



UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

“Estudio de la recuperación de un suelo contaminado con hidrocarburos por diferentes estrategias de biorremediación a nivel microcosmos”.

TESIS

Como requisito para la obtención del título de:

INGENIERO AMBIENTAL

PRESENTA

NAZARIO ADON FLORES CUEVAS

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Elizabeth Miranda Tello

Chetumal Quintana Roo, México, Junio 2008.



UNIVERSIDAD DE QUINTANA ROO

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité de asesoría y aprobada como requisito para obtener el título de:

Ingeniero Ambiental

Comité de tesis:

Director: _____
Dra. Elizabeth Miranda Tello

Asesor Titular: _____
M. I Norma Angélica Oropeza García

Asesor Titular: _____
M. C José Martin Rivero Rodríguez

Asesor Suplente: _____
Ing. José Luis Guevara Franco

Asesor Suplente: _____
M.C. Juan Carlos Ávila Reveles.

Chetumal, Quintana Roo, México Junio de 2008.

Dedico este trabajo a...

A mi familia, que es el motor que me mueve y me motiva a seguir adelante. Son la mejor familia en la que pude haber estado.

A mi mamá por su paciencia y apoyo incondicional en todo momento, en las buenas y en las malas, por ayudarme a llegar siempre a donde me he propuesto y no dejarme caer.

A mi papá por ser siempre un buen ejemplo y enseñarme el camino correcto y a ser un hombre de bien.

A mis hermanitos Lalo, Memo, Omar y Joselito con los que he pasado tan buenos e inolvidables momentos.

A mis abuelitos Lorenzo y Victoria, por apoyarme en mi estancia con ellos y enseñarme tantas cosas. Son un gran ejemplo a seguir.

A mi “hermana” Cheyi y sus bebes Ingrid y Roger por ser tan lindas personas y formar parte de mi familia.

¡Va por ustedes!, por creer en mí y apoyarme en este sendero por el que camino.

La vida es muy corta y hay que aprender a vivirla, no existen barreras imposibles de superar.

¡Cada hombre es dueño de su palabra y esclavo de su silencio!

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por haber creído en mí y haberme brindado una segunda oportunidad, espero no haberles defraudado.

A la doctora Elizabeth Miranda Tello por el tiempo invertido en mí en la realización de este proyecto.

Al doctor Juan Manuel Arce Ortega por enseñarme tantas cosas en el trabajo de laboratorio.

A la maestra Norma Oropeza por haber sido tan buena asesora y una excelente maestra.

Al profesor Juan Carlos Ávila, por haber fungido como mi tutor durante toda la carrera y haberme permitido cumplir esta meta en menos tiempo.

Al maestro Martin Rivero por ser tan buen profesor y brindarme tantos conocimientos.

A la doctora Magdalena Vázquez por haberme permitido tanta flexibilidad en el servicio social y haberme enseñado otra área de la carrera que no esperaba conocer y que me gustó mucho aprender.

A la maestra Patricia Flores y al profesor José Luis Guevara por los conocimientos transmitidos.

A todos mis maestros de la carrera, porque cada uno de ellos aportó un granito de arena en mi formación profesional.

A mis amigos y compañeros de aventuras por todo lo compartido en estos 4 años juntos.

INDICE GENERAL	Página
Dedicatoria.....	I
Agradecimientos.....	II
Índice General.....	III
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tablas.....	IX
Glosario.....	XI
Resumen.....	XIV
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Hidrocarburos.....	1
1.2 Clasificación de hidrocarburos.....	3
1.2.1 Hidrocarburos alifáticos.....	3
1.2.2 Hidrocarburos aromáticos.....	4
1.3 Toxicidad de los hidrocarburos para el ser humano.....	6
1.4 Problemática ambiental de la contaminación de suelos por hidrocarburos.....	9
1.5 Tecnologías de biorremediación.....	11
1.5.1 Bioventeo.....	13
1.5.2 Bioestimulación.....	14
1.5.3 Biolabranza.....	15
1.5.4 Composteo.....	16
1.5.5 Biopilas.....	17
1.5.6 Biorreactores.....	18
1.5.7 Fitorremediación.....	19
1.5.8 Bioaumentación.....	20
1.6 Factores que influyen en la biorremediación.....	21
1.7 Antecedentes.....	23

