.4	Fósforo en el suelo	24
5	MATERIAL Y MÉTODOS	
5.0	Estrategia de trabajo	26
5.1	Caracterización del sitio	27
5.1.1	Ubicación del sitio contaminado	27
5.1.2	Toma de muestra del suelo	31
5.2	Caracterización fisicoquímica del suelo	32
5.3	Caracterización microbiológica del suelo	33
5.3.1	Bacterias totales en suelo	33
5.3.2	Hongos totales en suelo	34
5.3.3	Actinomicetos totales en suelo	34
5.4	Extracción con solventes y determinación de hidrocarburos	34
5.4.1	Extracción	34
5.4.2	Fraccionamiento	34
5.4.3	Determinación con espectrometría ultravioleta	34
5.5	Prueba de tratabilidad(diseño experimental)	36

Tesis de Maestría

5.5.1	Humedad empleada	38
5.5.2	Determinación de dióxido de carbono	38
5.5.3	Fertilizante empleado en la prueba de tratabilidad	39
5.6	Control abiótico	39
5.7	Tratamiento del suelo contaminado	39
5.7.1	Tratamiento	39
5.7.2	Seguimiento del tratamiento	41
6	ANÁLISIS DE RESULTADOS	
6.1	Caracterización	43
6.2	Prueba de tratabilidad	47
6.3	Tratamiento por biopila	51
7.	COSTOS ESTIMADOS DEL TRATAMIENTO	
7.1	Caracterización del sitio	57
7.2	Equipo	59
7.3	Tratamiento	60
	CONCLUSIONES	63
	RECOMENDACIONES Y APORTACIONES	64
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXOS	



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No 4.1 Esquema de biopila estática y reactor cerrado	11
Figura No 4.2 Degradación del benceno por vía meta y orto	16
Figura No 4.3 Mecanismo propuesto para la degradación de naftaleno	17
Figura No 5.1 Actividades a realizar para saneamiento del suelo	26
Figura No 5.2 Plano de la ciudad de Coatzacoalcos, Ver.	28
Figura No 5.3 Plano de localización de área contaminada	29
Figura No 5.4 Esquema del área en que se realizó el derrame	30
Figura No 5.5 Área contaminada con diesel	30
Figura No 5.6 Dos de los puntos de muestreo a diferente profundidad en la zona de derrame	31
Figura No 5.7 Manto acuífero en uno de los puntos de muestreo	32
Figura No 5.8 Pruebas de tratabilidad a nivel de microcosmos	37
Figura No 5.9 Biopila instalada se encuentra cubierta con paja de avena	41
Figura No 5.10 Esquema de los puntos de toma de muestra en la biohilera	42

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica No 6.1 Degradación de HPA's en pruebas de tratabilidad	51
Gráfica No 6.2 Temperatura de la biopila durante el tratamiento	53

Tesis de Maestría

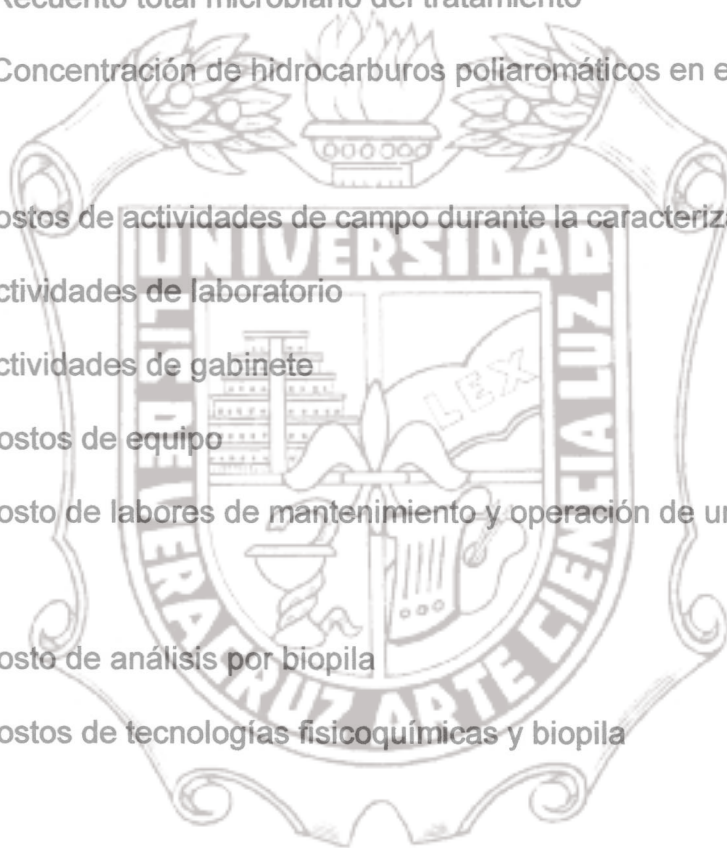
INDICE DE TABLAS

Tabla No 4.1 Diversas tecnologías de biorremediación	7
Tabla No 4.2 Relación carbono/nitrógeno de algunos texturizantes	9
Tabla No 4.3 Rango de abundancia de algunos compuestos químicos encontrados en diesel.	12
Tabla No 4.4 Composición de la célula microbiana	20
Tabla No 4.5 Fuentes de nitrógeno y fósforo	21
Tabla No 4.6 Solubilidad de ortofosfatos cálcicos	24
Tabla No 5.1 Ubicación geográfica de Coatzacoalcos	27
Tabla No 5.2 Principales compuestos aromáticos que conforman el petróleo	35
Tabla No 5.3 Composición de la solución stock	35
Tabla No 5.4 Experimentos totales	36
Tabla No 5.5 Cantidades de nitrógeno y de fósforo	37
Tabla No 5.6 Valores de C, N y P en paja y suelo contaminado	40
Tabla No 6.1 Resultados de la caracterización fisicoquímica de diciembre 1999	45
Tabla No 6.2 Resultados fisicoquímicos del punto 1 a diferentes profundidades	46
Tabla No 6.3 Resultados fisicoquímicos del punto 2	46
Tabla No 6.4 Resultado fisicoquímicos del punto 3	47
Tabla No 6.5 Recuento total de bacterias, hongos y actinomicetos	47
Tabla No 6.6 Producción de dióxido de carbono en mgCO ₂ /MSI	48



Tesis de Maestría

Tabla No 6.7 Datos de la curva de calibración para HPA's	48
Tabla No 6.8 Resultados de HPA's en pruebas de tratabilidad	49
Tabla No 6.9 Reducción de hidrocarburo en pruebas de tratabilidad	50
Tabla No 6.10 Temperatura de la biopila durante el tratamiento	52
Tabla No 6.11 Resultados fisicoquímicos del tratamiento	54
Tabla No 6.12 Recuento total microbiano del tratamiento	54
Tabla No 6.13 Concentración de hidrocarburos poliaromáticos en el tratamiento	56
Tabla No 7.1 Costos de actividades de campo durante la caracterización	57
Tabla No 7.2 Actividades de laboratorio	58
Tabla No 7.3 Actividades de gabinete	59
Tabla No 7.4 Costos de equipo	60
Tabla No 7.5 Costo de labores de mantenimiento y operación de una biopila	61
Tabla No 7.6 Costo de análisis por biopila	61
Tabla No 7.7 Costos de tecnologías fisicoquímicas y biopila	60



ABSTRACT

Cuevas-Díaz, Ma.C. "Effect of addition of fertilizer and straw in a biopile system for the removal of diesel from soil". Thesis of Master Degree in Environmental Engineer, Universidad Veracruzana. Advisory: PhD. Refugio Rodríguez Vázquez.

The recovery of polluted contaminated soils with hydrocarbons, are carried out by physical, chemical or biological methods. In the present investigation a method was used through the addition of nutrients and using straw as texturizer to remove the hydrocarbons from polluted contaminated soil. Special interest was on PAH removal.

The study was carried out in three stages; soil characterization, treatability tests at microcosmos level and soil treatment in the biopiles. The characterization of the soil allowed to determine the nitrogen concentration and hydrocarbon content in the treatability test. The culture conditions; moisture content and C/N/P relationship enhanced the PAH removal in the biopile system determined a contribution of the microflora of the sugarcane and soil in the levels (+1, +1, 0) with PAH removal of 54%. The spectrometry ultraviolet is used of quantification HPA's. The statistical study it demonstrated the humidity was not significant, but the nitrogen and the phosphorous were significant ($\alpha = 0.05$).

A system biopile was installed. During the treatment a higher nitrogen than phosphorous content was used. The hydrocarbon degradation was carried out in 15 days, obtaining an hydrocarbon removal of 73%.

Instituto de Ingeniería
Universidad Veracruzana

RESUMEN

Cuevas-Díaz, Ma.C. "Efecto de la adición de un fertilizante y paja de avena en un sistema de biopilas para la eliminación de diesel de un suelo". Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental, Universidad Veracruzana. Asesor: Dra. Refugio Rodríguez Vázquez.

La recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos se puede realizar por métodos físicos, químicos o biológicos. En la presente investigación se empleó un método biológico a través de un sistema de pilas con adición de nutrientes y texturizante para la remoción de los hidrocarburos de un suelo contaminado con diesel; especial interés se tuvo en los hidrocarburos polinucleo aromáticos (HPA).

El estudio se realizó en tres etapas: caracterización del suelo, pruebas de tratabilidad a nivel de microcosmos y tratamiento del suelo en una biopila. La caracterización del suelo permitió determinar la concentración de nitrógeno, fósforo e hidrocarburos. En las pruebas de tratabilidad se establecieron las condiciones de humedad, relación C/N/P que permitieran la remoción de HPA's mediante biopilas, para lo cual se utilizó bagazo de caña. Se realizó un diseño de Box-Beheneken en donde se utilizaron tres variables (N, P y humedad) con tres niveles (alto +1, medio 0, bajo -1), y se cuantificó como variable de respuesta la cantidad de HPA por espectrofotometría ultravioleta.

Se determinó una contribución de la microflora del bagazo de caña y suelo en los niveles (+1, +1, 0), con un porcentaje de remoción de 54% de HPA. Se realizó un control abiótico siendo menor el porcentaje de degradación. El estudio estadístico demostró que la humedad no era significativa, pero si la adición del nitrógeno y el fósforo ($\alpha = 0.05$).

Se instaló en campo una pila. Los resultados de nitrógeno y fósforo indicaron que se ocupó mayor proporción del primero que del segundo durante el tratamiento. La degradación del hidrocarburo se llevó a cabo en 15 días, lográndose una remoción de 73%.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del suelo y cuerpos de agua por hidrocarburos es uno de los problemas ambientales más serios que enfrenta la humanidad (Saval, 1997). Esta contaminación puede ser antropogénica o natural. La contaminación antropogénica es la ocasionada por el hombre como resultado de sus procesos industriales, como emisiones, derrames accidentales, fugas y descargas de efluentes y residuos. La contaminación natural del suelo se presenta como consecuencia de fenómenos naturales como: inundaciones, derrumbes o por procesos de mineralización que determinan la composición natural de los suelos (Fernández y Col., 1998).

En México las principales fuentes que han contribuido a la contaminación de suelos y mantos acuíferos son: industria petrolera, petroquímica e instalaciones auxiliares, red de gasolineras, tiraderos de desechos industriales, rellenos sanitarios de desechos sólidos municipales y de desechos industriales mal diseñados (Poggi-Varaldo y Ríos, 1997).

Entre los compuestos que han contaminado suelos y acuíferos se encuentran los clorofenoles como bifenilos policlorados (EPA, 1994). Estos compuestos son tóxicos, lipofílicos, mutagénicos y persistentes (Chaudhry y Chapalmadugu, 1991).

Otros compuestos son los hidrocarburos aromáticos monocíclicos como el caso de la gasolina, que tiene una cantidad considerable de benceno, etilbenceno, tolueno, xileno, trimetilbenceno, y otros derivados del benceno. El benceno y otros hidrocarburos se emplean en la preparación de colorantes, resinas, poliuretanos, aislantes, telas y otros compuestos.

Algunos de los compuestos mencionados más tóxicos son los hidrocarburos aromáticos polinucleares (HPA's). Éstos son el resultado de la combustión incompleta de materiales orgánicos; muchos de ellos se asocian a procesos de refinación del petróleo. Otras actividades generadoras de estos compuestos son: producción de disolventes, fungicidas, plásticos (Rodríguez, 1997).

La presencia de contaminantes orgánicos en suelo y mantos acuíferos, hizo necesario el saneamiento de los mismos. De allí a que en los países del primer mundo se han saneado suelos y acuíferos con métodos físicos y químicos como incineración, desorción térmica seguida de combustión, adsorción con carbón activado. (Rodríguez, 1997). Estos procedimientos son caros, transportan el contaminante de un sitio a otro y puede existir generación de sustancias y productos peligrosos.

Tesis de Maestría

Actualmente se considera a la biorremediación como una de las tecnologías más adecuadas para el saneamiento de acuíferos y suelo contaminados con hidrocarburos por su bajo costo y eficacia (Saval, 1997).

En la ciudad de Coatzacoalcos se tiene una zona contaminada con diesel, el suelo arenoso permite la infiltración rápida del contaminante hacia el manto acuífero, encontrándose éste último a escasos 2 m de la superficie. De aquí la necesidad de transferir este suelo a otra área para su posible tratamiento *ex situ*. Por lo que en este trabajo se realizará el saneamiento de un suelo contaminado con diesel, utilizando el cultivo sólido por biopilas y combinando este método con un proceso de bioestimulación. Se estimulará a los microorganismos del suelo y de un texturizante mediante el ajuste de nutrientes, con la adición de un fertilizante.



CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

Objetivo general

Remover diesel de un suelo contaminado mediante un sistema de cultivo sólido por biopilas, a través del ajuste de nutrientes (C/N/P) para estimular la microflora de un texturizante y del suelo.

Objetivos específicos

- 1.- Desarrollar las pruebas de tratabilidad para la remoción de diesel en microcosmos.
- 2.- Determinar el efecto de un fertilizante y la adición de un texturizante de acuerdo a la relación C/N/P, para la remediación del suelo contaminado con diesel.
- 3.- Realizar la remoción de diesel en un sistema de cultivo sólido por biopilas, con la adición de paja de avena en baja concentración y nutrientes.



CAPÍTULO 3. HIPÓTESIS

El ajuste de la relación C/N/P con un fertilizante propiciará la estimulación microbiana del suelo contaminado y del texturizante agregado, logrando la remoción de diesel del suelo, en un sistema de cultivo sólido.



CAPÍTULO 4. GENERALIDADES

4.1 Contaminación del suelo y tecnologías de tratamiento

Desde el comienzo del siglo XX, cerca de 10 millones de compuestos químicos han sido sintetizados, aproximadamente uno por ciento de estos compuestos orgánicos e inorgánicos son producidos comercialmente. Se estima una producción mundial de desechos peligrosos de 338 millones de toneladas, de estas 275 millones son producidos únicamente en Estados Unidos (OECD, 1991).

Todos los compuestos químicos son tóxicos en algún grado, en las últimas dos décadas se ha incrementado el interés por el efecto de los contaminantes en la salud, específicamente en las enfermedades crónicas: afecciones de nacimiento, cáncer, problemas genéticos y desordenes neurológicos.

La USEPA identificó, en los EU, 32 000 sitios potencialmente peligrosos, de los cuales 1200 requieren remediación inmediata (Schweitzer, 1991). En Europa, se han localizado 4 000 sitios que presentan problemas en Holanda; 3 200 en Dinamarca y unos 50 000 en Alemania; el costo de la remediación se estima en 30 mil millones de dólares para Alemania y 100 mil millones de dólares para los E.U. (OECD, 1991).

La contaminación de suelos y aguas con compuestos derivados de la actividad petrolera, se ha convertido en un problema en gran número de sitios de explotación, refinación y almacenamiento de hidrocarburos a escala general. El consumo mundial anual de petróleo se estima en 24 mil millones de barriles al año (3.6×10^{12} l) (Energy Information Administration US, 1991; PEMEX, 1997). El National Research Council (1985) estima que 24 millones de barriles (3.6×10^9 l) se derraman anualmente en el mar, que representan aproximadamente el 0.1% del consumo mundial por año. Se considera que una cantidad similar se derrama en suelos y acuíferos en los continentes. En nuestro país el petróleo crudo y sus derivados son los contaminantes más comunes, los cuales están catalogados como residuos peligrosos.

En México no se cuenta con datos precisos de lugares afectados por contaminantes y es muy probable que no se tenga una idea real del gran impacto al medio por residuos peligrosos y en especial por hidrocarburos. Las instalaciones de diversas industrias específicamente de la industria petrolera, ocupa una superficie de 4 000 has de las cuales se señala están contaminadas 1 020 has (25%). Sin embargo, puede estar subestimada. Otros indicativos del impacto de los hidrocarburos en el medio ambiente nacional son: la existencia de 4 663 pozos en explotación, con sus respectivas fosas de residuos de perforación;

339 campos de producción; 158 plataformas marinas, 6 refinerías, 10 complejos petroquímicos, 61 plantas petroquímicas, 79 plantas de almacenamiento y agencias de ventas (PEMEX, 1998); así como mas de 12 000 km de ductos (PEMEX, 1997). Por otra parte, las tomas clandestinas y fugas en tanques contaminan las zonas agrícolas.

La gran problemática que representan los sitios contaminados, la necesidad de recuperarlos y la falta de tecnologías adaptadas a nuestros suelos, que sean técnica y factiblemente adecuados ocasiona que se tenga un gran interés en los siguientes aspectos:

- Desarrollar e innovar tecnologías de remediación.
- Realizar diagnósticos y seguimiento del tratamiento de suelos contaminados.
- Selección de tecnologías de remediación.
- Estandarización de métodos analíticos.
- Establecimiento de normas de suelos contaminados con hidrocarburos.
- Implantar sistemas analíticos y biológicos del seguimiento de sitios contaminados.

Todo lo anterior con el fin de contar con los elementos adecuados para la recuperación de suelos agrícolas y/o tropicales, de una manera más eficiente y económica (Rodríguez, 2001; La Grega y Col., 1998; Heitzer y Sayler, 1993).

La necesidad de remediar los sitios dañados por la contaminación ha estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías físicas, químicas y biológicas. Muchas de las tecnologías fisicoquímicas no eliminan el contaminante. Debido a esta limitante y al costo elevado de algunos procesos se están desarrollando y aplicando métodos innovadores de remediación *in-situ* y *ex-situ*.

Sin embargo, en función de la composición y concentración del contaminante, es necesario el tratamiento o pretratamiento por métodos fisicoquímicos. Entre la tecnologías tradicionales se encuentran las térmicas: extracción por vapor, incineración, vitrificación y desorción térmica; como tecnologías innovadoras se clasifica a la separación eléctrica, plasma, extracción con solventes, lavado de suelos, extracción ácida y tratamiento químico.

Antes de 1988 la EPA seleccionó principalmente el confinamiento y disposición de contaminantes, utilizando de forma marginal el tratamiento; a partir del mismo año el panorama cambio totalmente, tratando cerca del 70 % de los casos. Los costos son más accesibles en el caso de tecnologías establecidas, principalmente en la incineración y la solidificación/estabilización (Fielder y Quander J., 1996). Varios procesos estándares de tratamiento (no biológicos), usados para la descontaminación de suelos y aguas subterráneas, se han limitado en su aplicación, debido a su elevado costo y su parcial efectividad.

Los métodos tradicionales de tratamiento de suelos y aguas subterráneas se han enfocado principalmente a la remoción o confinamiento. Este tipo de tecnologías han sido parcialmente efectivas en el 54% de los casos y totalmente exitosa únicamente en el 16% de ellos. Los tratamientos no biológico o fisicoquímicos incluyen: almacenamiento a largo plazo (confinamiento), los vertederos, la incineración y el arrastre por vapor. Presentan entre otras las siguientes desventajas: costos elevados, rechazo público y posible liberación de tóxicos al medio.

4.2 Biorremediación

La biodegradación de los hidrocarburos por la flora microbiana nativa del suelo, es uno de los mecanismos mediante el cual los contaminantes son eliminados del ambiente

Existen diversos tipos de tecnologías para llevar a cabo la biorremediación de un suelo contaminado, como la que se presenta en la tabla No 4.1.

Tabla No 4.1. Diversas tecnologías de biorremediación.