1.8 Justificación.....	26
1.9 Objetivos.....	27
1.9.1 Objetivo general.....	28
1.9.2 Objetivo específico.....	28
Capítulo 2. Materiales y Métodos	
2.1 Plan de trabajo.....	29
2.2 Evaluación de sistemas de biorremediación a nivel microcosmos.....	20
2.3 Estudios Analíticos.....	32
2.3.1 Determinación de la producción de CO ₂	32
2.3.2 Determinación del porcentaje de COT.....	33
2.3.3 Determinación del porcentaje de fósforo disponible.....	35
2.3.4 Determinación de HTPs.....	37
2.3.4.1 Extracción.....	37
2.3.4.2 Fraccionamiento (Cromatografía sólido-líquido en columna).....	38
2.3.4.3 Cuantificación de HTPs por cromatografía de gases.....	40
Capítulo 3. Resultados y Discusión	
3.1 Estudios analíticos realizados a los sistemas de biorremediación.....	42
3.1.1 Producción de CO ₂	42
3.1.2 Porcentaje de COT.....	44
3.1.3 Porcentaje de fósforo disponible.....	45
3.1.4 Determinación de la remoción de las fracciones alifática y aromática de los hidrocarburos totales de petróleo.....	46
3.1.4.1 Remoción de la fracción alifática.....	46
3.1.4.2 Remoción de la fracción aromática.....	52
Capítulo 4. Conclusiones	58

Capítulo 5. Anexos

Anexo 1..... 59

Capítulo 6. Referencias 63

INDICE DE FIGURAS**Página****Capítulo 1. Introducción**

Figura 1.1 Ubicación de las instalaciones de operación de PEMEX.....	2
Figura 1.2 Producción de los diferentes tipos de petróleo (miles de barriles) producidos desde el 2006.....	3
Figura 1.3 Ejemplo de hidrocarburos alifáticos, pertenecientes al grupo de los alcanos.....	3
Figura 1.4 Hidrocarburos aromáticos, pertenecientes al grupo de los HAPs.....	4
Figura 1.5 Hidrocarburos aromáticos policíclicos con mayor acción carcinógena.....	7
Figura 1.6 Funcionamiento del bioventeo en el proceso de Biorremediación in situ de agua y suelo.....	14
Figura 1.7 Suelo sometido a biolabranza durante su remoción para promover la aireación.....	15
Figura 1.8 Representación esquemática de un sistema de biopilas alargadas (a) y biopilas estáticas (b).....	18

Capítulo 2. Materiales y Métodos

Figura 2.1 Plan de trabajo.....	29
Figura 2.2 Sistemas de biorremediación en los recipientes de ensayo.....	31
Figura. 2.3 Respirómetro montado para evaluar la producción de CO ₂ . (1) Bomba, (2) Agua, (3) Trampa de CO ₂ , (4) Recipientes de ensayo, (5) Trampa de CO ₂ con indicador.....	32
Figura 2.4 Determinación del porcentaje COT.....	34
Figura 2.5 Agitación en vortex durante la etapa de extracción de fósforo disponible.....	35
Figura 2.6 Espectrofotómetro utilizado en la determinación de fósforo disponible.....	36
Figura 2.7 Centrifugadora empleada en la extracción de hidrocarburos.....	37
Figura 2.8 (a) Rotaevaporador y (b) enfriador utilizados para concentrar la muestra obtenida en la extracción de hidrocarburos.....	38
Figura 2.9 Fraccionamiento de hidrocarburos por cromatografía sólido líquido en columna.....	38
Figura 2.10 Columna utilizada para el fraccionamiento de hidrocarburos (a) columna con	39

solvente, (b) columna empacada, (c) elución

Capítulo 3. Resultados y Discusión

Figura 3.1 Miligramos de CO₂ producido durante la cinética en los diferentes sistemas de biorremediación..... 43

Figura 3.2 Porcentaje de carbono orgánico consumido a lo largo de la cinética de biorremediación por los diferentes sistemas ensayados..... 44

Figura 3.3 Porcentaje de fósforo disponible presente en los sistemas de biorremediación a lo largo de la cinética de degradación..... 46

Figura 3.4 Porcentaje de remoción de la fracción alifática de hidrocarburos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación..... 47

Figura 3.5 Cromatogramas que muestran la disminución de la fracción alifática en el sistema control. (a) día 0 y (b) día 30..... 48

Figura 3.6 Cromatograma que muestra la disminución de la fracción alifática en el sistema “composteo-caña”. (a) día 0 y (b) día 30..... 49

Figura 3.7 Cromatograma que muestra la disminución de la fracción alifática en el sistema “composteo-coco”. (a) día 0 y (b) día 30..... 50

Figura 3.8 Cromatograma que muestra la disminución de la fracción alifática en el sistema “bioaumentación”. (a) día 0 y (b) día 14..... 51

Figura 3.9 Porcentaje de remoción de la fracción aromática de hidrocarburos en los sistemas de biorremediación a lo largo de los días de funcionamiento..... 53

Figura 3.10 Cromatograma que muestra los cambios en la fracción aromática en el sistema “control”. (a) día 0 y (b) día 30..... 54

Figura 3.11 Cromatograma que muestra los cambios en la fracción aromática en el sistema “composteo-caña”. (a) día 0 y (b) día 30..... 55

Figura 3.12 Cromatograma que muestra los cambios en la fracción aromática en el sistema “composteo-coco”. (a) día 0 y (b) día 30..... 56

Figura 3.13 Cromatograma que muestra los cambios en la fracción aromática en el sistema

“bioaumentación”. (a) día 0 y (b) día 14.

567

INDICE DE TABLAS**Página****Capítulo 1. Introducción**

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de algunos hidrocarburos alifáticos.....	4
Tabla 1.2 Propiedades fisicoquímicas de algunos hidrocarburos aromáticos.....	5
Tabla 1.3 Características de 16 HAPs.....	6
Tabla 1.4 Características y toxicidad específica de algunos hidrocarburos de amplio uso laboral y doméstico.....	8
Tabla 1.5 Derrames de hidrocarburos en el mar.....	9
Tabla 1.6 Tecnologías de Biorremediación.....	12
Tabla 1.7 Compuestos potencialmente aptos para la biorremediación.....	13
Tabla 1.8 Microorganismos capaces de degradar petróleo crudo y sus derivados.....	25
Tabla 1.9 Derrames líquidos ocurridos durante el 2006 reportados por PEMEX.....	27

Capítulo 2. Materiales y Métodos

Tabla 2.1 Parámetros evaluados, frecuencia y método utilizado.....	32
--	----

Capítulo 3. Resultados y Discusión.

Tabla 3.1 Porcentajes iniciales de carbono orgánico, nitrógeno total y fósforo disponible de los componentes de los sistemas y cantidad de urea y fosfato de potasio monobásico necesaria para ajustar la relación C/N/P a 100/10/1.....	42
--	----

Capítulo V. Anexos**Anexo 1**

Tabla 1 Miligramos de CO ₂ producidos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.....	59
Tabla 2 Porcentajes de carbono orgánico presentes en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.....	60
Tabla 3 Porcentajes de fósforo disponible presentes en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.....	60

Tabla 4 Concentración (ppm) de hidrocarburos alifáticos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.....	60
Tabla 5 Porcentajes de remoción de hidrocarburos alifáticos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.....	61
Tabla 6 Compuestos alifáticos identificados durante la cinética en los distintos sistemas de biorremediación.....	61
Tabla 7 Concentración (ppm) de hidrocarburos aromáticos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.....	62
Tabla 8 Porcentajes de remoción de hidrocarburos aromáticos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.....	62
Tabla 9 Compuestos aromáticos identificados durante la cinética en los distintos sistemas de biorremediación.....	62

Glosario

Biodisponibilidad: Capacidad de las sustancias de ser absorbidas e incorporadas para interactuar en el metabolismo de los organismos.

Biorremediación: Empleo de organismos vivos, tales como microorganismos y plantas, con la finalidad de reducir o eliminar, degradar y transformar contaminantes tanto en ambientes contaminados.

Carcinógeno: Una sustancia que puede causar un cáncer.

Contaminante: Toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural.

Contingencia ambiental: Situación de riesgo, derivada de actividades humanas o fenómenos naturales, que puede poner en peligro la integridad de uno o varios ecosistemas.

Crudo: Mezcla de hidrocarburos resultantes de la descomposición de materia orgánica que proviene de un yacimiento, después de separarle cualquier gas asociado y procesado en una refinería.

Crudo Ligero: Aceite crudo con proporciones relativamente altas de fracciones ligeras y baja densidad relativa. Tiene gravedades API mayores a 31.1 °API

Crudo Pesado: Aceites formados por moléculas grandes que emergen del fondo de una columna fraccionadora durante la refinación del aceite y que tienen gravedades API entre 10 y 28 °API.

Gasóleo: Aceite intermedio procedente del proceso de refinación, utilizado como combustible de motores diesel, quemado en sistemas de calefacción central y como carga de alimentación para la industria química.

Grados API (°API): Medida de cuanto pesa un producto de petróleo en relación al agua. Si el producto de petróleo es más liviano que el agua y flota sobre ella, su grado API es mayor de 10. Los productos de petróleo que tienen un grado API menor que 10 son más pesados que el agua y se asientan en el fondo.

Inóculo: Medio que contiene organismos, (usualmente bacterias u hongos), que son introducidos dentro de un cultivo para comenzar una acción biológica.

Intemperismo: Alteración de los materiales rocosos expuestos al aire, la humedad y al efecto de la materia orgánica; puede ser intemperismo mecánico o de desintegración, y químico o de descomposición, pero ambos procesos, por regla general interactúan. Las variaciones de humedad y temperatura inciden en ambas formas de intemperismo.

Lodos de perforación: Mezcla de arcillas, agua y químicos usada en las operaciones de perforación para lubricar y enfriar la barrena, para transportar los recortes de perforación a la superficie, para prevenir el colapso de las paredes del pozo y para controlar el flujo ascendente de crudo a gas.