TECNOLOGIA	FUNCIONAMIENTO
Bioaumentación	Adición de microorganismos al sitio contaminado, debido a que la población autóctona carece de capacidad degradadora
Bioestimulación	Adición de estimulantes de la actividad microbiana autóctona como co-sustratos o aceptores de electrones para la degradación vía anóxica
Bioventeo	Es la introducción de oxígeno al suelo para estimular a la población aerobia.
Composteo	Se coloca el suelo contaminado sobre la superficie del terreno formando pilas que se cubren para crear condiciones termófilas, mezclándose continuamente para favorecer la aireación.
Biocultivo	Tratamiento en fase sólida, realizado en sitios de confinamiento para retener los lixiviados.
Biosorción	Uso de microorganismos para adsorber metales en ciertas condiciones, se aplica por lo general en fase líquida.

Fuente: Saval, B.S. 1997.

La biorremediación puede llevarse a cabo en el sitio contaminado (in situ) o fuera del sitio contaminado (ex situ). En el tratamiento in situ se tienen restricciones locales, regulaciones del estado, densidad poblacional u otras causas. Si esto ocurre, el residuo peligroso se lleva a otra parte para su tratamiento (ex situ). En ambos casos debe evitarse la actividad humana y de animales (Rodríguez y Col., 1998).

Antes de tratar de aplicar cualquier tecnología de biorremediación en un sitio, se debe determinar la factibilidad de ésta, tomando en cuenta las características químicas de los contaminantes y las características químicas, físicas y microbiológicas del lugar; así como el destino del uso de suelo.

La estimación de la masa total en cada fase (en suelo o disuelta), la característica química del medio y las características microbiológicas e hidrológicas del sitio, deben ser perfectamente definidas durante la investigación del sitio para asegurar que el sistema de tratamiento seleccionado comprenda las complejidades del sitio como la de los contaminantes. La información obtenida de la tratabilidad del sitio debe servir para identificar las últimas limitaciones del uso de la tecnología de biorremediación, las cuales están relacionadas al tiempo requerido de limpieza, el nivel de limpieza alcanzado y el costo de la misma.

El seguimiento de la biorremediación es complicado, debido a la dificultad que resulta ensamblar el balance de masa, la pérdida biótica y abiótica del contaminante y la determinación de la biomasa. Existen tres factores que se requieren determinar para saber si la biorremediación se está llevando a cabo:

- cuantificación de la pérdida del contaminante
- pruebas de laboratorio que prueben que la microflora tiene el potencial de degradar el contaminante en las condiciones existentes
- el potencial de degradación sea realizado en el campo.

El monitoreo molecular: análisis de ácidos nucleicos, fosfolípidos u otros marcadores biológicos, son una valiosa herramienta para determinar estos dos últimos puntos. Estos métodos permiten obtener información de la estructura de la comunidad microbiana y qué microorganismo o población son los responsables de la transformación del contaminante (Rodríguez y Col., 2001)

4.2.1 Biorrecuperación por vía sólida

El tratamiento por vía sólida es el proceso empleado para el tratamiento ex situ en condiciones no saturadas. Se puede dividir en dos métodos generales:

- Tratamiento en lechos o sobre el terreno
- Compostaje

El tratamiento en lechos consiste en la incorporación de residuos en la zona superficial del suelo. En este caso se aplican los residuos de manera controlada sobre el terreno, mezclándose con la capa superficial del suelo, utiliza los principios de la agricultura, por lo que también se le ha llamado cultivo agrícola (Doelle y Col., 1992).

Composteo

El compostaje es un proceso biológico aerobio en el que los compuestos contaminantes son degradados. Las materias peligrosas no se encuentran generalmente en concentraciones necesarias para mantener el sistema de compostaje, de aquí la necesidad de añadir al suelo contaminado materia orgánica en cantidades que permitan en la composta la generación de calor.

Para el compostaje de residuos sólidos y residuos peligrosos deben optimizarse temperatura, aireación, humedad y pH, adicionalmente, para el segundo caso se considera el agente texturizante y generador de calor.

El material empleado como fuente de calor debe tener un alto contenido de materia orgánica fácilmente biodegradable, siendo la biodegradación del material orgánico favorece el crecimiento de microorganismos, que incluyen especies que degradan a los contaminantes. Cuando se añade una fuente de calor se debe tener en cuenta el balance C: N, la que no debe sobrepasar una relación mayor de 20 o 25:1, ya que un residuo con un contenido bajo de nitrógeno pudiera no ser utilizado completamente por el microorganismo. En la tabla No 4.2 se indican algunas relaciones carbono nitrógeno (Eweis y Col., 1999).

Tabla No 4.2 Relación carbono/nitrógeno de algunos texturizantes

Residuos	C:N
Aserrín	200-500
Paja de trigo	128-150
Paja de avena	48
Estiércol de caballo	25
Estiércol de vaca	18
Vegetales no leguminosos	11-12

Fuente: Eweis y Col., 1999

La adición de un agente esponjante previene la compactación del suelo, incrementando la porosidad y accesibilidad de oxígeno. Los agentes esponjantes más comunes son: paja, hierba seca, cascarilla de arroz, virutas y material inerte sintético.

Existen tres sistemas de compostaje:

- a) Hileras
- b) Pilas estáticas y
- c) Reactores cerrados

a) Las hileras se diferencian de las pilas en su forma de aireación, en la primera se airea la pila volteando la mezcla de composta, manual o mecánicamente, se puede dar vuelta una o dos veces por semana e incluso diariamente. El volteo airea la mezcla liberando el exceso de calor e incrementa también la liberación de los compuestos orgánicos volátiles. En el método de hileras el ancho de la pila se sitúa normalmente entre 3 y 4 m, mientras que la altura puede llegar a 1.2 a 1.5 m (Cookson, 1995). Algunas hileras pueden llegar a 6 m de ancho (Biocycle, 1995).

El material se puede mezclar antes de formar la pila o hilera o puede distribuirse en capas. La frecuencia del volteo depende del objetivo, así puede hacerse el volteo para airear la pila y/o disipar el calor y reducir la temperatura, teniendo como ventaja la mezcla de los contaminante con el texturizante, lo que mejora la distribución y aumenta la bioaccesibilidad.

El compostaje en hileras se lleva a cabo en entornos abiertos utilizándose coberturas para mantener la temperatura en el interior de la pila, minimizar la erosión del viento y prevenir la saturación originada por la lluvia. Como cobertura se utiliza material sintético como polietileno de alta densidad o una capa de materia orgánica como virutas. (Eweis y Col., 1999).

b) En la pila estática se utiliza la aireación forzada a través de un sistema de tubos perforados extendidos por la base de la pila. En la figura No 4.1 se presenta un suelo tratado por el método de pila estática.

c) En el reactor cerrado la mezcla y aireación se realiza a través de volteo y aireación forzada. El proceso se puede optimizar para completarse en tres días, ver figura No 4.1.

El método de hileras por ser el más sencillo, accesible y económico será el utilizado en el presente trabajo.

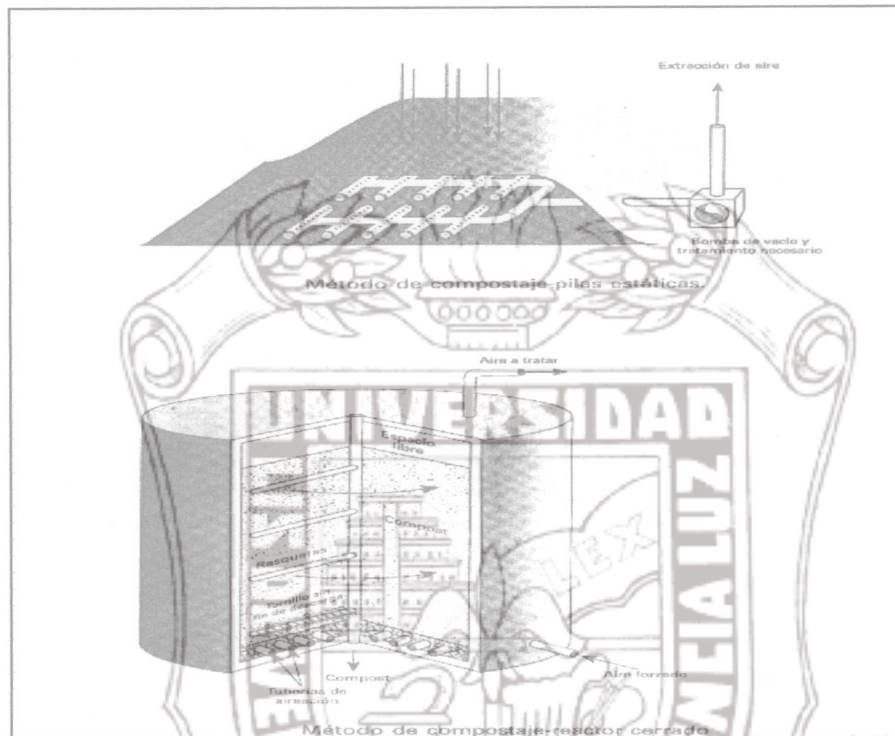


Figura No 4.1. Esquema de biopila estática y reactor cerrado

4.2.2 Bioestimulación

Se considera a la bioestimulación como la modificación ambiental capaz de suprimir algún factor limitante que pueda suprimir la velocidad del crecimiento microbiano y el metabolismo de la sustancia contaminante. Un requisito es, que el contaminante no sea recalcitrante, o sea, que resiste la biodegradación. Los factores que se controlan para estimular la actividad degradadora del microorganismo son: concentración de nutrientes, generalmente fósforo y nitrógeno, concentración de oxígeno molecular, potencial redox y humedad (Atlas y Bartha, 1997).

4.3 Composición del diesel

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos alifáticos, aromáticos y algunos compuestos heterocíclicos, denominados hidrocarburos totales del petróleo (HTP). El diesel tiene una composición cuyo rango es de C₁₀ a C₁₉. La composición del diesel varía ampliamente dependiendo del método de refinación, así como del tipo de mezcla de la cual proviene.

El diesel presenta cantidades similares al de la gasolina de alcanos como hexano, heptano y octano, pero por su gran peso, posee en abundancia cadenas grandes que incluyen heptadecano, octadecano, pristano (2,6,10,14-tetrametilpentadecano) y fitano (2,6,10,14-tetrametilhexadecano).

El diesel contiene hidrocarburos poliaromáticos nucleares también conocidos como hidrocarburos policíclicos aromaticos (HPA's) potencialmente más tóxicos que la gasolina. En ambos se encuentran compuestos como naftaleno, 2-metilnaftaleno y benzopireno, pero, además el diesel contiene cryseno, fenantreno, benzoantraceno y pireno como se muestra en la tabla No 4.3.

Tabla No 4.3. Rango de abundancia de algunos compuestos químicos encontrados en diesel.

Componente	Abundancia máxima (mg/l)	Abundancia mínima (mg/l)
Benceno	82	6
Tolueno	800	100
Etilbenceno	800	100
Xileno (total)	800	100
Naftaleno	2 730	2 730
2-metilnaftaleno	6 700	6 700
Benzopireno	0.6	0.006
Benzoantraceno	1.2	0.001
Criseno	2.2	2.2
Fluoranteno	37	No determinado (ND)
Fenantreno	1 500	1 500
Pireno	41	41
Trifenileno	2.2	2.2
Cresol	54.3	54.3
Fenol	6.8	6.8
Quinolina	9.2	9.2

Fuente:(Stelljes y Watkin, 1993)

Se considera a los hidrocarburos poliaromáticos o policíclicos (HPA's) formados por dos hasta cinco anillos dispuestos en diferentes arreglos. Presentan altos puntos de fusión y ebullición, baja solubilidad en agua y baja presión de vapor.

4.3.1 Toxicidad de los HPA.

Son considerados como compuestos químicos indicadores de toxicidad que afectan la salud, por lo que son utilizados como criterio de limpieza para suelos contaminados con diesel.

Los HPA's clasificados como cancerígenos son: benzo(a)pireno, dibenzo(a)antraceno, metilcolantreno y dibenzo(a)antracina, los dos primeros se encuentran como componentes del diesel. Algunas sustancias cancerígenas intervienen en más de una fase del proceso cancerígeno, así, el benzopireno actúa como un iniciador o como un activador en dicho proceso. (LaGrega, M. 1998).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos persisten en el medio acuático. Dada la naturaleza hidrofóbica de los HPA's fácilmente se asocian a la materia particulada y se distribuyen a capas sedimentarias o a los tejidos. Se considera que la capacidad tóxica para organismos acuáticos es de 0.2 a 10 mg/l, aumentando conforme aumenta el peso molecular, sin embargo, los HPA's mayores que el benzopireno no se considera tóxicos para organismos acuáticos porque su solubilidad es menor que la concentración requerida para producir una respuesta tóxica (Neff, J.M. 1985. En La Grega 1998).

4.4 **Metabolismo de degradación de hidrocarburos**

La biorremediación para hidrocarburos alifáticos, aromáticos y aromáticos polinucleares puede funcionar a través de los metabolismos aerobio y anaerobio de los microorganismos.

4.4.1 Degradación de alcanos y de alicíclicos

El primer paso en la degradación de los alcanos es la incorporación del oxígeno en el hidrocarburo, funcionando dos enzimas oxigenasas: la monooxigenasa y la dioxigenasasa (Wackett y Col., 1989).

Existen diversos mecanismos conocidos para la degradación aerobia. 1) El mecanismo más común para la degradación es la oxidación del grupo metilo terminal. El alcano se oxida a alcohol y posteriormente a ácido graso, pasando

antes por una etapa intermedia de aldehído. La oxidación continua por remoción de dos átomos de carbono, presentándose la beta oxidación (Britton, 1984). En el caso de alcanos muy grandes, se forma un alcohol secundario, es transformado en cetona y posteriormente en éster, produciéndose la ruptura del éster para producir un alcohol primario y un ácido, el alcohol se oxida a ácido y después tiene lugar la β - oxidación.

Las cadenas cortas de hidrocarburos son difíciles de degradar, excepto el metano que es una fuente de carbono de los microorganismos metanótrofos. Otros alcanos de cadena corta requieren de cometabolismo. Se ha demostrado la degradación a través de cometabolismo para etano, propano y butano (Horvath, 1972).

La degradación de alquenos es más variada, el ataque de los microorganismos puede ocurrir sobre el grupo metilo o sobre el doble enlace. El resultado del metabolismo produce como intermediarios alcoholes insaturados y ácidos grasos, alcoholes primarios o secundarios, metilcetonas, 1,2-epóxidos, y 1,2-dioles. Se considera como mejor forma de degradación la oxidación del grupo metilo (Britton, 1984). Los alcanos ramificados son más resistentes a la degradación microbiana, sin embargo, algunos microorganismos son capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía.

Los compuestos alicíclicos pueden ser degradados, pero los microorganismos que los metabolizan no son predominantes en el suelo.

4.4.2 Degradación de hidrocarburos aromáticos

La degradación de los hidrocarburos aromáticos por microorganismos depende del número de anillos en la estructura, número de sustituyentes, así como tipo y posición de sustituyentes, y la naturaleza de los átomos para los compuestos heterocíclicos.

La degradación de los compuestos aromáticos puede presentarse en dos formas:

1.-El básico en el cual se oxida el anillo a dihidrodiol, dando lugar al catecol, el cual es el intermediario común durante la oxidación de muchos compuestos aromáticos. Este anillo sufre una oxidación y ruptura para transformarse en un aldehído o en un ácido, como se observa en la figura No 4.2. Estos compuestos que se oxidan fácilmente generan electrones, los cuales son aceptados por nicotinamin adenin dinucleótido (NAD). (Gibson y Subramanian, 1984).

2.- El segundo mecanismo es la oxidación de compuestos aromáticos con grupos alquilo como sustituyentes. La oxidación del grupo alquilo forma ácidos carboxílicos aromáticos, los cuales son oxidados a compuestos dihidroxilados con

ruptura del anillo, hasta su degradación a través del paso conocido como beta cetoalípico o meta fisión. Cuando los sustituyentes de los anillos aromáticos difieren en tamaño, los microorganismos prefieren degradar a los de menor tamaño. De manera general, los compuestos aromáticos son menos degradables entre más grande sea la cadena alquílca (Arvin y Col., 1988).

4.4.3 Degradación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA's)

La degradación de los hidrocarburos poliaromáticos puede ser fácil o pueden ser resistentes, llegando incluso a la formación de productos intermedios carcinogénicos. Es difícil determinar su grado de degradación, ya que se encuentra influenciado por su estructura química, solubilidad y toxicidad. Bajo condiciones óptimas metabólicas, la degradación de algunos hidrocarburos poliaromáticos depende de la relación agua-suelo y el coeficiente de partición, ya que los HPA's son altamente hidrofóbicos.

Conforme aumenta el número de anillos fusionados, la degradación decrece, si existen grupos alquilo unidos a los anillos, la situación se complica y se hace difícil de predecir. La oxidación de PAH's de dos o tres anillos como naftaleno, antraceno y fenantreno involucra la formación de intermediarios como dihidroles. Se ha confirmado la degradación de fenantreno por bacterias como *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Beijerinckia* y la levadura *Cunninghamella* (Cookson, 1995).

La vía metabólica para la biodegradación del naftaleno se ha estudiado principalmente con las bacterias del género *Pseudomonas* dividiéndose en dos etapas:

- 1.- Transformación de naftaleno a salicilato
- 2.- Degradación de salicilato a través de catecol hasta los productos finales (ver figura No 4.3)

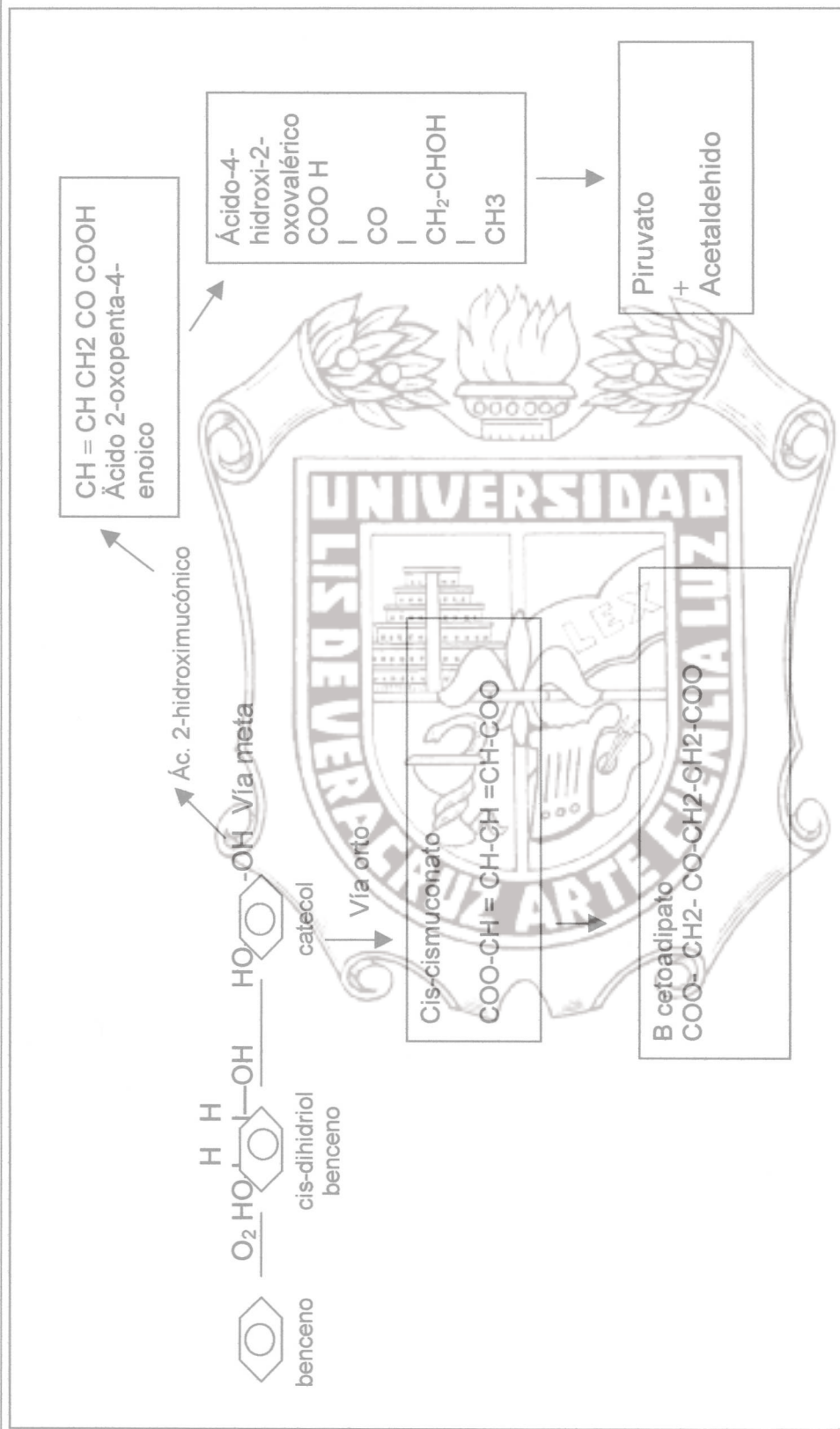


Figura No 4.2 Degradación del benceno por vía meta y vía orto (Gibson y Subramanian, 1984)



Figura No 4.3 Mecanismo propuesto para la degradación de naftaleno
(Gibson y Subramanian, 1984)

4.4.4 Factores físicos y químicos que afectan la biodegradación de hidrocarburos.

Se considera que los factores físicos y químicos que afectan la biodegradación de los hidrocarburos son: composición química, estado físico, concentración, temperatura, oxigenación (aireación), nutrientes, salinidad, presión, pH (Leahy y Colwell, 1990).

a) Composición química de hidrocarburos

Los hidrocarburos del petróleo se pueden clasificar en cuatro formas: saturados, aromáticos, asfaltenos (fenoles, ácidos, cetonas, ésteres y porfirinas) y resinas (piridinas, quinolinas, sulfóxidos, carbazoles y amidas), (Colwell y Walker, 1977).