Log Kow. Logaritmo decimal del coeficiente de partición octanol-agua; es una medida empírica de la lipofilia que se utiliza para calcular la bioacumulación, la absorción y penetración a través de membranas,

Microbiota: Todas las especies de microorganismos dentro de un territorio o área. En el suelo está formada por una mezcla microscópica de miles y millones de bacterias, actinomicetos, hongos, protozoos por cada gramo de suelo, que cumplen un rol esencial en los procesos biogeoquímicos de la materia

Refinería: Complejo de instalaciones en que el petróleo crudo se separa en fracciones ligeras y pesadas, las cuales se convierten en productos aprovechables o insumos.

Toxicidad. Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Tóxico. Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales, ya que su acción depende de la dosis y de las circunstancias individuales y ambientales.

Yacimiento: Acumulación de aceite y/o gas en roca porosa tal como arenisca. Un yacimiento de petróleo contiene generalmente tres fluidos (aceites, gas y agua) que se separan en secciones distintas debido a diferentes densidades. El gas siendo el más ligero ocupa la parte superior del yacimiento, el aceite la parte intermedia y el agua la parte inferior.

Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la remoción de hidrocarburos alifáticos de un suelo contaminado, usando las técnicas de composteo, bioestimulación y bioaumentación en sistemas a nivel microcosmos.

Para realizar los ensayos de biorremediación se elaboraron 4 sistemas experimentales con el fin de probar la eficacia de las diferentes estrategias. Todos los sistemas fueron estimulados con diversos productos químicos para mantener una relación C/N/P de 100/10/1. El sistema “control” se desarrolló únicamente con bioestimulación. En los sistemas “composteo-caña” y “composteo-coco” se experimentó la técnica de biorremediación por composteo agregando bagazo de caña y cáscara molida de coco respectivamente. Al sistema “bioaumentación” se le adicionó un grupo de microorganismos autóctonos cultivado previamente. Una vez iniciado el proceso de biorremediación, se realizaron muestreos periódicos hasta los 60 días, determinando los siguientes parámetros: producción de CO₂, carbono orgánico y fósforo disponible. La remoción de hidrocarburos alifáticos se cuantificó en un cromatógrafo de gases con detector FID.

La mayor producción de CO₂ la presentó el sistema “composteo-coco”. El carbono orgánico presentó una disminución significativa al final de la cinética de 43.5 % a 10.2 % dependiendo del sistema. El fósforo disponible se mantuvo prácticamente igual en todos los sistemas, (entre 0.1 % y 0.2 %) a lo largo de la cinética de biorremediación.

Para los sistemas “control”, “composteo-caña” y “composteo-coco” se observó una remoción de hidrocarburos alifáticos del 86.5, 87 y 87.5 % respectivamente al final de la cinética. En tanto que para el sistema “bioaumentación” se observó una remoción del 64.8 %.

De acuerdo con los resultados obtenidos durante la cinética en los diferentes sistemas de biorremediación, se considera que la bioestimulación (sistema “control”) es una estrategia que funciona bien en la remoción de hidrocarburos alifáticos sin embargo, al combinar la bioestimulación con el composteo con residuos agrícolas (sistemas “composteo-caña” y “composteo-coco”) se pueden obtener mejores resultados en menor tiempo.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hidrocarburos

El petróleo es el nombre genérico que se le da a los hidrocarburos incluyendo petróleo crudo, gas natural o cualquier fracción que sea líquida en las condiciones estándares de temperatura y presión (60°F en 14.7 psia) (EPA, 2008).

Una composición media del petróleo podría estimarse en 85 % de carbono, 12 % de hidrógeno y 3 % de otros elementos (S, O, N) además de varios elementos metálicos. En ocasiones el petróleo viene acompañado por notables cantidades de gases como H₂S, CO₂ y N₂ (Yarza *et al.*, 1999).

El proceso de explotación de hidrocarburos se divide en 4 etapas importantes: La primera es la prospección, que es la combinación de estudios geológicos del terreno para posibles futuras extracciones (mediante imágenes aéreas), y estudios geofísicos de tipo gravimétrico, magnético o sísmico, los cuales son útiles para determinar la presencia de rocas porosas y poco densas que pudieran contener petróleo. La segunda etapa es el sondeo y extracción que ocurre cuando se localiza petróleo, el siguiente paso es hacer varias perforaciones para determinar la magnitud del yacimiento, capas de agua, de gas o espesor y porosidad de la roca. Una vez extraído, se somete a una estabilización, en la cual el crudo se separa del agua y de los sólidos. La tercera etapa es el transporte; por medio de buques petroleros de gran tamaño (que es la operación de transporte más grande que se realiza) o bien por oleoductos de caudal continuo. La cuarta y última etapa del proceso es el refinado. En esta etapa, el petróleo estabilizado se trata de acuerdo con el destino de los productos que se quieran obtener. En una refinería se persiguen 4 objetivos:

1. Fraccionar el crudo mediante destilación.
2. Convertir las fracciones de menor demanda en fracciones como la gasolina y similares mediante craqueo.
3. Elevar la calidad de las gasolinas por reformado.
4. Depurar los productos obtenidos anteriormente por refinado final (Yarza *et al.*, 1999).