Los hidrocarburos difieren en susceptibilidad al ataque microbiano. Cadenas cortas de hidrocarburos (menos de 10 átomos de carbono) son más difíciles de degradar y tienden a ser más tóxicas como resultado de su gran solubilidad. Se ha demostrado que el grado más alto de degradación es para los hidrocarburos saturados, seguido de los aromáticos ligeros con aromáticos de pesos moleculares altos y los compuestos polares, que presentan un grado bajo de degradación (Jobson y Col., 1972).

b) Estado físico y concentración

La concentración y el estado físico de los hidrocarburos del petróleo tienen un efecto grande sobre la biorremediación. En concentraciones bajas los hidrocarburos presentan cierta solubilidad en agua, sin embargo, en grandes concentraciones se excede el límite de solubilidad. El grado de esparcimiento del contaminante determina el área disponible para la acción microbiana. El grado de esparcimiento se reduce a bajas temperaturas por la viscosidad del petróleo. En el suelo, los hidrocarburos son absorbidos por las plantas, materia y partículas del suelo limitando su esparcimiento.

Wodzinsky y LaRocca (1977) encontraron que hidrocarburos aromáticos en estado líquido eran utilizados por las bacterias en la interfase hidrocarburo-agua, pero no se metabolizaba en estado sólido. Así el difenilmetano como líquido se degrada a 30°C, pero no en estado sólido a 20°C.

c) Temperatura

La temperatura influye en la degradación de petróleo por el efecto en su naturaleza física y composición química, en la actividad microbiana, así como en la composición de la flora microbiana.

La degradación generalmente disminuye cuando la temperatura disminuye, lo que se relaciona con la disminución de la actividad enzimática (Gibbs y Col., 1975). Cuando la temperatura aumenta, se incrementa la metabolización del hidrocarburo al máximo, generalmente en un rango de 30 a 40°C. (Klug y Markovetz, 1967).

d) Oxigenación

La oxidación es el paso inicial del catabolismo de hidrocarburos alifáticos, cíclicos y aromáticos, usando la enzima denominada oxigenasa, que requiere oxígeno. La disponibilidad de oxígeno en suelos depende del consumo microbiano, del tipo de suelo, si el suelo se encuentra inundado y la presencia de sustratos utilizables lo que puede llevar a una depleción de oxígeno (Bossert y Bartha, 1984). Las limitaciones de oxígeno se superan suministrando oxígeno en el sitio, a los microorganismos, o a colocando a los materiales contaminados en un biorreactor aerobio para poder realizar el suministro.

En suelos subsuperficiales no saturados, aerobios, la gran actividad biodegradadora de los hidrocarburos puede consumir el oxígeno antes de ser reemplazado por difusión, pero la subida y bajada del nivel freático facilita el intercambio de aire (Beraud y Col., 1989).

Otra técnica usada para airear el suelo es el arado de la tierra para voltear el suelo para obtener oxígeno atmosférico (Kincannon, 1972; COCCAW 1980 a; 1980 b en Eweis y Col. 1999).

e) Salinidad

Ward y Brock demostraron que el grado de metabolización de un hidrocarburo disminuye cuando se incrementa la salinidad en un rango de 3.3 a 28.4% disminuyendo de una manera general el metabolismo microbiano.

f) Humedad

Se considera que la humedad adecuada para la actividad microbiana es de 40 a 68% para sistemas aerobios. Suelo con humedad mayor de 70% reduce la transferencia de gases como oxígeno y disminuye de manera significativa la actividad microbiana (Cookson y Murray, 1990).

El contenido de humedad de los suelos afecta la disponibilidad del contaminante, la transferencia de gases, los niveles tóxicos de contaminantes, movimiento y desarrollo de microorganismos, así como la distribución de especies. Un nivel bajo de humedad restringe la actividad bacteriana, por limitar el movimiento celular y las reacciones metabólicas (Griffin, 1980).

g) pH

La determinación de pH proporciona información del ambiente químico del suelo. Un suelo con un pH de 6 a 7 se considera neutro, muy ácido de 4.5 y muy básico de 8. El pH del suelo se relaciona con la capacidad de intercambio iónico del mismo (Primo, 1981).

El pH afecta el comportamiento de las funciones celulares, transporte de la membrana celular y el equilibrio de reacciones catalizadas de los microorganismos. El crecimiento bacteriano se lleva a cabo en condiciones óptimas de pH neutros a ligeramente alcalinos. Para la oxidación de nitrógeno y la fermentación de metano el rango de pH es de 6 a 8.

La degradación de hidrocarburos se reporta como muy rápida en pH cercano a 7, a diferencia de valores de pH cercanos a 5 para hongos, como por ejemplo *Phanerochoete chrysosporium*, se encuentra con mucha actividad a pH de 4.5 (Rodríguez, 1999; Dhawale y Col., 1992).

h) Nutrientes

Los nutrientes de mayor importancia son: el nitrógeno y el fósforo. Algunos estudios realizados en aguas marinas y sedimentos han demostrado que la disponibilidad de nitrógeno y fósforo limita la degradación microbiana de hidrocarburos (Cooney y Col., 1985; Bergstein y Vestal, 1978). Sin embargo, si se realiza un ajuste de la relación de C/N/P, utilizando fertilizantes se estimula la biodegradación en petróleo y algunos otros hidrocarburos en agua de mar y en lagos (Atlas y Bartha, 1997, Olivieri y Col., 1976).

Los requerimientos microbianos de nutrientes son aproximadamente los mismos de su composición celular. Ver tabla No 4.4.

Tabla No 4.4. Composición de la célula microbiana

ELEMENTO	% PESO SECO	ELEMENTO	% PESO SECO
Carbono	50	Sodio	1
Oxígeno	20	Calcio	0,5
Nitrógeno	14	Magnesio	0,5
Hidrógeno	8	Cloruro	0,5
Fósforo	3	Fierro	0,2
Azufre	1	Otros	0,3
Potasio	1		

Fuente: Cookson, 1995

La estructura química de la bacteria puede expresarse como $C_5H_7O_2N$. El carbono proviene generalmente de compuestos orgánicos y en pocos casos de compuestos inorgánicos como carbonatos y bicarbonatos. El hidrógeno y el oxígeno son proporcionados por el agua. El nitrógeno, fósforo y azufre los obtienen de fuentes inorgánicas y orgánicas. Ver tabla No 4.5.

Tabla No 4.5. Fuentes de nitrógeno y fósforo

Sulfato de amonio	Fosfato de amonio
Fosfato disódico	Fosfato monosódico
Urea	Monofosfato potásico
Sales ortofosfóricas	Ácidos fosfóricos
Sales de polifosfatos	Pirofosfato
Tripolifosfato	Trimetafosfato

Fuente: Cookson, 1995

Cuando los elementos esenciales no están presentes en cantidades adecuadas, el desarrollo microbiano es limitado. Esta condición se establece en la ley de Liebig del mínimo: los constituyentes esenciales que están presentes en pequeñas cantidades para los requerimientos nutricionales del microorganismo pueden convertirse en un factor limitante de su desarrollo (Cookson, 1995).

4.5 Fertilizantes y nutrientes

Los fertilizantes son sustancias que fecundan la tierra, pueden utilizarse para aportar macro y micronutrientes. Son macronutrientes N, P, S, K, Ca o Mg, que junto con el C, O y H, son los elementos que se encuentran en mayor proporción en los vegetales. Los micronutrientes son Fe, Zn, Mn, Cu, B o Mo, por encontrarse en pequeñas proporciones y ser esenciales tanto para los vegetales como para los microorganismos del suelo (Primo, 1981)

En el caso de suelo, los fertilizantes, se han empleado para favorecer la degradación de petróleo o gasolina, fosfato urea, fertilizantes de N-P-K y sales de amonio y fosfato (Dibble y Bartha, 1979; Jobson y Col., 1972).

Estudios actuales, revelan que existen efectos degradativos de bifenilos policlorados manipulando la relación C/N/P y por adición de surfactante aniónico (Rojas y Col a,b, 1999).

Atlas y Bartha (1973), diseñaron un fertilizante que contiene urea parafinizada y octil fosfato, para favorecer la biodegradación bacteriana en agua contaminada

con petróleo. La característica de este fertilizante, es que puede permanecer en contacto con el petróleo en la interfase petróleo/agua.

Olivieri y Col. (1976) usaron un fertilizante de emisión lenta que contenía fosfato amónico magnésico con base de parafina, obteniendo después de 21 días de su uso, una degradación de 63% del petróleo.

En el derrame del Amoco Cádiz, en 1978, se desarrolló un fertilizante oleofílico comercial, llamado Inipol[®]EAP22, cuyo contenido es urea como fuente de nitrógeno, laurilfosfato como fuente de fósforo, y ácido oleico como fuente de carbono para incrementar la población de microorganismos degradadores de hidrocarburos (Sirvins y Angeles, 1986; LaDousse y Tramier, 1991. En Levin y Gealt, 1997).

4.5.1 Fertilizantes nitrogenados

Los fertilizantes nitrogenados son aquellos, como lo indica su nombre, que contienen nitrógeno. Se clasifican en:

- Nítricos, como el nitrato de sodio, nitrato de potasio y nitrato de calcio.
- Amoniacales, como el sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio y amoniaco libre.
- Nítricos y amoniacales, como el nitrato de amonio y nitrosulfato de amonio.
- Amídicos como la cianamida de calcio y la urea.
- Proteínicos, procedentes de materia orgánica vegetal o animal.

4.5.2 Nitrógeno en el suelo

La mayor parte del nitrógeno del suelo es orgánico, este nitrógeno orgánico sirve como un reservorio de nitrógeno. La conversión de nitrógeno orgánico a inorgánico se denomina mineralización. El proceso de mineralización consta de dos pasos: amonificación, en la que el nitrógeno se convierte a ion amonio, y nitrificación, en la que el ion amonio es oxidado a nitrato.

La amonificación es la producción de ion amonio por microorganismos del suelo y fauna. La amonificación se encuentra balanceada siempre por un paso opuesto que es la inmovilización de amonio por la biomasa del suelo a través de la asimilación. Siendo el factor de control entre la inmovilización y la amonificación la relación de C/N de la descomposición de la materia orgánica (Sylvia y Col. 1999).

Algunos estudios han demostrado que cuando la relación 20/1 C/N se adicionan a suelos, el resultado es la producción de amonio, si la relación aumenta, el nitrógeno inorgánico del suelo se inmoviliza. Esta relación se puede

calcular tomando como base la relación C/N de microorganismos heterotróficos y el coeficiente de producción, que es la cantidad de carbono convertido a biomasa microbiana (Anderson y Spencer, 1991. En Sylvia y Col., 1999).

La nitrificación se realiza en dos fases por bacterias aerobias. En la primera fase el ion amonio pasa a nitrito por acción de bacterias del género *Nitrosomonas* y, en la segunda los nitritos pasan a nitratos por la acción de *Nitrobacter*.

La reacción para convertir al ion amonio en nitrito se presenta en la ecuación 4.1:



Las *Nitrosomonas* son incapaces de cualquier otra forma de crecimiento, ya que dependen de la enzima monooxigenasa amonio y el amonio debe ser oxidado durante la degradación de compuestos orgánicos (Vanelli, 1991. En Sylvia y Col., 1999). Las *Nitrosomonas* son capaces de degradar cualquier compuesto orgánico incluyendo compuestos alifáticos halogenados, exceptuando tetracloroetileno y tetracloruro de carbono (Vanelli, 1991. En Sylvia y Col., 1999).

La oxidación de nitrito a nitrato requiere de un solo paso, como en la ecuación 4.2:



El nitrito es oxidado a nitrato por la enzima nitrito oxidoreductasa, la cual transfiere un oxígeno del agua y transfiere un par de electrones de la cadena para la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, como se presenta en la ecuación 4.3:



La reacción de nitrificación es importante, ya que crea una demanda significativa de oxígeno. Este oxígeno necesario debe ser considerado en cualquier sitio en donde se emplee la biorremediación (Vanelli, 1991. En Sylvia y Col. 1999).

4.5.3 Fertilizantes fosforados

El fósforo se suministra a los suelos como sales de los ácidos fosfóricos de diverso grado de deshidratación: ácido ortofosfórico, ácido metafosfórico, ácido pirofosfórico y ácido tripolifosfórico.

Los fertilizantes fosforados más usados son los ortofosfatos cálcicos y amónicos. Los ortofosfatos cálcicos son más solubles conforme son más ácidos, ver tabla No 4.6.

Tabla No 4.6. Solubilidad de ortofosfatos cálcicos.

Producto	Solubilidad en g/100ml de agua, a 25° C
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0.002
CaHPO_4	0.020
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.800

Fuente: Primo, 1981

Los fosfatos amónicos son muy solubles (30-70 g/100ml). Los metafosfatos, pirofosfatos y tripolifosfatos tienen propiedades secuestradoras (Primo, 1981).

Por sus aplicaciones nutritivas y eficacia en cosechas, los fertilizantes fosforados pueden clasificarse:

- Suelos ácidos: fosfato dicálcico > fosfato monocálcico y amónico > fosfato tricálcico
- Suelos básicos: fosfato monocálcico y amónico > bicálcico > tricálcico. (Primo, 1981).

Los fosfatos tienen poca movilidad en el suelo, por lo que es conveniente situarlos a cierta profundidad. El desplazamiento de los fosfatos solubles depende del poder de fijación del suelo y humedad existente. Los fosfatos menos solubles deben aplicarse finamente divididos y los más solubles de manera granulada, porque su cesión más lenta da más tiempo a su absorción y utilización (Primo, 1981).

4.5.4 Fósforo en el suelo

El fósforo es indispensable para todas las formas de vida, ya que es esencial en la formación de biomoléculas como DNA, fosfolípidos y ATP. La cantidad de fósforo presente en el suelo puede variar de 100 μg P/g hasta 1000 μg P/g (Stevenson, 1986).

El fósforo añadido con los fertilizantes se fija en el suelo en su mayor parte, siendo asimilado por plantas en forma de HPO_4^- y H_2PO_4^- , y ocupado por los microorganismos lentamente.

El ciclo del fósforo se divide en dos subciclos, biológico y geoquímico. En el subciclo biológico, el ortofosfato puede ser tomado por las plantas e inmobilizado

por los microorganismos. Los residuos de plantas y animales retornan al suelo y el fósforo orgánico puede ser incorporado como humus, mineralizado a ortofosfato o inmovilizado por la biomasa microbiana. La erosión y la cosecha son dos mecanismos mediante los que se pierde fósforo inorgánico (Walbridge, 1991. En Sylvia y Col. 1999).

En el subciclo geoquímico, el ortofosfato es solubilizado de minerales por reacciones químicas y bioquímicas. La disolución de estos compuestos en el suelo o la solubilización a través de microorganismos, produce ácidos orgánicos. Los ortofosfatos pueden adsorber óxidos de aluminio y hierro (fósforo inorgánico lábil) o precipitar como fosfatos de aluminio, hierro o calcio (Walbridge, 1991. En Sylvia y Col. 1999).



CAPÍTULO 5. MATERIALES Y METODOS

5.0 ESTRATEGIA DE TRABAJO

De acuerdo a las recomendaciones emitidas por la PROFEPA se realizó una caracterización del sitio, utilizándose los datos del INEGI para la edafología (1987 a.b, c). En relación al tratamiento se programó como se indica en la figura No 5.1.



Figura No 5.1 Actividades para realizar el saneamiento del suelo

5.1 Caracterización del suelo

La caracterización del suelo requiere de varias fases:

- Ubicación del sitio contaminado
- Toma de muestra del suelo contaminado
- Caracterización fisicoquímica del suelo
- Caracterización microbiológica
- Determinación de la concentración del diesel

5.1.1 Ubicación del sitio contaminado

La ubicación geográfica de la ciudad de Coatzacoalcos se encuentra en la tabla No.5.1. El área contaminada se encuentra localizada al noroeste de la ciudad, conforme a lo indicado en el plano de la ciudad de la figura No 5.2. El plano de localización del área se presenta en la figura No.5.3 .

Tabla No.5.1. Ubicación geográfica de Coatzacoalcos

CONCEPTO	DESCRIPCIÓN
COORDENADAS GEOGRAFICAS EXTREMAS	Al norte 18° 13', al sur 18° 04' de latitud norte, al este 94°13' y al oeste 94°38' de longitud oeste.
PORCENTAJE TERRITORIAL	El municipio de Coatzacoalcos representa el 1.20% de la superficie del estado de Veracruz.
COLINDANCIAS	El municipio de Coatzacoalcos colinda al norte con Pajapan y el Golfo de México; al este con el municipio de Agua Dulce; al sur con Agua Dulce, Moloacán e Ixhuatlán del Sureste, Nanchital de Lázaro Cárdenas del Río y Cosoleacaque, y al oeste con Cosoleacaque y Pajapan.

Fuente: INEGI. 1994. Cuaderno Estadístico Municipal



Figura No 5.2 Plano de la Ciudad de Coatzacoalcos, Ver.



Figura No. 5.3 Plano de localización del área contaminada

En la figura No.5.4 se presenta un esquema en la cual se ubica el área contaminada. Para el estudio el área total, se dividió en 3 zonas: zona 1 de tratamiento, zona 2 en que existe tierra removida y zona 3 en donde existe crecimiento de pasto. El derrame se realizó en la zona 1, la cual ocupa una superficie de 44 m^2 , el estudio se redujo a esta zona por costos y falta de equipo. En la figura No 5.5 se observa una foto de la zona contaminada.



Figura No.5.4 Esquema del área en que se realizó el derrame



Figura No 5.5 Área contaminada con diesel

5.1.2 Toma de muestra del suelo

Las muestras de suelo se recogieron en una primera etapa hasta profundidad de 0.20 m, y de 0.40- 0.50 m. La muestra de suelo se guardó en un frasco de vidrio de 500 ml previamente esterilizado. En este caso, se realizó una excavación con pala.

La siguiente muestra que sirvió para la caracterización y determinación de volumen de suelo contaminado. Se tomó con un equipo adecuado en tres puntos separados uno de otros 3.9 metros de forma diagonal hasta una profundidad aproximada de 1.50 m, en esta profundidad el suelo estaba muy húmedo. El sitio de muestreo se observa en la figura No 5.6. Se separaron las muestras en fracciones correspondientes a 0.40 m, 0.80- 1.00 m y 1.50 m. Al continuar excavando, se encontró mayor cantidad de agua por lo que se calculó que el acuífero se encontraba a una profundidad aproximada de 2.00 m, ver figura No.5.7



Figura No 5.6 Dos de los puntos de muestreo a diferente profundidad en el área contaminada



Figura No 5.7 Manto acuífero en uno de los puntos de muestreo.

Se trasladó el suelo a un espacio de la Facultad de C. Químicas, colocándose sobre el piso de cemento lona impermeable de polietileno de alta densidad Santul Premium de 4 mm de espesor, con la que también se cubrió el suelo extraído. Con el traslado del suelo, se tomó otra muestra que sirvió para el diseño experimental.

El suelo transportado tenía un volumen de 3.0763 m^3 , considerando la densidad de 2.63, se obtiene un total 8.096 toneladas, sin embargo, no fue posible remediar todo el suelo debido a la dificultad en su manejo, ya que no se disponía de equipo mecánico adecuado para su tratamiento. Para la restauración se utilizaron 2 800 kg de suelo contaminado.

5.2 Caracterización fisicoquímica del suelo

La caracterización fisicoquímica incluyó los parámetros siguientes:

- Textura* del suelo por el método de tamices
- Densidad del suelo*, dividida en densidad aparente y densidad real; para la primera se empleó el método de Beaver de la probeta y en la segunda el método del picnómetro.
- Humedad* por el método gravimétrico, basado en la NMX-AA-016-1984; Muñoz y Col. 2000; Secretaría de recursos Hidráulicos, 1970.
- pH* por el método potenciométrico, basado en NMX-AA-025-1984

- e) *Intercambio catiónico* por el método volumétrico del versenato.
- f) *Materia orgánica* por el método de oxidación de ácido crómico y ácido sulfúrico, basado en NMX-AA-021-1985; Muñoz y Col., 2000, en éste último las cantidades de reactivos a usar son la mitad de lo indicado en la norma. Se debe recordar que la norma es para residuos sólidos y en la presente investigación la determinación se hizo para suelo contaminado con diesel, la cantidad de muestra empleada fue de 0.5 g
- g) *Nitrógeno total* por el método de Kjeldahl, de acuerdo a NMX-AA-024-1984; Muñoz y Col., 2000 éste último es aplicable a suelos, se menciona que la cantidad de muestra a utilizar se encuentra en función de la cantidad de materia orgánica, por lo cual a diferencia de la norma se usó 1.0 g de muestra, no se empleó ácido salicílico.
- h) *Fósforo* por el método de Bray, basado en NMX-AA-024-1985, así como en Muñoz y Col., 2000; Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1970.

Las determinaciones fisicoquímicas como intercambio catiónico; textura del suelo, método de tamices; densidad del suelo se realizaron con base a metodologías recomendadas en Muñoz y Col. 2000; Primo, 1981; Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, 1970; Manual de Procedimientos de Laboratorio de Alta Tecnología Orizaba, 2000. Los procedimientos se encuentran en el anexo 1 de análisis fisicoquímicos.

5.3 Caracterización microbiológica del suelo

Se realizó la cuenta total de bacterias, para lo cual se utilizaron frascos de vidrio estériles, preservándose la muestra en refrigeración.

5.3.1 Bacterias totales en suelo

Se determinó bacterias totales en suelo pesando una muestra de 10 g de suelo y se vació a botellas de dilución con 90 ml de agua estéril. Se agitaron vigorosamente 10 min. Con pipeta estéril se transfirió de la suspensión a tubos de ensayo conteniendo 9 ml de agua destilada estéril.

Se hicieron diluciones decimales hasta 10^{-6} y se ocupó para la siembra diluciones de 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .

Para el desarrollo bacteriano se usó agar nutritivo, por duplicado. Se colocó al centro 0.1 ml de dilución correspondiente, se dispersó con una varilla en forma de L. Se invirtieron las cajas, colocándolas en bolsas de plástico e incubaron de 35-37°C, de 24 a 48 horas, de acuerdo a Clark, 1965 a.

5.3.2 Hongos totales en suelo

Se utilizó la misma metodología que para bacterias totales, cambiando las diluciones a 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , usando como medio para el crecimiento agar dextrosa papa. Se incubó a 28°C y realizó el recuento después de 3 a 4 días, conforme a Parkinson, 1982.

5.3.3 Actinomicetos totales en suelo

Para hacer diluciones se siguió el mismo procedimiento que para bacterias totales. Se sembraron diluciones 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , siendo el medio de cultivo Czapek-Dex-Agar. El tiempo empleado fue de 24 a 72 horas, de acuerdo a Clark, 1965 b; Alexander, 1994.

5.4 Extracción con disolventes y determinación de hidrocarburos poliaromáticos (HPA's)

5.4.1 Caracterización del contaminante

Las muestras tomadas del suelo se guardaron en frascos herméticos en refrigeración. Para la extracción del contaminante se empleó como solvente diclorometano como lo marca la EPA-8015 B, grado reactivo y un tiempo de 6 horas. Para concentrar el hidrocarburo se empleó un Rotavapor R-114, con un baño B-480, la concentración se realizó para la caracterización, ya que posteriormente se comprobó que no era necesario.

5.4.2 Fraccionamiento

El fraccionamiento del hidrocarburo extraído no se realizó, por encontrarse una solución limpia en el caso de caracterización y tratamiento, sin embargo debió realizarse durante las pruebas de tratabilidad, por la incorporación de compuestos lignolíticos presentes en el bagazo, que ocasionaban interferencia en la determinación del hidrocarburo.

5.4.3 Determinación con espectrofotometría ultravioleta (UV)

Se usó un equipo UV marca Perkin Elmer UV/visible, 115 V y 60 Hz de frecuencia con celdas de cuarzo. La determinación se basó en otros trabajos realizados como los de Dridi y Col., 1998; Giger y Blumer 1974. Se realizó una curva de calibración con un estándar como lo menciona Stelljes y Watkin., 1993,

los cuales encontraron que las proporciones de los principales compuestos aromáticos que conforman los hidrocarburos de petróleo son de acuerdo a la tabla No 5.2, la cual sirve también para el diesel de acuerdo a la composición presentada en la tabla No 4.3.

Tabla 5.2 Principales compuestos aromáticos que conforman el petróleo

Compuesto	Por ciento (%)
Benceno	14.48
Tolueno	13.13
Xileno	13.13
Fenol	0.11
Naftaleno	43.34
Fenantreno	14.78

De esta solución stock se hizo una dilución en diclorometano con una concentración aproximada de 20 mg/l, realizándose el barrido de 190 a 400 nm para encontrar la longitud de onda de mejor absorción para esta mezcla.

Se encontraron dos picos de máxima absorbancia: 224 y 250 nm, se seleccionó la longitud de onda correspondiente a 250 nm, debido a que existen estudios de determinación de hidrocarburos poliaromáticos en HPLC, en la que la longitud de onda que se utiliza es de 254 nm.

Para la curva patrón de HPA's se preparó una solución stock en 5 ml de diclorometano, con una concentración de 59 129 mg/l con los principales hidrocarburos poliaromáticos. Ver tabla No 5.3.

Tabla No 5.3 Composición de la solución stock

HPA's solución stock	Cantidad	Concentración (mg)	%
Benceno	50 μ l	44.1	14.91
Tolueno	46 μ l	40.0	13.53
Xileno	46 μ l	39.5	13.36
Naftaleno	133 mg	133	44.9
Fenantreno	39 mg	39	13.9

Para la curva patrón se hicieron soluciones adecuadas con diclorometano para unir los puntos entre los rangos 15 y 1 mg/l, leyéndose en el espectrofotómetro ultravioleta a 250 nm.

5.5 Prueba de tratabilidad (diseño experimental)

Se realizó una fase de tratabilidad de la muestra de suelo de acuerdo a un experimento Box-Behnken con tres variables, tres niveles. Tabla No 5.4.

Se consideraron las variables nitrógeno (N), fósforo (P) y humedad (H), asignándose tres niveles alto (+1), medio (0) y bajo (-1)

Tabla No 5.4. Experimentos totales

Experimento	N	P	H
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0
16	0	0	0

Las relaciones para carbono, nitrógeno y fósforo empleadas en el experimento fueron 100/10/1 y 20/10/1. Para lo cual se colocaron 16 frascos para prueba de tratabilidad

Para la relación C/N/P, 100/10/1, se hicieron las siguientes consideraciones:

Partiendo de la base de 75% de suelo y 25% de bagazo de caña estéril para 5g totales tenemos:

3.75g de suelo + 1.25 g de bagazo = 5 g de composta

Si consideramos que el bagazo tiene 70% de carbono de acuerdo a lo determinado por Rodríguez, V.R. 1999, se obtiene :

$1.25g \times 0.70 = 0.875 \text{ g de carbono en el bagazo}$

De acuerdo a los resultados de la caracterización se tiene 0.004831 g de carbono en el suelo contaminado.

$$3.75\text{g} \times 0.004831 = 0.0181 \text{ g de carbono en el suelo}$$

Ahora si consideramos las dos cantidades de carbono nos queda:

$$0.181\text{g} + 0.875\text{g} = 0.893\text{g de carbono}$$

Por tanto la relación C/N/P, 100/10/1 es 0.893/0.0893/0.00893 para 5 g de composta

Los nutrientes empleados fueron: el fertilizante fosfato monoamónico que aporta en su mayoría fósforo, por contener un 52% del mismo como pentóxido y de nitrógeno tan sólo 11%, así como sulfato amónico como aporte de nitrógeno. Las cantidades en gramos de nitrógeno y fósforo se muestran en la tabla No.5.5:

Tabla No 5.5 Cantidades de nitrógeno y fósforo

Variable	Nivel		
	Alto (+1)	Medio (0)	Bajo (-1)
N (g) de sulfato amónico	0.090	0.05425	0.185
P (g) fosfato monoamónico	0.1957	0.1173	0.039

La prueba de tratabilidad tuvo una duración de 15 días, durante los cuales se determinó 3 veces a la semana dióxido de carbono utilizando un cromatógrafo Gower al que se le inyectó 1 µl del contenido de cada diseño. Una vez realizada la lectura de dióxido de carbono se procedió a airear cada uno de los diseños durante 10 minutos. Ver figura No 5.8 .



Figura No 5.8 Prueba de tratabilidad a nivel de microcosmos

5.5.1 Humedad empleada

Se realizó la selección de humedad considerando 35, 55 y 75% para el diseño experimental. Se adicionaron 1,3 y 5 ml de agua para los niveles bajo, medio y alto, respectivamente.

5.5.2 Determinación de dióxido de carbono

El metabolismo microbiano se determinó a través de la producción de dióxido de carbono utilizando un cromatógrafo Gow-Mac serie 580, acoplado a una computadora provista del programa Computing Integration (CPI) Chromatography Data System, version 6. Las condiciones de operación del cromatógrafo utilizados son: temperatura del detector 100° C, temperatura de la columna 27°C, temperatura del inyector 40°C, corriente del detector 125 mV, fase móvil He, flujo de la fase móvil 55 ml/min y presión de la fase móvil 40 lb/plg².

Los gases se detectaron por conductividad térmica. Los resultados se expresaron en mg CO₂/g de materia seca.

5.5.3 Fertilizante empleado en la prueba de tratabilidad

Se seleccionó como fertilizante al fosfato monoamónico, ya que en su formulación incluye nitrógeno y fósforo, como no es suficiente el aporte de nitrógeno se incluyó sulfato de amonio en las pruebas de tratabilidad y en campo se utilizó urea. Se realizó el ajuste C/N/P de acuerdo al diseño experimental

5.6 Control abiótico

Con la finalidad de determinar la influencia de los factores físicos en el proceso de restauración, se realizó un control abiótico de la manera siguiente:

- Se adicionó 2 ml de cloruro de mercurio a paja de avena, suelo y nutrientes.
- Se mezcló y se dejó reposar una semana.
- Se realizó el proceso de extracción y medición de hidrocarburos poliaromáticos a través de espectrofotometría ultravioleta.

5.7 Tratamiento del suelo contaminado

5.7.1 Tratamiento

De acuerdo a los parámetros obtenidos como porosidad del suelo, que indicaban una alta difusión del diesel, se hizo necesario extraer el suelo para minimizar la contaminación del manto freático que se encuentra muy superficialmente en la zona, como se muestra en la figura No 5.7. Los resultados obtenidos durante la caracterización indicaron que el manto se contaminó, esto se debe además de la porosidad a la textura arenosa del suelo, por lo que el hidrocarburo se adsorbe en menor grado que en un suelo arcilloso.

Una vez cuantificada la cantidad de C/N/P en el suelo, seleccionado el fertilizante y la humedad se estableció el tratamiento, haciendo el ajuste de C/N/P. El tratamiento tuvo una duración de 65 días. El aire se proporcionó a través de la remoción de la composta con pala, 2 veces por semana.

La biopila o biohilera se realizó cubriendo el piso con dos capas de polietileno de alta densidad con espesor de 1 mm para evitar el paso de lixiviados al mismo. La cantidad de suelo sometida a tratamiento fue de 2.8 toneladas, el cuál se mezcló en capas con 3 pacas de paja de avena de 20 kg cada una. Se colocó una capa de paja, después una de suelo finalizando con una capa de paja. Los lixiviados se mezclaron con la composta dos veces por semana utilizando una pala, este procedimiento permitió la aireación de la biopila.

Los cálculos para agregar el fertilizante se hicieron con base en los resultados obtenidos de la prueba de tratabilidad. Se hizo una relación de suelo-texturizante de 98/2, por lo cual si se tiene 2 800 kg de suelo, se necesitan 56 kg de paja. Se agregaron 3 pacas de paja de avena con un peso de 20 kg cada una.

Para la relación 98/2 suelo texturizante la determinación de carbono, nitrógeno y fósforo se realizó con base en los valores que se presentan en la tabla No 5.6

Tabla No 5.6 Valores de C, N, P en paja y suelo contaminado

	C (%)	N (%)	P (%)
Paja (avena)	32.54	0.083	0.0006
Suelo	0.4831	0.053	0.0001

Relación suelo-texturizante

$$C = (98 \times 0.00483 + 2 \times 32.54) = 1.1242$$

$$N = (98 \times 5.3 \times 10^{-4} + 2 \times 8.59 \times 10^{-4}) = 0.0536$$

$$P = (98 \times 1 \times 10^{-6} + 5 \times 10^{-6}) = 9.92 \times 10^{-4}$$

Para el mejor diseño que corresponde a los niveles alto para N y fósforo tenemos la relación C/N/P 20/10/1 que equivale a 1.12/0.56/0.056, de aquí:

$$N = 0.56 - 0.0536 = 0.5064 \text{ g}$$

$$P = 0.056 - 9.92 \times 10^{-4} = 0.0550 \text{ g}$$

Estos cálculos son para 100 g, pero se tiene un total de 2 860 kg de composta, por tanto:

$$\text{Para nitrógeno } (0.5064 \text{ g N} \times 2.86 \times 10^6 \text{ g composta}) / 100 \text{ g} = 14\,483.04 \text{ g} = 14.483 \text{ kg de nitrógeno}$$

$$\text{Para el fósforo } (0.0550 \text{ g P} \times 2.86 \times 10^6 \text{ g de composta}) / 100 \text{ g} = 1\,573 \text{ g} = 1.573 \text{ kg de P}$$

Se utilizó fertilizante fosfato diamónico (DAP) en lugar de fosfato monoamónico (MAP), porque la producción de MAP en la región se encontraba agotada. Se agregó de fertilizante DAP: $(1\,573 \text{ g P} \times 100 \text{ g fertilizante}) / 20 \text{ g P} = 7\,865 \text{ g de fertilizante}$

Se agregó 7.865 kg fertilizante fosfato diamonoamónico (DAP).

De acuerdo a lo indicado en los cálculos se debe utilizar 14 kg de nitrógeno, 5.175 son aportados por el DAP, por tanto se necesitaron 8.825 kg de urea para completar la cantidad de nitrógeno, sin embargo, sólo se aplicaron 2 kg de urea.

La razón de una menor cantidad de urea se debió a que el pH era neutro y una mayor cantidad de urea podía elevar el pH hasta valores demasiado básicos para la biopila.

En la figura No. 5.9 se presenta la biopila, cuyas dimensiones fueron de 4 m x 2.5 m, con una altura de 0.60 m.



Figura No 5.9. Biopila instalada se encuentra cubierta con paja de avena.

3.7.2 Seguimiento del tratamiento

Los parámetros que se determinaron en este caso fueron carbono, nitrógeno, fósforo, humedad, recuento total de bacterias, hongos y actinomicetos, para lo cual se tomaron muestras 2 veces a la semana de la manera siguiente:

- una muestra por duplicado compuesta de todos los puntos de la pila a diferentes profundidades en la superficie y en el fondo, una vez a la semana y
- tres muestras por duplicado de tres puntos diferentes de la pila una vez a la semana.

Para el muestreo se siguieron las indicaciones de Von Fahnestock y Col., 1998. La toma de muestras se realizó en frascos estériles de boca ancha.

Debido a la dificultad para realizar los análisis, únicamente se determinaron las muestras que incluían los puntos totales. El esquema de la toma de muestra en la biohilera se indica en la figura No 5.10. Los lixiviados fueron retenidos por el polietileno de alta densidad. Cuando se realizó la remoción con pala, éstos fueron mezclados nuevamente con el suelo en tratamiento.

Se utilizó el programa SAS para análisis de los datos estadísticos empleando un ANOVA con un $\alpha = 0.05$ para demostrar valores significativos de metabolismo microbiano y proceso de degradación.

Al final del tratamiento la biopila experimentó una reducción en sus dimensiones de aproximadamente 50%.

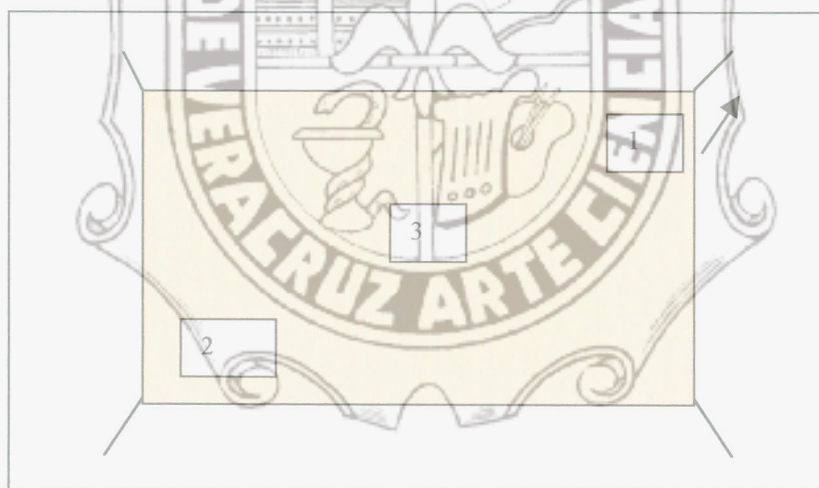


Figura No 5.10 Esquema de los puntos de toma de muestra en la biohilera

CAPÍTULO 6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos se dividieron en tres etapas: caracterización, pruebas de tratabilidad y de tratamiento en campo.

6.1 Caracterización

Para la caracterización del sitio se tomaron en cuenta los criterios de PROFEPA en guías elaborado por el grupo de trabajo, para lo cual se realizó una descripción de clima, hidrología, edafología, tipo de fauna y vegetación a través de la utilización de tablas de INEGI, en el anexo 2 de la página 74 se presentan algunas cartas.

Caracterización del sitio

- Climatología y meteorología

El clima predominante de la ciudad es del tipo cálido húmedo según Köpen modificado por García, temperatura media anual de 25.5°C, con abundantes lluvias en verano, con precipitación media anual de 2832.2 mm (INEGI, 1987 a).

- Hidrología

El área de estudio se encuentra en la región RH29 en el límite de las subcuencas b346, c1130 y a262. La corriente superficial está canalizada en el río Coatzacoalcos, encontrándose el sitio contaminado a 3 km del Golfo de México. Está rodeado de una zona pantanosa e inundable. El coeficiente de escurrimiento es de 0 a 5%. (INEGI, 1987b).

- Topografía

Es una zona llana con pendientes inferiores al 1%, en algunas zonas se encuentra alguna elevación de dunas de zonas costera (INEGI, 1987 b)

- Edafología

El tipo de suelo es Re/1, regosol eútrico, los cuales son suelos poco desarrollados formados a partir de materiales no consolidados.(INEGI, 1987 c). La textura arenosa y la elevada porosidad proporcionan una gran permeabilidad

Uso actual y potencial de suelo: zona urbana, pero sería apto para vegetación herbácea y con ayuda de riego se puede conseguir una cubierta arbórea. Tiene capacidad para agricultura mecanizada continua en algunas zonas y en otras es no apta por ser zona pantanosa.