Los productos del petróleo pueden ser fracciones de destilación del crudo o mezclas de fracciones luego de un proceso de refinación. Los productos son utilizados para fines industriales o de uso cotidiano en numerosos productos de consumo. Algunos de los productos

son: gasolinas, naftas, solventes, kerosenos, diesel y aceites lubricantes. El petróleo y sus derivados pueden ser caracterizados en términos del punto de ebullición y el número aproximado de carbonos (BIOETICA, 2008).

La producción y procesamiento de hidrocarburos en México se lleva a cabo por Petróleos Mexicanos (PEMEX). La ubicación de sus instalaciones utilizadas en la operación a lo largo de la República Mexicana se muestra en la Figura 1.1

En PEMEX, existen 364 campos de producción, 6,080 pozos de extracción, 199 plataformas marinas, 12 centros procesadores de gas, 20 endulzadoras de gas, 19 plantas criogénicas, 1 planta de absorción, 10 fraccionadoras, 6 endulzadoras de condensados, 14 recuperadoras de azufre, 6 refinerías, 8 complejos petroquímicos, 38 plantas petroquímicas, 20 terminales de distribución de gas licuado, 77 plantas de almacenamiento y centros de ventas de productos petrolíferos, 8,985 Km de ductos de gas natural, 3,051 Km de ductos de derivados de gas natural, 4,647 Km de ductos de crudo y 9,115 Km de ductos de derivados del crudo (PEMEX, 2007).

De acuerdo al “Anuario estadístico 2007” emitido por PEMEX, el hidrocarburo que se produce en mayor cantidad en México es el petróleo pesado. La producción mensual de dicho hidrocarburo desde el año 2006 se muestra en la Figura 1.2.



Figura 1.1 Ubicación de las instalaciones de operación de PEMEX (PEMEX, 2007).

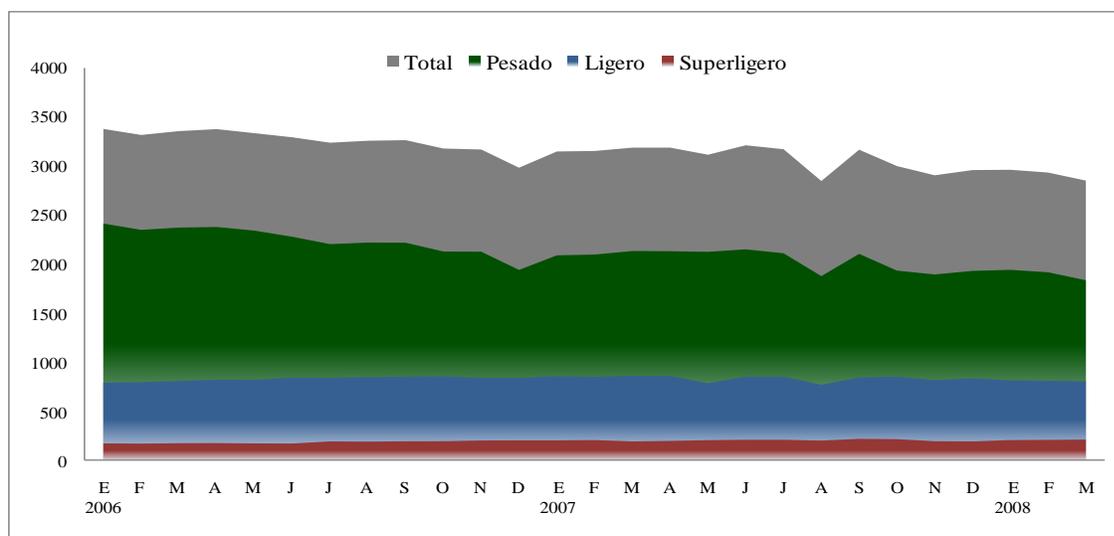


Figura 1.2 Producción de los diferentes tipos de petróleo (miles de barriles) producidos desde el 2006 (PEMEX, 2008).

1.2 Clasificación de hidrocarburos.

Los hidrocarburos se pueden clasificar en dos grandes categorías:

1.2.1 Hidrocarburos alifáticos.

Los hidrocarburos alifáticos están formados por cadenas de átomos de carbono en las que no hay estructuras cíclicas. Se les denomina, en general, hidrocarburos de cadena abierta o acíclicos. Algunos ejemplos se muestran en la Figura 1.3 (Pine, 1998).

Pueden estar subdivididos de acuerdo a su estructura en diferentes grupos: (a) alcanos, hidrocarburos saturados con enlaces simples. (b) Alquenos, son hidrocarburos insaturados con enlaces dobles. (c) Alquinos, hidrocarburos insaturados con enlaces triples (Stroud *et al.*, 2007). En la Tabla 1.1 se presentan algunos ejemplos de hidrocarburos alifáticos

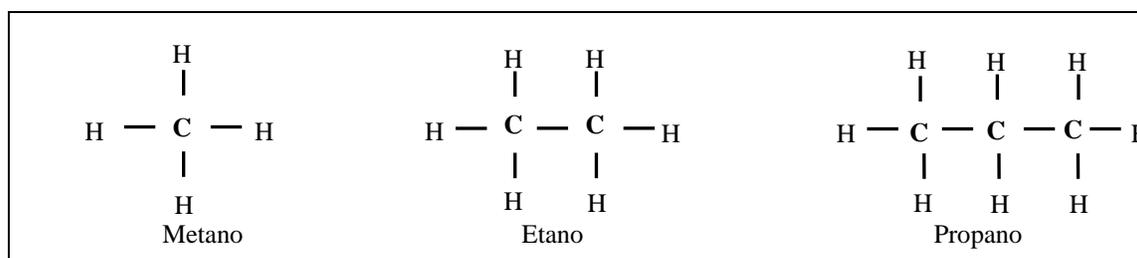
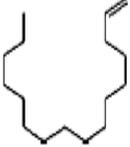
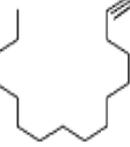


Figura 1.3 Ejemplo de hidrocarburos alifáticos, pertenecientes al grupo de los alcanos (Pine, 1998).

Tabla 1.1 Propiedades fisicoquímicas de algunos hidrocarburos alifáticos (Stroud *et al.*, 2007)

Grupo	Nombre	Formula	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estructura	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)
Alcano	Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	226.44		18	287
Alqueno	Hexadeceno	C ₁₆ H ₃₂	224.43		3-5	274
Alquino	Hexadequino	C ₁₆ H ₃₀	222.42		15	148

1.2.2 Hidrocarburos aromáticos.

Constituyen un grupo especial de compuestos que contienen en general anillos de seis carbonos, en los cuales alternan enlaces sencillos y dobles (Pine, 1998).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos formados al menos por dos anillos de seis carbonos fusionados de benceno, los cuales difieren en el número y posición del anillo aromático. Representan un grupo de más de 100 sustancias químicas diferentes que se forman durante la combustión incompleta de carbón, petróleo y gasolina, basuras y otras sustancias orgánicas (Silke *et al.*, 2004). Algunos ejemplos pertenecientes al grupo de los HAPs, se muestran en la Figura 1.4.

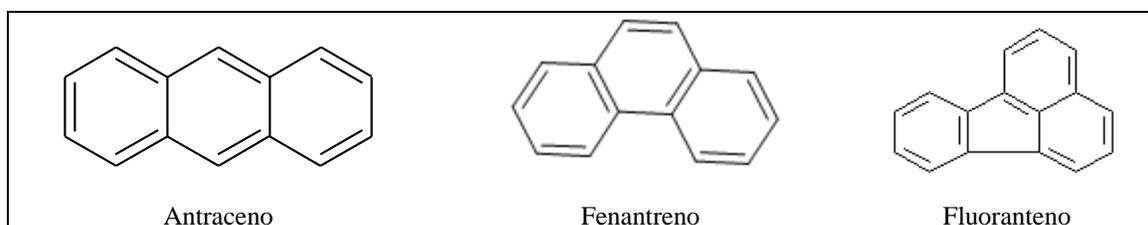


Figura 1.4 Hidrocarburos aromáticos, pertenecientes al grupo de los HAPs (Pine, 1998).

La liberación de los HAPs al ambiente es, sobre todo, por vía atmosférica debido a todos los procesos de combustión de materiales orgánicos que emiten HAPs en fase de vapor y forma particulada (hollín), aunque otros mecanismos de descarga más localizados pueden ser también el depósito de residuos sólidos municipales e industriales, aguas residuales y lodos de plantas de tratamiento que pueden tener cantidades considerables de HAPs y los derrames y descargas directas de petróleo y sus derivados en cuyo caso el receptor primario de los HAPs es el suelo o el sistema acuático (Silke *et al.*, 2004).

En suelos, la mayoría de los HAPs son fuertemente adsorbidos a la materia orgánica del mismo, reduciendo su disponibilidad tanto para ser biodegradados, como para ser absorbidos por las plantas y lixiviados al acuífero (Silke, *et al.*, 2004). En la Tabla 1.2 se presentan algunos ejemplos de hidrocarburos aromáticos con sus propiedades fisicoquímicas.

Los HAPs son compuestos no polares o muy débilmente polares que tienen afinidad por las fases orgánicas hidrofóbicas, presentando una baja solubilidad en agua. Por lo que respecta al coeficiente de distribución entre el octanol y el agua (Kow) todos los compuestos mostrados en la Tabla 1.3, tienen un coeficiente mayor a tres lo que indica baja solubilidad, inmovilidad, bajas tasas de biodegradación, tendencia a acumularse y a ser persistentes (Silke *et al.*, 2004).