- Vegetación

Es una zona urbana, pero en los alrededores se caracteriza por ser una zona popal hacia Nanchital, dunas costeras hacia el Golfo de México y la congregación de Allende (INEGI, 1987 d).

- Fauna

No se observó en la especie de reptil que vive en la zona del derrame efecto alguno, ya que continúan viviendo en ese lugar una familia de iguanas, otros animales como pueden ser cochinillas y algunos insectos no fueron observados en la zona del derrame.

De acuerdo a los criterios interinos de restauración recomendados por PROFEPA, aprobados en 1998, se clasificó como:

Uso de suelo: residencial, los análisis especificados son para hidrocarburos totales de petróleo EPA 418.1 por espectrofotometría en infrarrojo, extraídos con tetracloruro de carbono y componentes a través de cromatografía de gases EPA 8015 B, sin embargo no fué posible la medición de los mismos con la metodología recomendada, de allí a que se consideró los niveles de hidrocarburos poliaromáticos exclusivamente por ser típicos componentes de diesel, estas especificaciones de laboratorio son de 1999 y actualizadas en marzo 2000 por el grupo de trabajo para suelos contaminados, emitido a través de PROFEPA.

En relación a su medición (HPA's) a través de espectrofotometría ultravioleta, que aún cuando no es un método tan fino como la cromatografía de gases con detector de flama presentó una alternativa conveniente para su determinación (Dridi y Col., 1998; Giger y Blumer 1974).

No se utilizó la NOM 052 ECOL 93 como parámetro de determinación para decidir si el suelo está contaminado o no, por considerarse que el suelo es un componente del medio ambiente y por tanto no debe ser considerado como un residuo peligroso.

Resultados de análisis fisicoquímicos

Se tomó una muestra superficial compuesta en diciembre de 1999, para la cual se tiene una textura de suelo de arena fina de acuerdo al método de malla y

sistema internacional (Ortiz y Ortiz, 1990), lo que sugiere una gran porosidad, como se observa en el resultado obtenido después de la determinación, en el suelo arenoso hay más macroporos que funcionan en el movimiento del aire y del agua, permitiendo una infiltración rápida de líquidos. En relación al pH resulta adecuado para la estimulación microbiana, ya que las bacterias presentes en el suelo presentan un desarrollo óptimo a pH de 6 a 7, esto es, cercano a la neutralidad. Las cantidades de materia orgánica y nitrógeno son escasas, característico de un suelo arenoso. Ver tabla No 6.1.

Tabla No 6.1 Resultados de caracterización fisicoquímica
diciembre de 1999

PARÁMETROS	MUESTRA A 0.40 m
pH	7.1
Densidad aparente	1.3613
Densidad real	2.6319
Porosidad	*51.72 % (alta)
Materia orgánica	0.3118%
Carbono	0.1281%
Nitrógeno	0.053%
Capacidad de intercambio catiónico total	33.29 meq/100g
Fósforo	0.0001%
Humedad	32.35%
Hidrocarburos poliaromáticos (HPA's)	24 103 mg/kg
Textura del suelo	Arena fina

*Alta, clasificación de Muñoz y Col., 2000

En las tabla No 6.2, 6.3 y 6.4 se presentan resultados correspondientes a muestras tomadas en febrero 2000 a diferentes profundidades, no se observan variaciones apreciables en resultados, salvo en el de pH en el cual existe un descenso conforme se profundiza, sin embargo, se encuentra dentro del rango susceptible de bioestimulación, Dhawale y Col.,1992, mencionan que el crecimiento microbiano adecuado es para pH de 6-8.

Se conservan los valores de densidad aparente, y no existe un cambio apreciable en cuanto a los valores de fósforo se refiere.

Los valores de HPA's obtenidos demuestran una difusión lenta del diesel hacia el acuífero, aunque se sabe que por el tipo de hidrocarburo existe una mayor afinidad con el suelo, como lo indican, Schuttleworth y Cerniglia en 1995, los HPA's son poco solubles en agua y se adsorben fuertemente en el suelo. La difusión se presentó porque el tipo de suelo es arenoso y las precipitaciones

pluviales favorecieron dicha migración. Esto indicó que el suelo debía de ser transportado para evitar la difusión, contaminación del manto freático y realizar su tratamiento *ex situ*. Los valores que no se incluyen en las tablas para HPA's se deben a la falta de reactivos y falla en algunos equipos, por lo que se consideró representativo los resultados obtenidos para los otros puntos.

Tabla No 6.2. Resultados fisicoquímicos del punto 1 a diferentes profundidades

PARÁMETROS	MUESTRA 1 0.40 m	MUESTRA 1 1.50 m
pH	6.14	
Materia orgánica	0.172%	
Carbono	0.077%	
Nitrógeno	0.04%	
Fósforo	0.0001%	
Humedad	29.16%	
Hidrocarburos poliaromáticos (HPA's)	8080 mg/kg	3009 mg/kg

Tabla No 6.3 Resultados fisicoquímicos del punto 2

PARÁMETROS	MUESTRA 2 0.40 m	MUESTRA 2 0.90-1.00 m
pH	5.93	6.74
Densidad aparente	1.38	1.3814
Materia orgánica	0.1615	
Carbono	0.072	
Nitrógeno	0.024	
Fósforo	0.00013%	0.00008%
Hidrocarburos poliaromáticos (PAH's)	14 276 mg/kg	

Tabla No 6.4 Resultados fisicoquímicos del punto 3

PARÁMETROS	MUESTRA 3 0.90-1.00 m
pH	6.85
Densidad aparente	1.3884
Materia orgánica	0.3422%
Carbono	0.1532%
Nitrógeno	No determinado
Fósforo	0.00007%
Humedad	40%

Recuento total de microorganismos

El suelo tiene una zona arable y disponible para agricultura hasta de 0 a 0.40 m, (Ortiz y Ortiz, 1990), considerándose hasta 0.15 m de profundidad si se realiza el arado con tracción animal y con tractor hasta 0.40 m, razón por la cual se seleccionó la toma de muestra para los recuentos de bacterias, hongos y actinomicetos a 0.20 y 0.40 m. Esta zona es significativa en el desarrollo de microorganismos.

Los resultados del recuento indicaron una tendencia a la actividad microbiana como se observa en la tabla 6.5, de aquí, se deduce la posibilidad de aprovechar los microorganismos existentes en el suelo.

Tabla No 6.5 Recuento total de bacterias, hongos y actinomicetos

Microorganismos	Muestra M-1 _{0.20}	Muestra M-1 _{0.40}
Bacterias totales	7.23×10^6	5.1×10^6
Hongos totales	3.5×10^4	1.0×10^3
Actinomicetos totales	9.67×10^4	2.48×10^3

6.2 Prueba de tratabilidad

Se midió la producción de dióxido de carbono durante la prueba de tratabilidad, se consideraron resultados del desarrollo microbiano en los diseños 3,4 y 5, en donde la máxima producción se encontró al octavo día, decayendo en el décimo día, como se observa en la tabla No 6.6.

Tabla No 6.6 Producción de dióxido de carbono en $\text{mgCO}_2/\text{gMSI}$

Diseño	Día1	Día 3	Día 6	Día 8	Día 10	Día 15
1	0.010	0.166	2.694	3.108	1.960	0.986
2	0.010	1.209	2.245	2.825	1.702	1.022
3	0.049	1.967	2.578	3.284	2.007	1.295
4	0.027	0.042	1.873	2.084	1.884	0.643
5	0.049	0.406	2.969	3.119	1.732	0.836
6	0.018	0.669	2.129	2.404	1.640	0.975
7	0.086	0.902	2.336	1.795	1.434	0.708
8	0.097	2.052	2.700	2.189	1.760	1.361
9	0.112	0.093	1.801	1.648	1.379	0.577
10	0.087	0.159	2.430	2.299	1.633	0.728
11	0	2.509	2.358	1.852	1.694	1.133
12	0.114	0.078	1.730	1.458	1.130	0.343
13	0	0.791	2.819	2.495	1.679	0.941
14	0	0.637	2.661	2.448	1.461	0.756
15	0	0.910	2.952	2.649	1.609	1.010
16	0	0.699	3.315	3.274	2.035	1.445

De los resultados de la tabla 6.6 se hizo un análisis estadístico a través del programa SAS, en el anexo se incluyen los resultados como ejemplo, correspondientes al día 10, se determinó que no se tienen resultados significativos en el desarrollo metabólico.

Resultados de HPA's

En la tabla No 6.7 se presentan los resultados de la curva de calibración del estándar utilizado

Tabla No 6.7 Datos de la curva de calibración para HPA's

Concentración (mg/l)	Absorbancia	Desviación estándar	Regresión lineal
14.78	1.1975	0.07424621	B = 0.19167391
7.39	0.7425	0.03323402	M = 0.0691675
3.695	0.4435	0.05444722	R = 0.9976456
1.8475	0.3	0.01272792	

Se obtuvo una reducción significativa de HPA's en el diseño 4, ver tabla No 6.8

Tabla No 6.8 Resultados de HPA's en pruebas de tratabilidad

Valores del diseño experimental	Hidrocarburos aromáticos polinucleares (HPA's)	Hidrocarburos aromáticos polinucleares (HPA's)
Experimento	Concentración (mg/l)	Concentración (mg/kg)
1	10.313	2 062.60
2	11.700	2 340.19
3	12.973	2 594.64
4	6.279	1 255.86
5	7.537	1 507.43
6	9.373	1 874.66
7	5.686	1 137.31
8	7.421	1 484.29
9	22.269	2 226.95
10	17.758	1 775.87
11	19.002	1 900.20
12	4.587	917.55
13	4.660	932.01
14	6.655	1 331.04
15	7.132	1 426.47
16	9.908	1 981.64

El suelo utilizado para la prueba de tratabilidad presentó para hidrocarburos poliaromáticos el resultado siguiente:

4850.3 mg/kg

Si se desea estimar la recuperación obtenida para el suelo en por ciento se toma como base la concentración inicial contra la concentración obtenida en cada diseño experimental, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla No 6.9.

Tabla No 6.9. Reducción de hidrocarburo en prueba de tratabilidad

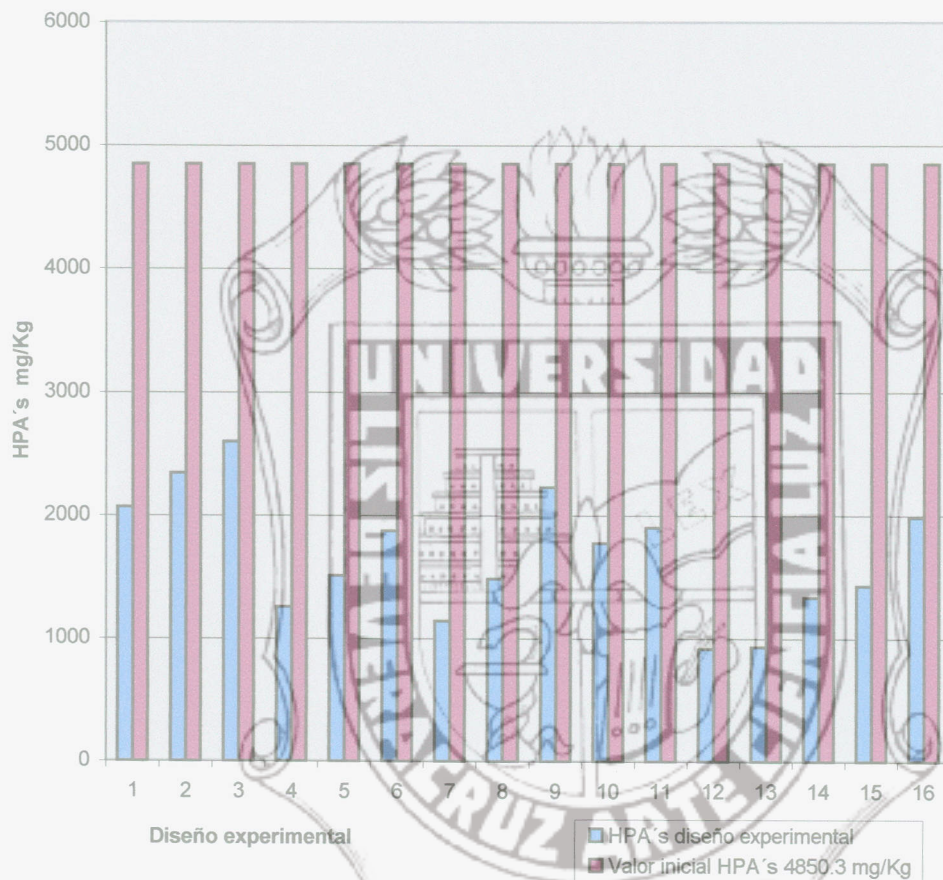
Diseño	Concentración de HPA's en mg/kg	Por ciento de reducción después del tratamiento (%)	Por ciento de biodegradación (sin factor abiótico)
1	2 062.60	57.47	37.47
2	2 340.19	51.75	31.75
3	2 594.64	46.50	26.50
4	1 255.86	74.10	54.10
5	1 507.43	68.90	48.90
6	1 874.65	68.90	48.90
7	1 137.31	76.55	56.55
8	1 484.29	69.39	49.39
9	2 226.95	54.08	34.08
10	1 775.87	63.38	43.38
11	1 900.20	60.82	40.82
12	917.55	81.08	61.08
13	932.01	80.78	60.78
14	1 331.04	72.55	52.55
15	1 426.47	70.59	50.59
16	1 981.64	59.1	39.1

En la gráfica No 6.1 se observa que el resultado conveniente para ser aplicado en campo es el que corresponde al diseño 4, alto de nitrógeno, alto de fósforo y medio de humedad, lo cual se respaldó con el resultado obtenido de la tabla No 6.8 de degradación, en el anexo se presenta el estudio estadístico realizado. Aún cuando en apariencia existe una disminución mayor de HPA's en el diseño 7 al introducir los datos al programa estadístico SAS, no se encontró una diferencia significativa, razón por la cual no se consideró para usarse en campo.

Los valores obtenidos de la degradación en conjunto con las variables y niveles utilizados en el diseño se sometió al programa estadístico de SAS, en el cual se observó un efecto significativo $p < 0.05$ de las fuentes de nitrógeno y fósforo en la remoción de los hidrocarburos poliaromáticos. Sin embargo, la humedad no presentó ningún efecto. Asimismo la interacción nitrógeno y fósforo tuvo un efecto significativo a los 15 días de tratamiento.

El por ciento de biodegradación para el diseño 4 es de 74%, se le resta el factor abiótico de 20% y obtenemos un total de biodegradación de 54%.

Gráfica 6.1 Degradación de HPA's en prueba de tratabilidad



6.3 Tratamiento por biopila

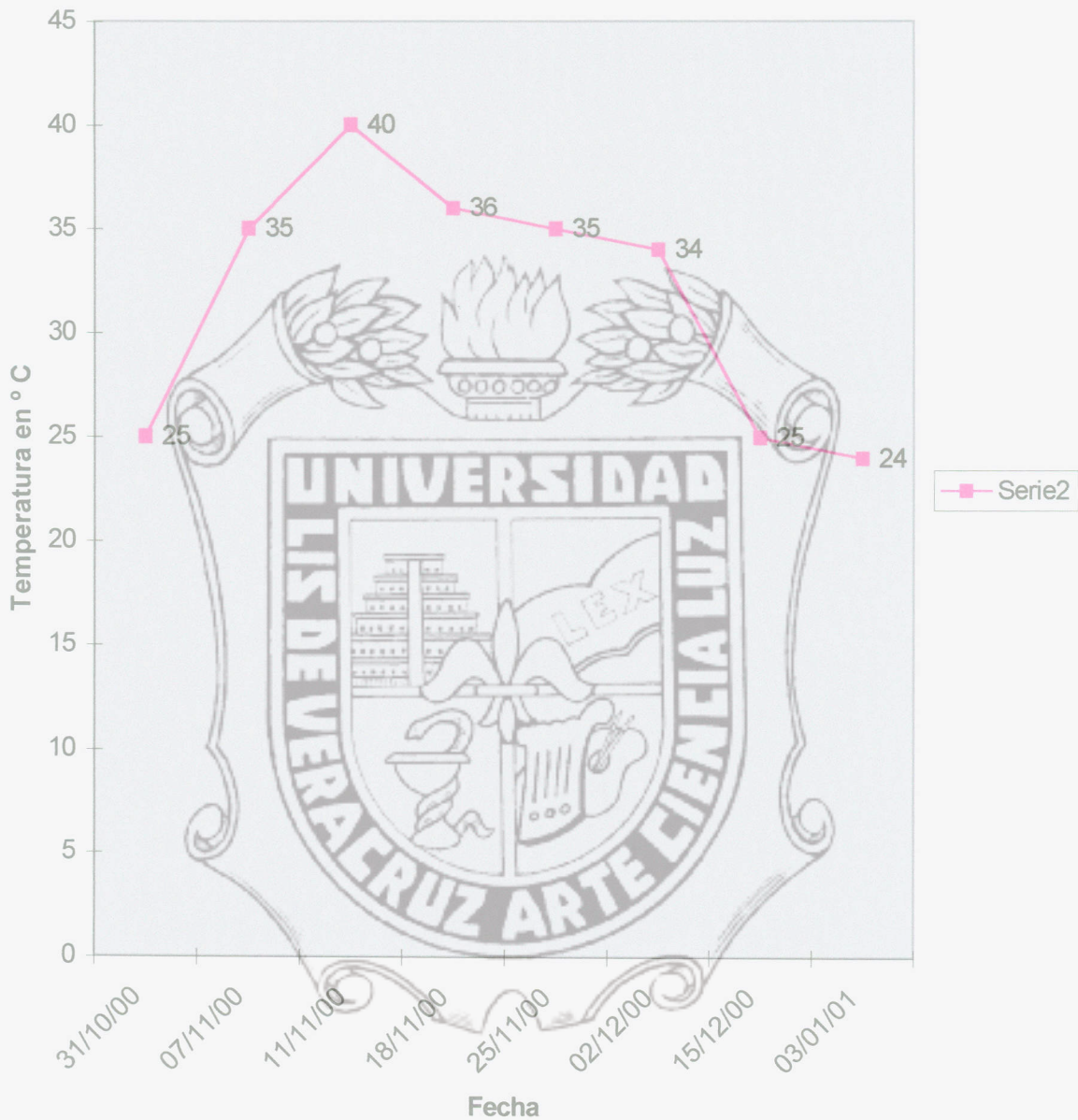
Los resultados correspondientes al tratamiento incluyen los controles correspondientes a temperatura de la biopila, nitrógeno, fósforo, carbono y degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos, así como recuento total de bacterias, hongos y actinomicetos.

La temperatura de la biopila se presenta en la tabla No 4.10, las condiciones climatológicas imperante durante el tratamiento fueron de lluvia con temperaturas bajas.

Tabla No 6.10 Temperatura de la biopila durante el tratamiento

Fecha	Temperatura ambiente (° C)	Temperatura de la biopila (° C)
31/10/00	25	25
07/11/00	24	35
11/11/00	25	40
18/11/00	24	36
25/11/00	22	35
02/12/00	22	34
15/12/00	25	25
03/01/01	19	24

En la gráfica No 6.2 se presenta el comportamiento de la temperatura durante el tiempo del tratamiento, alcanzando un máximo de 40°C a los 15 días de tratamiento, esta temperatura no se mantuvo, lo que sugiere que no existió un desarrollo de microorganismos termófilos sino de mesófilos como lo indican los demás valores obtenidos. Estos valores son confiables ya que la cantidad y tipo de texturizante empleado no favorecían el desarrollo de microorganismos termófilos.



Gráfica No 6.2. Temperatura de la biopila durante el tratamiento

En la tabla No 6.11 se presentan los resultados fisicoquímicos de las determinaciones llevadas a cabo durante el tratamiento.