Tabla 1.2 Propiedades fisicoquímicas de algunos hidrocarburos aromáticos (Stroud *et al.*, 2007)

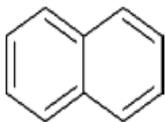
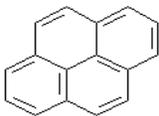
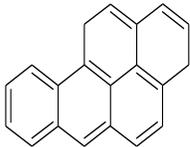
Grupo	Nombre	Formula	Peso molecular (g mol ⁻¹)	Estructura	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)
HAPs	Naftaleno	C ₁₀ H ₈	128.18		79-83	217.9
HAPs	Pireno	C ₁₆ H ₁₀	202.6		156	404
HAPs	Benzo (a) pireno	C ₂₀ H ₁₂	252.31		175-179	495

Tabla 1.3 Características de 16 HAPs (Silke *et al.*, 2004)

HPA's	Solubilidad en agua (mg/L)	Presión de vapor (kPA)	Log Kow	Notas
Naftaleno (2)	31.0	0.012	3.37	Tóxico
Acenaftileno (3)	3.5	0.004	NR	NR
Acenafteno (3)	3.9	5.81 x 10 ⁻⁴	4.00	Toxico
Fluoreno (3)	1.98	4.16 x 10 ⁻⁵	4.18	NR
Antraceno (3)	0.073	2.26x10 ⁻⁶	4.54	Carcinógeno
Fenantreno (3)	1.3	9.04x10 ⁻⁵	4.57	Carcinógeno
Fluoranteno (3)	0.26	0.0012 Pa	5.22	NR
Pireno (4)	0.14	3.33x10 ⁻⁷	5.18	Toxico
Benzo(a)antraceno (4)	0.04	2.93x10 ⁻⁹	5.75	Carcinógeno
Criseno (4)	0.002	8.38x10 ⁻⁸	5.75	Carcinógeno
Benzo(b)Fluoranteno (5)	0.0012	6.66x10 ⁻⁸	6.09	NR
Benzo(k)Fluoranteno (5)	6.0x10 ⁻⁴	7.86x10 ⁻¹²	6.3	Carcinógeno
Benzo(a)Pireno(5)	3.8x10 ⁻³	7.45x10 ⁻¹⁰	6.04	Carcinógeno
Dibenzo(a,h)Antraceno (5)	5.0x10 ⁻⁴	1.33x10 ⁻¹¹	6.75	Carcinógeno
Benzo(g,h,i)Perileno (6)	3 x 10 ⁻⁴	1.39x10 ⁻¹¹	6.86	NR
Indeno(1,2,3-cd)pireno (6)	5.3x10 ⁻²	1.33x10 ⁻¹²	6.58	Carcinógeno

* El número entre paréntesis indica el número de anillos que presenta el compuesto. NR. No reportado.

1.3 Toxicidad de los hidrocarburos para el ser humano

Los daños en el hombre producidos por los hidrocarburos, dependen de varios factores que pueden actuar juntos o por separado, como por ejemplo: el tipo de hidrocarburos en exposición, el contenido de compuestos aromáticos, la concentración y tiempo de exposición, el grado de intemperismo de los hidrocarburos y la forma en que se encuentre (emulsión, disperso, absorbido en materia orgánica) (BIOETICA, 2008).

Desde los años 90's se han encontrado un número cada vez mayor de compuestos carcinógenos (ejemplo de estos se encuentran en la Figura 1.5). De hecho, se ha sugerido que el cáncer es primordialmente una enfermedad ambiental. La eliminación de carcinógenos en el ambiente podría reducir drásticamente la incidencia de este mal (Morrison y Neilsen, 1998).

La Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos, ATSDR (por sus siglas en inglés) explica que los seres humanos pueden estar expuestos a los HAPs respirando aire contaminado si se trabaja en plantas que producen coque, alquitrán y asfalto, plantas donde se ahúman productos y en instalaciones que queman residuos municipales; respirando aire del humo de cigarrillos, emisiones del tubo de escape de automóviles, caminos de asfalto o humo de

la combustión de productos agrícolas; a través de contacto con aire, agua o tierra situados cerca de sitios con residuos peligrosos; comiendo carnes preparadas en la parrilla o bien, cereales harina, pan, hortalizas, frutas, leche o agua contaminados. Las madres que lactan y que viven cerca de sitios con residuos peligrosos pueden pasar los HAPs a los niños a través de la leche materna (Silke *et al.*, 2004).