Tabla No 6.11 Resultados fisicoquímicos del tratamiento

Fecha	Muestra	lote	pH	Materia orgánica %	Carbo-No %	Nitrógeno %	Fósforo %	Humedad %
31/11/00	100	1a	7.34	0.86	0.5	0.05	0.0001	55.45
7/11/00	103	1b	7.78	1.47	0.859	0.109	0.0396	63.20
11/11/00	107	2	8.36	0.76	0.445	0.1	0.0394	75.39
18/11/00	114	3	7.61	0.81	0.471	0.07		74.83
23/11/00	118	5	7.02	0.794	0.462	0.07	0.0387	77.55
29/11/00	127	7	7.04	0.738	0.429	0.050	0.0352	75.25
02/12/00	129	8	6.46	0.715	0.416		0.0348	76.29
13/12/00	143	10	6.89	0.703	0.409	0.045	0.034	79.76
20/12/00	152	12	6.26	0.721	0.419	0.048	0.0348	76.41
26/12/00	167	14	6.17	0.654	0.380	0.04	0.0340	
3/01/01	183	16	6.33	0.493	0.286	0.04	0.0343	

De acuerdo a los resultados observados en esta tabla, se deduce que las condiciones climatológicas imperantes no permitieron el control de la humedad, aunque como ya se indicó para las prueba de tratabilidad, no era significativa. También se observa mayor consumo de nitrógeno que de fósforo. Los valores de pH indican que se conservó en la neutralidad hasta un mes después de iniciado el tratamiento, con tendencia a la acidificación, hasta finalizar con un pH de 6.33. Las dos últimas determinaciones de humedad no se realizaron por no considerarse necesarias, para el tratamiento.

Recuento microbiano del tratamiento

Durante el tratamiento se realizó el recuento microbiano para una sola muestra que se consideró como representativa y otra en que se consideró conveniente finalizar el tratamiento. Los resultados se presentan en la tabla No 6.12.

Tabla No 6.12 Recuento total microbiano del tratamiento

Recuento total	11/nov/00	03/01/01
Bacterias	5×10^9	15×10^6
Hongos	4×10^4	1.1×10^6
Actinomicetos	7×10^5	9×10^4

Los resultados obtenidos revelan un aumento de las bacterias para el análisis realizado a los 15 días después de iniciado el tratamiento, decreciendo al finalizar el tratamiento, comparado con el recuento obtenido en la caracterización, se deduce que hubo un aumento en el desarrollo de bacterias en mayor proporción, siendo menor para hongos y actinomicetos. En estudios realizados por Westlake y Col., 1974, se encontraron poblaciones bacterianas desde 4×10^6 a 9.8×10^7 , lo que concuerda con los resultados obtenidos.

Los hongos se desarrollaron mejor al finalizar el tratamiento por el cambio de pH, ya que se acidificó. Song y Col., en 1986 mencionaron que existía mineralización en suelos contaminados con hidrocarburos, cuya textura era arenosa.

Los actinomicetos no se desarrollaron tan bien como las bacterias debido a que el suelo tenía demasiada humedad; Alexander, 1994 menciona que suelos anegados dificultan el desarrollo de los actinomicetos, al igual un pH ácido, lo que concuerda con los resultados obtenidos.

El desarrollo de los microorganismos implica que encontraron un medio favorable para su crecimiento, debido a la incorporación de nutrientes e hidrocarburo en su metabolismo.

Resultados obtenidos para hidrocarburos poliaromáticos (HPA's)

Los valores obtenidos para HPA's para el control abiótico fueron de: 3866.6 mg/kg de suelo, con una degradación de 20% si relacionamos con los valores obtenidos para degradación correspondientes a las pruebas de tratabilidad de 54% tenemos la siguiente relación para la degradación:

Biótico 54% \ Abiótico 20%

Se deduce de este resultado que el proceso que se llevó a cabo se debió al tratamiento aplicado, ya que el porcentaje de degradación biótica debe ser mayor que la abiótica.

Después de analizar por duplicado las muestras obtenidas durante el tratamiento los resultados obtenidos indican una disminución acentuada de en la concentración de los hidrocarburos poliaromáticos como se muestra en la tabla No 6.13.

Tabla No 6.13 Concentración de hidrocarburos poliaromáticos en el tratamiento

Muestra (fecha)	HPA's (mg/kg)	Degradación en por ciento (%)	Por ciento de biodegradación (%)
30/10/00	5 322.2	Inicio	Inicio
07/11/00	1 824.6	65.71	45.71
11/11/00	350.26	93.4	73.4
18/11/00	143.3	97.3	77.3
29/11/00	4.75	99.8	79.3
02/12/00	164.75	96.9	76.9
20/12/00	16.35	99.6	79.9
27/12/00	7.36	99.8	79.8
03/01/01	3.30	99.9	79.9

Como se pudo observar para el estudio de tratabilidad se utilizó bagazo de caña y en campo el texturizante ocupado fue paja de avena, lo que de alguna manera pudo causar alguna diferencia en el proceso de degradación.

En la literatura se menciona que la degradación de HPA's se realizó en 8 semanas, como es el caso del tratamiento por biohilera de una superficie de 30 500m³ realizado en Blackburn, Inglaterra (LaGrega M y cols, 1998), ese estudio concuerda con los resultados obtenidos para el presente tratamiento.

El aumento de la población microbiana durante el tratamiento se relaciona con la biodegradación alcanzada, ya que a los 15 días se observó un desarrollo máximo de bacterias y hongos y una disminución de HPA's.

La biodegradación de HPA presentada en campo fue de 73%, observándose una diferencia con la prueba de tratabilidad, ya que se obtuvo una biodegradación de 54%, esto se explica con base en la aplicación de un texturizante diferente, paja de avena.

CAPÍTULO 7. COSTOS ESTIMADOS DEL TRATAMIENTO

El costo estimado de un trabajo de restauración completo se divide en tres etapas:

1. Estimación del costo de caracterización del sitio. Se estima la evaluación del sitio a través de la caracterización del mismo, con la finalidad de decidir si es factible de aplicar biorremediación. Aquí se incluiría la prueba de tratabilidad con un tiempo de duración de 15 a 20 días.
2. Costo de equipo y material. Representa el gasto en equipo empleado y material para la construcción de una biopila.
3. Estimación del costo del biotratamiento. Se refiere al costo del tratamiento durante 2 meses. Se incluyen los gastos de materiales y servicios que son parte del proyecto, mano de obra y supervisión durante el tiempo establecido..

Caracterización del sitio

La estimación del costo de caracterización del sitio incluye: actividades de campo, de laboratorio y de gabinete como se observa en la tabla No 7.1, 7.2 y 7.3.

Tabla No 7.1 Costos de actividades de campo durante la caracterización

Actividad	Unidad	Cantidad	Precio unitario	Importe \$ (pesos mexicanos)
Visita de inspección		1	150	150
Perforación y muestreo de suelos por el método de penetración estándar.	lote	9	110	990

El costo total para actividades de campo es de \$ 1 140.00

Tabla No 7.2 Actividades de laboratorio

Descripción	Unidad	Cantidad	Precio unitario	Importe \$
Climatología y meteorología	Reporte SMN-CNA	1	30	30
Hidrología	Carta INEGI	1	40	40
Topografía	Carta INEGI	1	40	40
Perfil litológico	prueba	1	110	110
Textura del suelo	prueba	1	200	200
Consistencia del suelo	prueba	1	80	80
Permeabilidad del suelo	Prueba	1	160	160
Humedad	Prueba	4	40	160
Metales	Prueba	9	100	900
pH	Prueba	4	40	160
Nitrógeno	Prueba	4	100	400
Fósforo	Prueba	4	100	400
Materia orgánica y carbono	Prueba	4	80	320
Capacidad de intercambio catiónico	Prueba	4	100	400
Recuento total de bacterias, hongos y actinomicetos	Prueba	4	50	200
Hidrocarburos poliaromáticos	Prueba	8	600	4800

El costo total para actividades de laboratorio es de \$ 8 800.00

Las actividades de gabinete en esta fase son aquellas en las que se realizan el análisis de los resultados acompañados de un proyecto en el que se indica la tecnología que se empleará en la restauración del suelo, en la tabla No 5.3 se presentan los costos.

Tabla No 7.3 Actividades de gabinete

Actividad	Unidad	Cantidad	Precio unitario	Importe \$ (pesos mexicanos)
Elaboración de proyecto de restauración	Proyecto	1	1000	1000

Los costos estimados para la caracterización del sitio como son de \$ 10 940.00

Las pruebas de tratabilidad estarían sujetas al tipo de diseño experimental y tipo de tratamiento. Si se realizara un diseño con tres variables y tres niveles como el empleado en este trabajo, su costo aproximado sería de \$ 9 600.00, considerando únicamente las determinaciones de HPA's.

Para la caracterización del presente trabajo así como pruebas preliminares el costo estimado fue de:

- Para actividades de campo únicamente se requirió compra de material como frascos y nevera con un total de \$100.00, no se consideró gastos para la toma de muestra a profundidad porque el equipo fue prestado.
- En relación a las actividades de laboratorio se tuvo un gasto aproximado de \$ 3 000.00 incluyendo el transporte de muestras. No se realizó la determinación de hidrocarburos totales del petróleo. Las cartas de INEGI fueron compradas con un costo de \$ 100.00
- No se incluyen gastos de gabinete relativos a la presentación del proyecto.

De allí que para la caracterización del sitio en este trabajo se tuvo un gasto de \$3 200.00 contra \$ 10 940.00 si se hubiera realizado con una compañía.

Equipo

Para un volumen de 1m^3 de suelo, se consideraron los conceptos y costos correspondientes, presentándose en la tabla No 7.4.

Tabla No 7.4 costos de equipo

Concepto	Unidad	Costo unitario	Total de costo	Observaciones
MAP (fertilizante)	Bolsa (50 kg)	\$ 150.00	\$150.00	Donado por Rhodia
Urea (fertilizante)	Bolsa (2 kg)	\$ 25.00	\$ 50.00	La planta estaba cerrada, se compró al menudeo
Paja de avena	Paca	\$60.00	\$ 300.00	
Lona de polietileno	1 Lona	\$135.00	\$ 810.00	
Cuerda	30 m	\$ 3.50	\$105.00	
Total			\$1 265.00	

El total estimado es de \$1 265.00

Tratamiento

Los gastos estimados para un tratamiento como el que se realizó se dividen en: gastos de instalación mano de obra, gastos para control de la biopila con pruebas de laboratorio se observan en la tabla No 7.4 y 7.5.

En la tabla No 7.4 se tiene un total de gastos de \$ 1 265.00 y en la tabla No 7.5 un costo de \$ 1 250.00 que son los considerados en un tratamiento a través de biopila.

Costos de operación y mantenimiento

En la tabla No 7.5 se presentan los costos por labores de mantenimiento y operación de una hilera de manera manual.

Tabla No 7.5. Costo de labores de mantenimiento y operación de una biopila

Actividad	Unidad	Costo unitario	Duración	Horas	Costo total
Transporte suelo (operador 1) (operador 2)	Jornada	\$ 50.00 \$ 50.00	6 Horas	6	\$ 100.00
Prueba de aireación: técnico	Jornada	\$100.00	11 semanas	44	\$ 1 100.00
Traslado de suelo tratado: 2 operadores	Jornada	\$50.00		5	\$ 50.00
Total					\$ 1250.00

En la tabla No 7.6 se presentan los costos de los análisis realizados para seguir el tratamiento en la hilera.

Tabla No 7.6 Costo de análisis por biopila

Análisis	Unidad	Costo unitario (\$ pesos mexicanos)	Cantidad	Costo/ evento	Costo ciclo (\$ pesos mexicanos)
Determinación HPA's	Evento	600.00	9		5400.00
pH		40.00	9		360.00
Humedad		40.00	7		280.00
Carbono		80.00	9		720.00
Nitrógeno		100.00	9		900.00
Fósforo		100.00	9		900.00
Recuento total de bacterias, hongos y actinomicetos		50.00	2	100.00	200.00

El costo para análisis en una biopila es de \$ 8 760.00 .Los gastos por mantenimiento y operación son de \$ 1 250.00

Costo total incluyendo caracterización y tratamiento.

La caracterización tuvo un costo de \$ 10 940.00 .

La estimación para costos de equipo fue de \$ 1 265.00

En total se tienen costos por mantenimiento y operación, así como análisis realizados durante el tratamiento de \$ 10 010.00

Si se integran los tres conceptos el costo asciende a \$ 11 275.00.

Costo de la biopila realizada en campo

El costo del tratamiento a través de biopila para el presente trabajo fue de \$ 2 515.00 (dos mil quinientos quince pesos 00/100 M.N), lo que equivale a \$ 215.00 U.S para 1 m³ de suelo, ya que sólo se consideraron los gastos del tratamiento *ex situ* y traslado del suelo recuperado a su sitio original.

En la tabla No 7.7 se presentan algunos costos de tecnologías fisicoquímicas empleada en la restauración de suelos contaminados contra biohileras, no se incluye la caracterización, ni pruebas de tratabilidad. El costo únicamente considera el tratamiento.

Tabla No 7.7 Costos de tecnologías fisicoquímicas y biopila

Tipo de tratamiento	Costo por m ³ (\$)	Tiempo necesario (Meses)	Factores adicionales/ gastos
Incineración	300-1 040	6-9	Energía
Desorción térmica	200	2	Control
Biotratamiento	52-130	18-60	Tiempo dedicado
Biohileras	215	15	Tiempo dedicado

Fernández y Col., 1998

El costo del tratamiento a través de biopila es mas barato comparado con otras tecnologías, con la ventaja de que la biodegradación del suelo requirió únicamente 15 días.

CONCLUSIONES

La relación C/N/P, 20/10/1 con la adición de nitrógeno, fósforo y paja de avena fue adecuada para el desarrollo de los microorganismos, hongos, bacterias y actinomicetos, lo que permitió la degradación del diesel en un 73%.

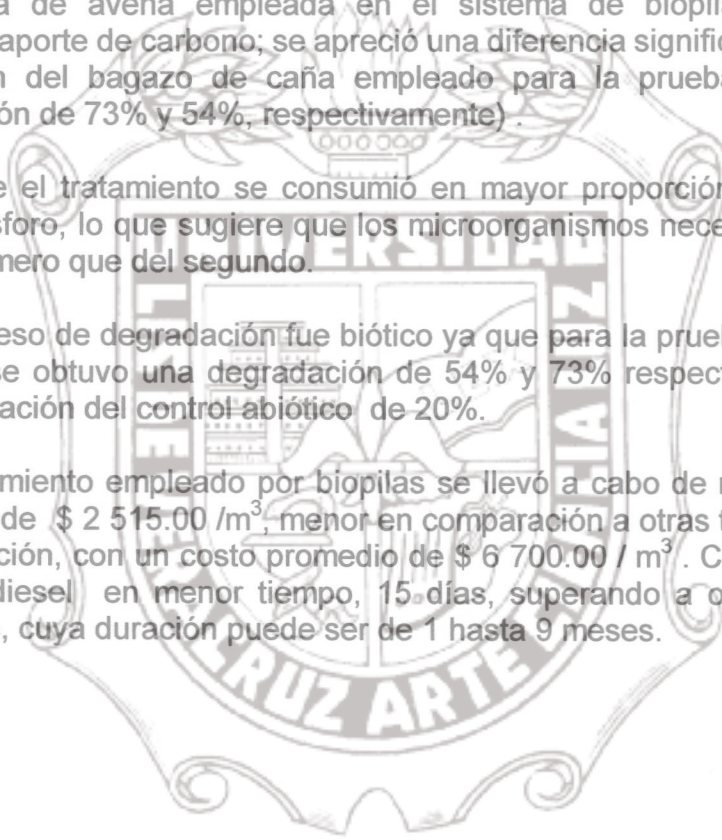
Son necesarias las pruebas de tratabilidad previas, ya que para cada suelo deben emplearse las condiciones de cultivo de acuerdo a sus características.

La paja de avena empleada en el sistema de biopilas fue un buen texturizante y aporte de carbono; se apreció una diferencia significativa al utilizarla en sustitución del bagazo de caña empleado para la prueba de tratabilidad (biodegradación de 73% y 54%, respectivamente).

Durante el tratamiento se consumió en mayor proporción el nitrógeno en relación al fósforo, lo que sugiere que los microorganismos necesitaron un mayor aporte del primero que del segundo.

El proceso de degradación fue biótico ya que para la prueba de tratabilidad y de campo se obtuvo una degradación de 54% y 73% respectivamente, contra menor degradación del control abiótico de 20%.

El tratamiento empleado por biopilas se llevó a cabo de manera manual y tuvo un costo de \$ 2 515.00 /m³; menor en comparación a otras tecnologías como la de incineración, con un costo promedio de \$ 6 700.00 / m³. Con la biohilera se degradó el diesel en menor tiempo, 15 días, superando a otros tratamientos fisicoquímicos, cuya duración puede ser de 1 hasta 9 meses.



RECOMENDACIONES Y APORTACIONES

RECOMENDACIONES

La espectrometría UV permitió determinar HPA's a 250 nm, sin embargo no se pudo determinar concentraciones específicas de benzopireno por lo que se recomienda utilizar para otros estudios cromatografía de gases con la finalidad de realizar un trabajo más fino y poder determinar dicho componente, por su poder cancerígeno.

Realizar de ser posible estudios de toxicidad de los productos formados después del tratamiento.

El aislamiento e identificación de microorganismos son convenientes para poder contar con cepas autóctonas del suelo mexicano, mismas que podrían ser utilizadas en otros tratamientos.

APORTACIONES

Aplicación a nivel de campo de un tratamiento por biopilas, lo que sienta bases para recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos en México.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Alexander, M. 1994. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor. 2ª ed. México. pp. 491.
- Amador, J.A., Jones, R. D., 1993. Nutrient limitations on microbial respiration in peat soils with different total phosphorus content. Soil Biology and Biochemistry. Vol 25, pp 793-801.
- Arvin, E., Jensen, B., Grbic-Galic.1988. Microbial degradation of oil and creosote related aromatic compounds under aerobic and anaerobic conditions, in Cookson, J.T. Bioremediation engineering. Mc Graw Hill, pp 109.
- Atlas, R.M., 1981, Microbial degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective. Microbiological Reviews. Vol 45. No 1. P 180-209.
- Atlas, R.M. y Bartha, R., 1973. Stimulated biodegradation of oil slicks using oleophilic fertilizers. Environ Sci. Technol. Vol 7, pp 538-541.
- Atlas, R.M.y Bartha, R. 1997, Microbial Ecology. Fundamentals and Applications. Addison Wesley. EUA. 4º ed. Pp 694.
- Bandyopadhyay, S., Bhattachrya, S.K and Majumdar, P., 1994. Engineering aspects of bioremediation In: Remediation of hazardous waste contaminated soils. Wise, D.L. and Trantolo, Maceri D.J. Inc. United States of America, pp 55-75.
- Benazon N., 1995, Soil Remediation. A practical overview of Canadian cleanup strategies and commercially available technologies., Hazardous Materials Management, oct-nov., pp 10-26.
- Beraud, J.F., Ducreux J.D. y Gatellier C. 1989. Use of soil-aquifer treatment in oil pollution control of underground waters. In Proceedings of the 1989 Oil Spill Conference. American Petroleum Institute, Washington. pp 53-59.
- Bergstein, P.E., y J.R. Vestal., 1978. Crude oil biodegradation in arctic tundra ponds. Arctic. Vol 31., pp 158-169.
- Biocycle 1995: Cleaning Carolina Soil, Successful Bioremediation with compost, Biocycle. Vol 36 No 2. pp 57-59.
- Boethling, R.S., Alexander, M. 1979. Effect of concentration of organic chemicals on their biodegradacion by natural microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 37. Pp. 1211-1216.

Bossert, I. y Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystem. In R. M. Atlas (ed). Petroleum microbiology. Mac Millan Publishing Co. New York. p. 434-476.

Box, G.E. Hunter, W. Hunter J.S. 1989. Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos. 1º ed. Reverté. México, pp 674.

Britton, L.N., 1984. Microbial degradation of aliphatic hydrocarbons. In Microbial degradation of organic compounds, Gibson, D.T. (Ed) Marcel Dekker, New York, pp 89-130.

Caplan, J.A. 1993. The worldwide bioremediation industry: prospects for profit. Bioremediation. 11:320-323.

Chapman, H.D. y P.F. Pratt. 1976. Métodos para análisis de suelos, plantas y aguas. Ed. Trillas. México.

Chaudhry, G.R. and Chapalamadugu, S. 1991. Biodegradation of halogenated organic compounds. Microbiol.Rev. 55(1) pp 59-79.

Clark, F.E. 1965 a. Agar plate method for total microbial count. In: C.A. Black (ed). Methods of soil analysis. Agronomy. American Soc. of Agr. No 9. Part 2. Madison, Wisconsin, pp 1460-1466.

Clark, F.E. 1965 b. Actinomicetes. In: C.A. Black (ed). Methods of soil analysis. Agronomy. American Soc. of Agr. No 9. Part 2. Madison, Wisconsin, pp 1466-1472.

Colwell, R.R. y Walker, J.D. 1977. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. Crit. Rev. Microbiol. Vol. 5. Pp 423-445.

Cookson, John T., 1995, Bioremediation Engineering. Design and Application. Ed. Mc. Graw Hill, EUA. pp 524.

Cookson, J.T. y Murray, C.M., 1990. Fundamental studies for developing operational strategies to minimize odors associated with sewage sludge composting. Water pollution control federation 63rd annual conference. Washington.

Cooney, J.J., Silver, S.A. y Beck, E.A., 1985. Factors influencing hydrocarbon degradation in three freshwater lakes. Microb. Ecol. Vol 11., pp 127-137.

Data requirements for soil, sediment and sludge. Accesado agosto de 1999. http://www.frtr.gov/matrix2/section2/2_1.html.

Dhawale, S.W., Dhawale, S.S., Dean-Ross, D. 1992. Degradation of fenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. *Appl. Environ. Microbio.* Vol. 53, pp 3000-3006

Departament of Agriculture Washington.USA. 1984, Investigación de suelos: métodos de laboratorio y procedimientos para recoger muestras. Ed. Trillas. México.

Dibble, J.T. y Bartha, R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation on oilsludge. *Appl. Environ. Microbiol.* No. 37. Pp 729-739.

Doelle, H., Mitchell, D., Rolz, C. 1992. *Solid Substrate Cultivation.* Elsevier Applied Science. New York. pp 466.

Dridi, S., Driss, M., Sabbah S, Bouguerra, M.L. 1998. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne diesel exhaust particulates by HPLC with UV detection and wavelength programming. *J. Liq. Chrom and Rel. Technol.* Vol 21 No 4. pp 475-489.

Edgington, S.M. 1994. *Environmental Biotechnology.* Bio/Techol. Vol 12 No. 12, pp 1338-1341.

Energy Information Administration US, 1991. *International Energy Annual 1989.* Department of Energy, Washington, D.C.

EPA 1994. *Contaminants and remedial options at pesticide sites.* USEPA/600/R-94. USEPARREL, Edison, N.J. USA.

Eweis, J.B. Ergas, S.J, Chang, D.P. Schroeder, E.D. 1999. *Principio de Biorrecuperación.* Mc Graw Hill. 1º ed. España, pp327.

Fernández S.J.M., Ruíz A. G., Rodríguez V.R., 1998, La biorremediación como alternativa al tratamiento de suelos contaminados. *Avance y Perspectiva.* Vol 17. Pp 293-301.

Fielder, L. y Quander J. 1996. Over 300 innovative treatment technologies selected at Superfound sites. *EM Feature.* Oct. p p.21-25.

FitzPatrick, E.A. 1996. *Introducción a la ciencia de los suelos.* Ed. Trillas. 1º ed. México, pp 288.

Fotinich, A., Dhir, K.V., Lingineni, S. 1999. Remediation of simulated soils contaminated with diesel. *Journal of Environmental Engineering.* Vol. 5, pp 36-46.

Fuhrmann S. y Zuberer H., 1999, Principles and Applications of Soil Microbiology. Ed Prentice Hall. New Jersey. 1º ed.

Gibbs, C.F., Pugh, K.B., Andrews, A.R. 1975. Quantitative studies on marine degradation of oil II. Effect of temperature. Proc. R.Soc. London Ser. B. No 188, pp 83-94.

Gibson, D.T. y Subramanian, V. Microbial degradation of aromatic hydrocarbons. In Microbial degradation of organic compounds, Gibson, D.T. (Ed) Marcel Dekker, New York, pp 181-252.

Giger, W. y M. Blumer. 1974. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment; isolation and characterization by chromatography, visible, ultraviolet and mass spectrometry. Analytical chemistry. Vol 46. No 12. pp 1662-1671.

Griffin, D.M., 1980. Water potential as a selective factor in the microbial ecology of soils. Water Potential Relations in Soil Microbiology. Soil Science Society of America, pp 141-151.

Grishchenkov, V.G. Townsend, R.T., McDonald, T.J., Autenrieth, R.L., Bonner, J.S., Boronin, A.M., 1999. Degradation of hydrocarbons in crude oil by pure bacterial cultures under different redox conditions. In: In Situ Bioremediation of petroleum hydrocarbon and other organic compounds. Editors Alleman, B.C. and Leeson, A. The fifth international in situ on site bioremediation symposium, California, pp 209-214.

Hernández Acosta Elizabeth. 1997, Influencia de un complejo de hidrocarburos en poblaciones rizosféricas y en el crecimiento del frijol variedad Michoacán 12-A3. Tesis para obtener el grado de M en C. Pp 131.

Heitzer, A., y Sayler, G.S., 1993. Monitoring the efficacy of bioremediation. Elsevier Science Publishers. Vol 11. pp 334-343.

Horowitz, A., Atlas, R.M., 1977. Continuous open flow-through system as a model for oil degradation in the Arctic Ocean. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 33. Pp 647-653.

Horvath, R.S., 1972. Microbial cometabolism and the degradation of organic compounds in nature. Bacteriol. Rev. Vol 36. No.2, pp 146-155.

INEGI 1994. Cartografía Censal 1:50 000. Cuaderno Estadístico Municipal.

INEGI 1987 a. Cartas de Climas, 1: 1 000 000.

INEGI 1987 b. Carta Hidrológica. Aguas superficiales, 1: 250 000 Carta topográfica 1: 50 000.

INEGI 1987 c. Carta Edafológica 1:250 000 Coatzacoalcos E-15-1-4.

INEGI. 1987. Carta de uso de suelo y vegetación 1: 250 000. Coatzacoalcos E15-1-4.

Jespersen, C., Jerger, D., 1993, Bioremediation tackles hazwaste. Chemical Engineering. Vol 100. [Http://archive.che.com/cgi-bin/view/](http://archive.che.com/cgi-bin/view/)

Jobson, A., Cook, F.D., Westlake, W.S.D. 1972. Microbial utilization of crude oil. Appl. Microbiol. No 23 pp 1082-1089.

Juárez, B.E., Rico, R.A., 1999. Mecánica de suelos. Ed. Limusa. Tomo 1. 3° edic. México, pp 642.

Kanaly, R. Bartha, R. Fogel, S. Findlay, M. 1997. Biodegradation of (¹⁴C)Benzo(a)pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. Applied and Environmental Microbiology. Vol 63 No 11. pp 4511-4515.

Klug, M.J. y Markovetz, A.J., 1967. Thermophilic bacteria isolated on n-tetradecane. Nature. London. No. 215. pp 1082-1083.

LaGrega, M., Buckingham, P. y Evans, J. 1998 Gestión de Residuos Tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Mc. Graw Hill 1° ed. Vol 1.

Leahy J.G. y Colwel R.R. 1990, Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiological Reviews. Vol 54. No.3. pp 305-315.

Levin M. y Gealt, M.A., 1995, Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Ed Mc Graw Hill. España. 1ª ed. pp 338.

Lozano, V.N. y Poggi, V.H.N. 1995. Bioensayos con semillas (*Raphanus sativus*) para la determinación de la efectividad del tratamiento biológico de residuales. Ist Intl. Mtg. Microb Ecol., CONACYT-CINVESTAV-UNAM-IPN, México.

Madsen, E.L. 1991. Determining in situ biodegradation (facts and challenges). Environ.Sci.Technology. Vol 25. No 10, pp 1662-1673.

Manual de procedimientos de suelos del Laboratorio de Alta Tecnología Orizaba, 2000.Universidad Veracruzana.

Martínez, C.J. 1997, Importancia de la identificación de los microorganismos que participan en la biodegradación de los compuestos xenobióticos. Memorias del Symposium Biorremediación de suelos y acuíferos. México. XXV Aniversario de la fundación del departamento de biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN.

Molina, B.L.N., 1999. Biorremediación por bioestimulación de suelos contaminados y su evaluación toxicológica. Tesis para obtener el grado de M en C. CINVESTAV-IPN.

Muñoz, I.D., Mendoza C.A., López G.F., Soler A.A., Hernández M.M. 2000. Manual de Métodos de Análisis de Suelos. Edafología. UNAM. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1985. Oil in the Sea: Impus, Fates and Effects, National Academy of Sciences, Washington D.C.

NMX-AA-016-1984. Protección al Ambiente Contaminación del suelo. Residuos sólidos municipales. Determinación de nitrógeno total.

NMX-AA-024-1984. Protección al Ambiente. Contaminación del suelo. Residuos sólidos municipales. Determinación de humedad.

NMX-AA-025-1984. Protección al Ambiente. Contaminación del suelo. Residuos sólidos municipales. Determinación del pH. Método potenciométrico.

NMX-AA-021-1985. Protección al Ambiente. Contaminación del suelo. Residuos sólidos municipales. Determinación de materia orgánica.

NMX-AA-094-1985. Protección al Ambiente. Contaminación del suelo. Residuos sólidos municipales. Determinación de fósforo total.

NOM-052-ECOL-1993. SEDESOL. Establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.

OECD 1991 *The state of the Environment-1991*, OECD, Paris.

Olivieri, R., Bacchin, P., Robertiello, A., Oddo, N., Degen, L., Tonolo, A. 1976. Microbial degradation of oil spills enhanced by slow-release fertilizer. *Appl. Environ. Microbiol.* No 31. Pp 629-634.

Parkinson, D. 1982. Filamentous fungi. In: A.L. Page (ed). *Methods of soil analysis. Agronomy. American Soc. of Agr.* No.9 part. 2 pp 949-953. Madison, Wisconsin.

PEMEX, 1997. Memoria de Labores 1997.

PEMEX, 1998. Anuario Estadístico 1998.

Poggi, V.H y Rios L.E. 1997. Alternativas para la biorestauración sobre el sitio de los suelos y aguas subterráneas contaminada. Memorias del Simposium Internacional de Biorremediación de suelos y acuíferos. CINVESTAV-IPN. México

Porta, J. López-Acevedo M. Roquero, C. 1999. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Mundi Prensa. 2ª ed. España, pp 849.

Primo, Y.E. 1981, Química Agrícola I. Suelos y fertilizantes. Ed. Alhambra. España. pp 472

PROFEPA. 1999. Criterios de muestreo de suelos.

PROFEPA. 1998. Criterios interinos para la restauración de suelos contaminados.

PROFEPA. Especificaciones de análisis de laboratorio aplicables a hidrocarburos en suelo, 1999, actualizado por el grupo de trabajo en marzo 2000.

Raymond, R.L., Hudson J.O. Jamison V.W.; 1976 Oil degradation in Soil. Applied and Environmental Microbiology. Vol 31, No. 4, pp 522-535.

Rodríguez, V.R. 1997, Biorremediación de suelos contaminados: bioaumentación y bioestimulación. Memorias del Simposium Internacional de Biorremediación de suelos y acuíferos. CINVESTAV-IPN. México.

Rodríguez, V.R. Fernández S.J., Ruiz A.G. 1998 La biorremediación como alternativa al tratamiento de suelos contaminados. Rev. Avance y perspectiva. Vol 17 pp 293-302.

Rodríguez Vázquez Refugio, 1999. Aprovechamiento del bagacillo de caña y de la cáscara de arroz, en Aspectos Aplicados de la Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional, 1º ed. México, pp 453-481

Rodríguez, V. R., Cruz C. T., Fernández S.J.M., Roldán C.T., Mendoza C.A., Saucedo C.G., Tomasini C. A., 1999, Use of Sugarcane Bagasse pith as solid substrate for *P. chrysosporium* growth. Folia Microbiol. Vol 44., No. 2, pp 213-218.

Rodríguez, V. R. Moreno, G.G. Cuevas, D.M.C., Fernández L.L., Trejo M. R. 2001. Recuperación de suelos agrícolas, costos económicos y ambientales. Caso de estudio en México. Conferencia Lationamericana de Microbiología 2001.

Rojas A. N.G., Rodríguez V.R., Saval B. S., Alvarez, P.J.J., 1999. Effect of C/N/P ratio and nonioc surfactans on polychlorinated biphenyls biodegradation. Aceptado para publicarse en World J. Of Biotechnol and Microbiol. Pp 13.

Rojas A.N.G., Rodríguez V.R. Martínez C.J., Esparza G.F., Montes de Oca G.A., Ríos L.E., Fernández V. G. 1999, Isolation and characterization of bacteria degrading polychlorinated biphenyls from transformer oil. Folia Microbio. Vol 44, No. 3, pp 317-321.

Rojas A. N.G., Rodríguez V. R, F, Enríquez V., Martínez C. J., Poggi V. H.M., 1999, Transformer oil degradation by an indigenous microflora isolated from a contaminated soil., Resources conservation and recycling. Vol. 27, pp 15-26.

Saval, Bohorquez Susana. 1997, Biorremediación de suelos y acuíferos contaminados. Memorias del Symposium Biorremediación de suelos y acuíferos. México. XXV Aniversario de la fundación del departamento de biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN.

Saval, Susana, 1998. Sitios contaminados con hidrocarburos. Teorema. Dic-feb., 5, pp 14-16.

Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1970, Instructivo para determinaciones e interpretación de los análisis físicos de los suelos agrícolas. Subsecretaría de Desarrollo y Fomento Agropecuario y Forestal. México.

Schweitzer, G.E. (1991). Borrowed Earth, Borrowed Time. Healing America's Chemical Wounds, Plenum Press, New York.

Shuttleworth, K. y.Cerniglia, C. 1995. Environmental aspects of PAH biodegradation. Applied Biochemmistry and Biotechnology. Vol 54. pp. 291-302.

Song, H.G., T.A. Pedersen y R.Bartha, 1986. Hydrocarbon mineralization in soil: relative bacterial and fungal contribution. Soil Biol.Biochem. No 18. pp 109-111.

Stelljes, M y Watkin, G.E. 1993 Comparison of environmental Impacts posed by different hydrocarbon mixtures: a need for site-specific composition analyses. Hydrocarbon Contaminated Soils and Groundwater. Lewis Publisher. 1º ed. pp 549-569.

Stevenson, F.J. 1986. Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. John Wiley and Sons. New York.

Stucki, G. y Alexander M., 1987, Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. Applied and Environmental Microbio. Vol 53, pp 292-297.

Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A., 1999. Principles and applications of soil microbiology. Prentice Hall, pp 550.

Tolba M. 1992. Saving Our Planet Challenges and hopes. Chapman and Hall, Londres, pp 287.

Trudgill, P.W., 1984. Microbial degradation of the alicyclic ring: structural relationships and metabolic pathways. In microbial degradation of organic compounds. Gibson, T.D. (Ed) Marcel Dekker, New York, pp 130-180.

Uso y aplicación de fertilizantes 1981. Serie Capacitación No. 13. FERTIMEX.

Valladeres Cisneros Ma Guadalupe. 2000. Biodegradación de la fracción recalcitrante del petróleo crudo maya en medio líquido. Tesis para obtener el grado de maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma de Morelos.

Verstraete, W., Top, E. 1992. Holistic environmental biotechnology. Proceed. 48th. Symp. Soc. Gen. Microbiol. Microbial Control of Pollution, Scotland. Pp 1-17, 23-26.

Von Fahnestock, F.M. Wickramanayake, G.B. Kratako, R.J. Major, W.R. 1998. Biopile design, operation and maintenance handbook for treating hydrocarbon contaminated soils. 1^a ed. U.S.A. pp 163.

Walworth, J., Woolard, C., Acomb, L., Chaobal, V., Wallace, M. Nutrient and temperature interactions in bioremediation of petroleum contaminated cryic soil. In: In Situ Bioremediation of petroleum hydrocarbon and other organic compounds. Editors Alleman, B.C. and Leeson, A. The fifth international in situ on site bioremediation symposium, California, pp 505-510.

Wackett, L.P., Brusseau, G.A., Householder, S. R., Hansen, R.S. 1989. Survey of Microbial oxygenases: trichloroethylene degradation by propane oxidizing bacteria. Appl. Environ. Microbiol., Vol 55, pp. 2960-2964.

Ward, D.M. y Brock, T.D. 1978. Hydrocarbon biodegradation in hypersaline environments. Appl. Environ. Microbiol. No. 35. pp 353-359.

Westlake, D. W., Dobson, A., Phillippe R. y F.D. Cook. 1974. Biodegradability and crude oil composition. Can J. Microbiol. No 20. pp 915-928.

Weusler-Botz, D. 2000. Experimental designs for fermentation media development: statistical design on global random search? Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol 90 No 5 pp 473-483.

Wodzinsky, R.S.y LaRocca, D. 1977. Bacterial growth kinetics on diphenylmethane and naftalen-heptamethylnonane. Appl. Environ. Microbiol. Vol 33. pp. 660-665.



ANEXO 1 ANALISIS FISICOQUÍMICOS

1. Textura del suelo. Método de tamices

Se realizó el tamizado para determinar el tamaño de partícula, para lo cual se tomó una muestra secada al aire. Se separaron 100 g de la muestra de suelo seca a través de una serie de tamices con número de malla de 10 a 200. Se agitó durante 15 minutos recogiendo y pesándose el material retenido en cada tamiz. (Muñoz y Col., 2000; Porta y Col., 1999)

Cálculos:

$$\% \text{ peso retenido sobre cada malla} = (g \text{ retenidos sobre cada malla} \times 100) \div g \text{ de muestra}$$

2. Densidad del suelo

Esta determinación se realizó de acuerdo a Muñoz y Col., 2000; Ortiz y Ortiz, 1980; Primo, 1981

- a) Densidad aparente. Se realizó por el método volumétrico o de la probeta de Beaver.

La densidad aparente se calculó a través del peso de un volumen conocido de suelo tamizado y ligeramente compactado. En el valor del peso se consideran tanto la cantidad de espacio poroso como la masa de la fracción sólida del suelo.

Cálculos:

$$\text{Densidad aparente (g/cm}^3\text{)} = Ps \div V$$

Donde: Ps = peso del suelo
V = volumen

- b) Densidad real. Método del Picnómetro .

La densidad real de un suelo se determinó indirectamente mediante el cálculo del peso de un volumen de líquido desplazado por una masa conocida de suelo. El principal uso que se le da a esta determinación es el de calcular la porosidad total del suelo, e inferir los tipos de minerales predominantes en los distintos suelos con base en los diferentes valores de densidad real.

Cálculos:

$$\text{Densidad real (g/cm}^3\text{)} = Ps \div [(Ps + Pa) - M]$$

Donde: Ps = peso del suelo = 5.0 g

Pa = peso del agua sin matraz

M = peso de la mezcla del suelo + agua hasta el aforo

3. Humedad en el suelo

Método gravimétrico

La humedad del suelo se calculó por la diferencia de peso de una misma muestra húmeda y secada en la estufa a 105°C hasta obtener peso constante (Ortiz y Ortiz, 1980, en Muñoz y Col, 2000; Primo, 1984; NMX-AA-016-1984).

4. pH del suelo

Método potenciométrico.

El rango de pH en el cual fluctúan la mayoría de los suelos es de 4 a 10, desarrollándose los cultivos de 5 a 8.5.

El método potenciométrico mide el potencial de un electrodo sensitivo a los iones H⁺, presentes en una solución problema, usando como referencia una solución cuyo electrodo no se modifica cuando cambia la concentración de los iones a medir, siendo generalmente un electrodo calomelano o de Ag/AgCl.

Se utilizó un potenciómetro marca Orion modelo 9107 con electrodo Ag/AgCl. Una vez realizada la calibración, se pesó 20 g de suelo y disolvió en 50 ml de agua, sometiéndose a agitación durante 10 minutos, pasados los cuales se colocó el electrodo en la suspensión, tomando la lectura correspondiente en el aparato. Se sustrajo el electrodo, lavándose con agua destilada (NMX-AA-025-1984).

5. Materia orgánica y carbono

Método de oxidación con ácido crómico y ácido sulfúrico.

Este método se basa en la oxidación de materia orgánica por adición de un exceso de agente oxidante al suelo, seguido de una valoración. En el método de Walkley y Black, la materia orgánica se oxida por el dicromato de potasio en presencia del ácido sulfúrico, formándose ácido crómico y su exceso es valorado con sulfato ferroso usando difenilamina como indicador.

Para la caracterización se pesó 1.0 g de suelo, se colocó en un matraz y se adicionaron 5 ml de dicromato de potasio 1N, así como 10 ml de ácido sulfúrico concentrado, se sometió a agitación durante 1 minuto y se dejó en reposo durante 30 minutos, agregando posteriormente 100 ml de agua destilada y 5 ml de ácido fosfórico concentrado, se adicionaron 5 gotas de indicador difenilamina y se tituló con sulfato ferroso 0.5N (NMX-AA-021-1985; Muñoz y Col., 2000).

Cálculos:

$$\text{Materia orgánica} = \frac{5 - (\text{ml de FeSO}_4 \times N \times F.C.) \times 0.69}{\text{g de muestra}}$$

Donde: 5 = ml de dicromato de potasio agregados

N = normalidad del sulfato ferroso

F.C = factor de corrección

0.69 = constante

El factor de corrección (F.C) se obtiene de la siguiente manera:

$$F.C = \frac{10}{\text{ml de FeSO}_4 \text{ gastados en el blanco}}$$

El carbono orgánico total (COT) se obtiene dividiendo la materia orgánica entre el factor de conversión de 1.72

$$COT = (\% \text{ de materia orgánica}) \div 1.72$$

6 Capacidad de intercambio catiónico total.

Método volumétrico del versenato.

La capacidad de intercambio catiónico total es una expresión del número de sitios de adsorción de cationes por unidad de peso del suelo. Se define como la suma de cationes intercambiables adsorbidos, expresada en miliequivalentes por 100 g de suelo seco.

Se midió lavando el suelo con una solución 1 N de una sal con pH neutro a ligeramente alcalino, se eliminó el exceso de sales con un solvente libre de electrólitos. Se realizaron lavados separados, seguidos por lavados con una sal de un catión metálico, utilizado para obtener la saturación de la muestra y por la determinación del catión libre desplazado (Muñoz y Col. 2000; Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos 1970; Primo, 1981;).

Cálculos:

$$C.I.C.T (meq/100g) = (ml\ EDTA \times N \times F.C) \div 5$$

Donde: N = normalidad del EDTA

F.C = factor de corrección del EDTA

F.C = 10 ml de $CaCl_2$ /gasto promedio de EDTA en los blancos

7. Nitrógeno total.

Método de Kjeldahl

Este método se basa en tres pasos:

a) Digestión

La muestra se sometió a calentamiento con ácido sulfúrico y una mezcla de sales, oxidando la materia orgánica, llevando las formas orgánica a minerales de nitrógeno.

b) Destilación

El nitrógeno en forma de NH_4^+ es transformado en hidróxido de amonio por adición de hidróxido de sodio, y por acción del calor se descompone en amoniaco y agua.

c) Valoración

El amoniaco se recogió en un volumen conocido de solución valorada de ácido bórico y por comparación con un blanco se determinó la cantidad de ácido que se combinó con el amoniaco.

Para la digestión se pesó 1 g de suelo por su escaso contenido en materia orgánica, adicionándose 2 g de mezcla de indicadores (62.5 g de sulfato de

potasio y 6.25 g de sulfato de cobre pentahidratado) y 5 ml de ácido sulfúrico concentrado, sometiéndose a calentamiento durante 1 hora.

El líquido obtenido, previa dilución con agua fue transferido al equipo de destilación en donde se le adicionó 5 perlas de vidrio, 3 granallas de zinc y 15 ml de hidróxido de sodio, en la salida del destilador se colocó un matraz erlenmeyer con 10 ml de ácido bórico con indicador (0.099 g de verde bromocresol y 0.066 g de rojo de metilo disueltos en 100 ml de alcohol etílico al 96%). Se destiló hasta que se alcanzó un volumen de aproximadamente 16 ml. Se procedió a titular con ácido sulfúrico 0.01N (NMX-AA-024-1984; Muñoz y Col., 2000).

Cálculos:

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \frac{[(T - B) \times N \times 1.4]}{S}$$

Donde: T = ml de ácido sulfúrico valorado gastados en la muestra
B = ml de ácido sulfúrico valorado gastados en el blanco
N = normalidad exacta del ácido sulfúrico
S = peso de la muestra de suelo

8. Fósforo

Método de Bray

El fósforo es vital en el desarrollo de plantas, ya que forma parte de las moléculas de ácidos nucleicos, fibrina y de los fosfolípidos. También es indispensable para el desarrollo de los microorganismos. Se encuentra como fósforo orgánico e inorgánico en diversos compuestos. La forma orgánica se encuentra en la materia orgánica y en el humus. La fracción inorgánica está constituida por compuestos de hierro, aluminio, calcio, etc.

El método de Bray se emplea como un índice de fósforo aprovechable. Se usó ácido clorhídrico y fluoruro de amonio para extraer formas diferentes de fósforo soluble, principalmente fosfatos de calcio y una fracción de fosfatos de aluminio y hierro. Este método ha dado buenos resultados en suelos ácidos, y es aceptable en suelos neutros y ligeramente alcalinos.

Para su determinación se pesó 1 g de suelo, se filtró utilizando 7 ml de solución extractora (fluoruro de amonio, ácido clorhídrico 0.5N y agua destilada), agitándose durante 1 minuto. Se tomó 1 ml del filtrado y se agregaron 6 ml de agua destilada y 2 ml de molibdato de amonio, mezclándose bien. Se adicionó 1 ml de cloruro estannoso diluido y pasados 10 minutos se procedió a leer la

absorbancia en un espectrofotómetro marca Milton Roy a una longitud de onda de 640 nm.

La calibración del espectrofotómetro se llevó a cabo utilizando 2 ml de solución extractora, 5 ml de agua destilada y 2 ml de solución de molibdato de amonio, se mezcló y adicionó 1 ml de cloruro estannoso, se mezcló y procedió a la calibración al 100% de transmitancia.

Se realizó una curva patrón de la manera siguiente:

Se preparó una solución tipo de fosfato, para lo cual se pesó 0.4389 g de fosfato monobásico, aforando a 1 litro. Un mililitro de esta solución contiene 100 ppm de fósforo. Posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes de la solución tipo de fosfato llevando el volumen a 100 ml, considerando las proporciones que se muestran en la tabla A.

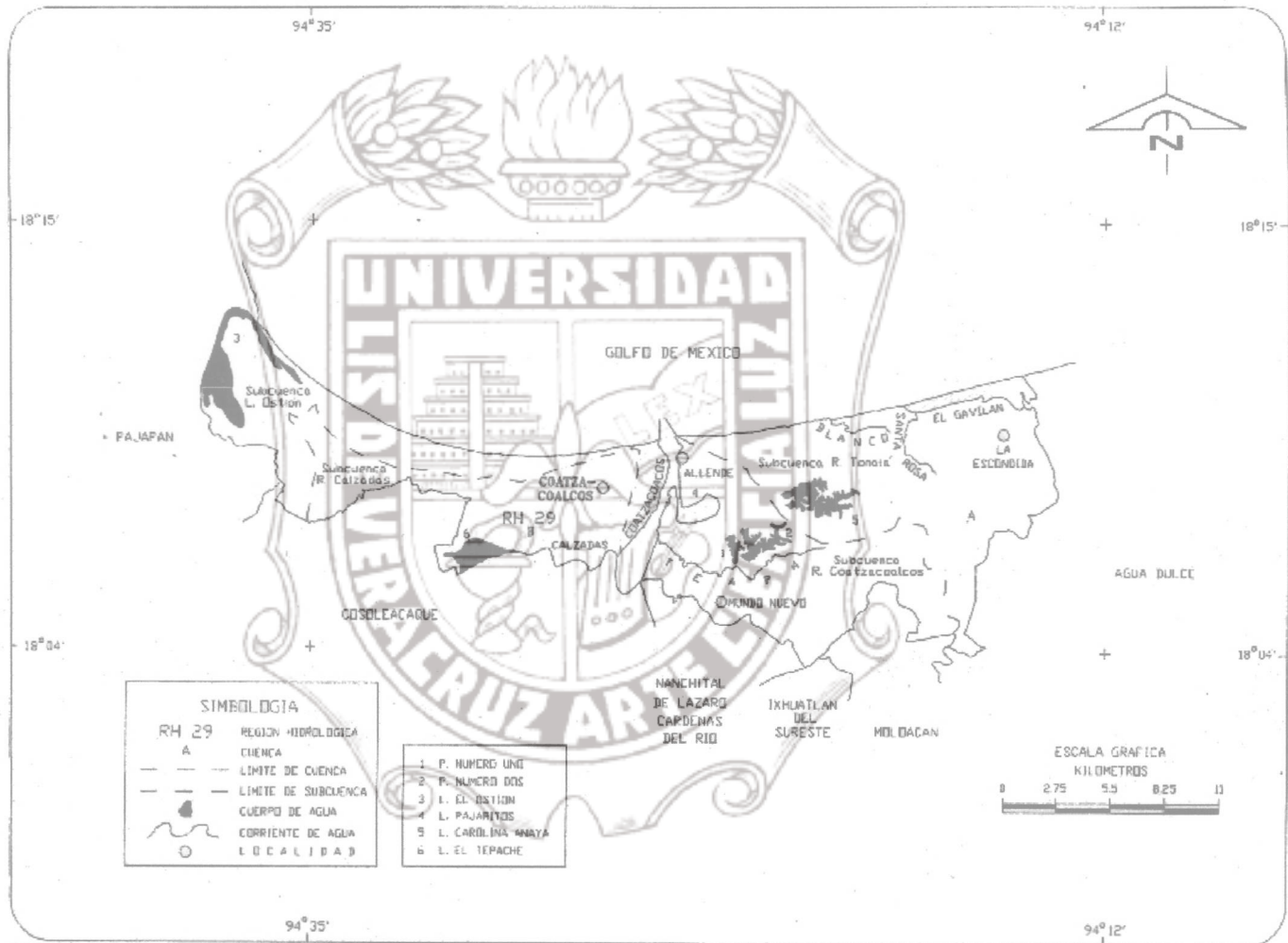
Tabla A . Porciones a considerar de solución tipo de fosfato para realizar la curva de calibración

Concentración (ppm)	ml de solución tipo de fosfatos
10	10
9	9
8	8
7	7
6	6
5	5
4	4
3	3
2	2
1	1

Una vez que se hicieron las diluciones, se tomó 1 ml de cada una de ellas y se adicionó 1 ml de solución extractora, 5 ml de agua destilada y 2 ml de solución molibdato de amonio. Se agregó por último 1 ml de solución de cloruro estannoso diluido, mezclando bien. Se hicieron las lectura a 640 nm y se terminaron antes de 20 minutos (NMX-AA-094-1985; Muñoz y Col., 2000).

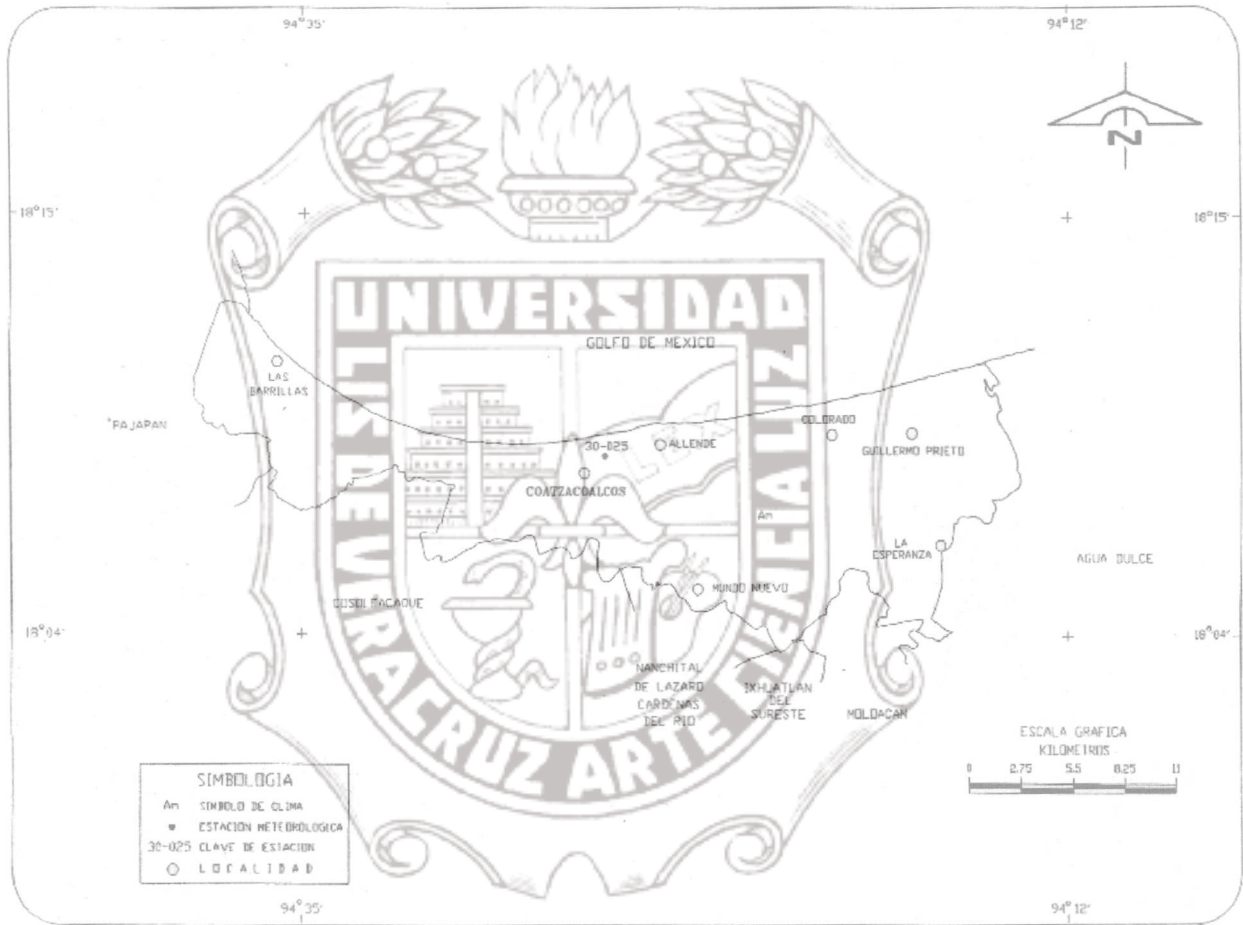
ANEXO 2 CARTAS INEGI

Hidrografía



FUENTE: INEGI. Carta Hidrológica Aguas Superficiales, 1: 250 000.
INEGI. Carta Topográfica, 1: 50 000.

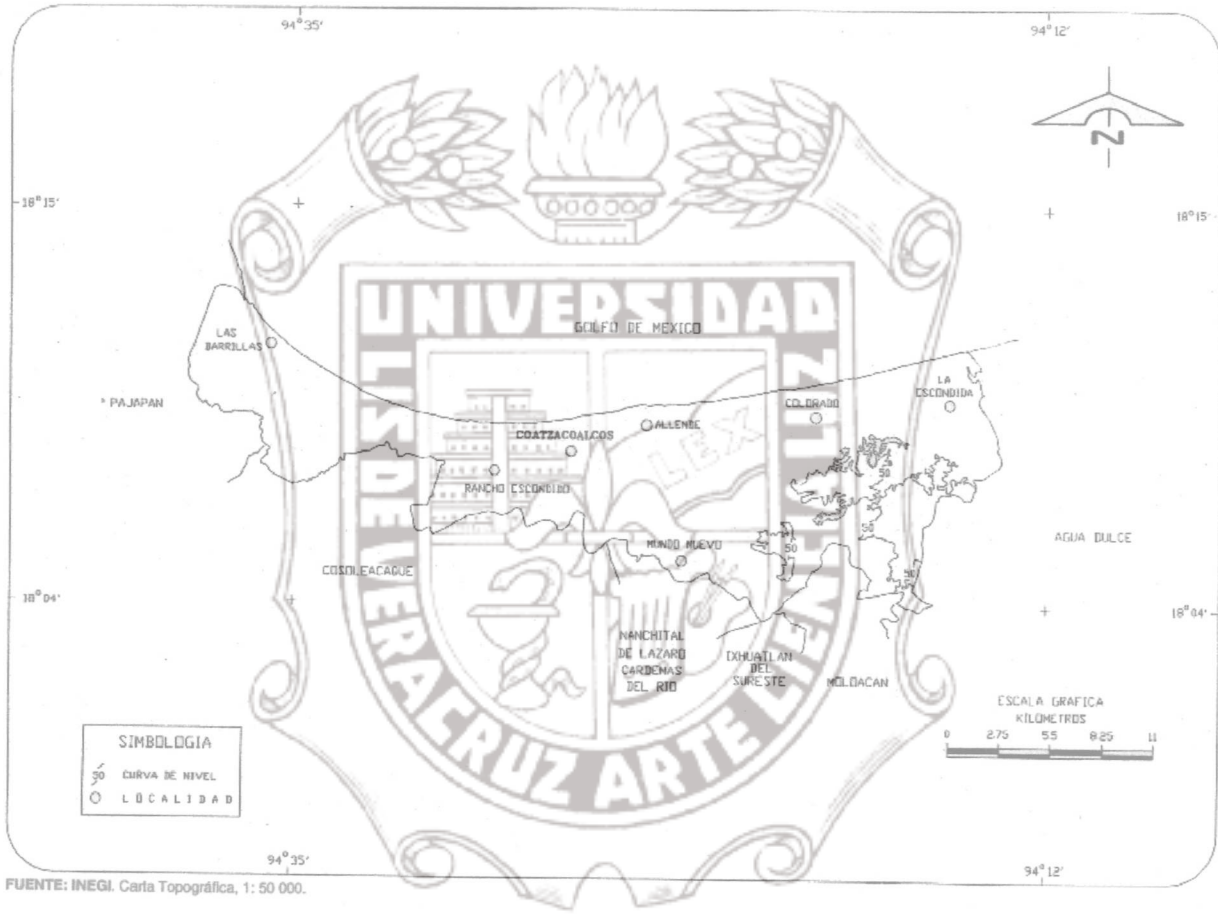
Climas



FUENTE: INEGI. Carta de Climas, 1: 1 000 000.

Instituto de Ingeniería
Universidad Veracruzana

Orografía



ANEXO 3 RESULTADOS DE SAS

SAS

OBS	A	B	C	R
1	-1	-1	0	57.47
2	-1	1	0	51.75
3	1	-1	0	46.50
4	1	1	0	74.10
5	-1	0	-1	68.90
6	-1	0	1	61.35
7	1	0	-1	76.55
8	1	0	1	69.39
9	0	-1	-1	54.08
10	0	-1	1	63.38
11	0	1	-1	60.82
12	0	1	1	71.00
13	0	0	0	71.00
14	0	0	0	72.55
15	0	0	0	70.59
16	0	0	0	71.00

General Linear Models Procedure
Class Level Information

Class	Levels	Values
A	3	0 1 -1
B	3	0 1 -1
C	3	0 1 -1

Number of observations in data set = 16

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: R

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	12	1171.867044	97.655587	130.46	0.0010
Error	3	2.245700	0.748567		
Corrected Total	15	1174.112744			

R-Square C.V. Root MSE R Mean
 0.998087 1.330523 0.865197 65.0268750
 SAS 19:47 Tuesday, June 1, 1993 4

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: R

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	2	142.0436187	71.0218094	94.88	0.0019
B	2	586.7780062	293.3890031	391.93	0.0002
C	2	9.7478688	4.8739344	6.51	0.0810
A*B	3	286.9464125	95.6488042	127.78	0.0012
A*C	2	146.1575375	73.0787688	97.62	0.0019
B*C	1	0.1936000	0.1936000	0.26	0.6461
A*B*C	0	0.0000000			

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
A	1	91.5981125	91.5981125	122.36	0.0016
B	1	164.1672000	164.1672000	219.31	0.0007

General Linear Models Procedure

Dependent Variable: R

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
C	1	2.8441125	2.8441125	3.80	0.1464
A*B	1	277.5556000	277.5556000	370.78	0.0003
A*C	1	0.0380250	0.0380250	0.05	0.8362
B*C	1	0.1936000	0.1936000	0.26	0.6461
A*B*C	0	0.0000000			