El naftaleno, primer miembro del grupo de los HAPs prioritarios, es un contaminante común en agua. El envenenamiento agudo con naftaleno en humanos puede dar como resultado anemia hemolítica y nefrotoxicidad. Adicionalmente, se han observado cambios dermatológicos y oftalmológicos en trabajadores expuestos a naftaleno en el ambiente ocupacional. El fenantreno es conocido por ser un fotosensibilizador de la piel humana, un alérgeno moderado y mutagénico para sistemas bacteriales en condiciones específicas. La toxicidad del benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzo(a,h)antraceno e indeno (1,2,3-cd)pireno ha sido muy estudiada y existe suficiente evidencia experimental para mostrar que son carcinogénicos. Las estructuras de algunos de estos compuestos se muestran en la Figura 1.5. El riesgo de exposición es mayor por aguas superficiales, aire de lugares cerrados con fumadores y el polvo del pavimento de las carreteras. Los alimentos en los que se ha encontrado mayor contenido de HAPs son los asados al carbón o carnes ahumadas. El modo y el tiempo de cocción son importantes en los niveles de HAPs en los alimentos (Silke *et al.*, 2004).

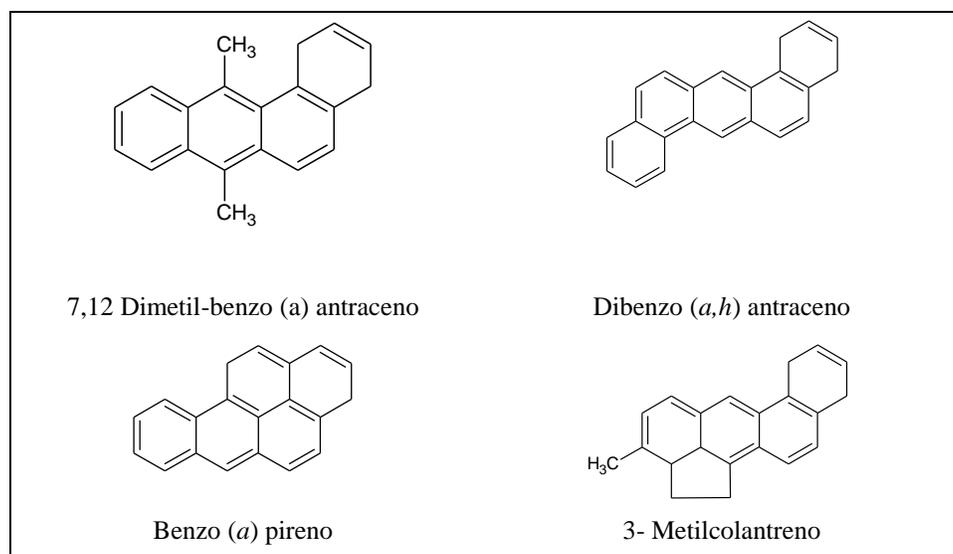


Figura 1.5 Hidrocarburos aromáticos policíclicos con mayor acción carcinógena (Morrison y Neilsen, 1998).

La toxicidad de los hidrocarburos para los seres humanos es inversamente proporcional a la viscosidad. La inhalación de productos de alta viscosidad como grasas y aceites (150-250 centipoises), no representa riesgo pero los productos de menos de 30 centipoises de viscosidad afectan al pulmón, es decir, causan neumonitis. La ingestión de destilados del petróleo en cantidades de 1 mL/kg de peso corporal produce vomito, irritación de las membranas mucosas, depresión del sistema nervioso central, cianosis, taquicardia, albuminuria, hematuria, daños hepáticos y arritmias cardiacas. La ingestión de 10 mL/kg de peso corporal produce la muerte. La Tabla 1.4 muestra las características y toxicidad de algunos hidrocarburos de amplio uso laboral y doméstico (Albert, 1998).

Tabla 1.4 Características y toxicidad específica de algunos hidrocarburos de amplio uso laboral y doméstico (Albert, 1998)

Hidrocarburo	Fuente de exposición	Vía de ingreso	Afectación	Concentraciones nocivas notables
Estireno	-Aerosoles. -Vapores producidos en la elaboración de plásticos de poliestireno, -Manufactura de resinas de poliéster y sus disolventes. -Síntesis en la industria química o farmacéutica	-Respiratoria -Cutánea -Digestiva	-Irritación grave en la piel, mucosa ocular y respiratoria -Cáncer	100 mg/kg: irritaciones en ojos y mucosa nasal. 200 mg/kg: Conjuntivitis
Benceno	-Su uso como disolventes de pinturas, colas, barnices y tintas de imprenta. -Como aditivo de gasolinas. -Síntesis de compuestos orgánicos.	-Respiratoria -Cutánea -Digestiva	-Depresión del SNC*, -Irritación cutánea, -Daño hematológico -Cáncer	2.1 ppm: en la sangre 7.1 ppm: inhalación 60 ppm: muerte
Tolueno y Xileno	-Su uso como disolvente de pinturas, colas, barnices y tintas de imprenta. -Como aditivo de gasolinas. -Síntesis de compuestos orgánicos.	-Respiratoria -Cutánea -Digestiva	-Afectaciones del SNC*, -Irritación de las vías respiratorias, ojos y piel.	Tolueno 200 ppm: toxicidad baja 500 ppm: Nauseas, cefalea, pérdida de coordinación y coma
HAPs (1,2 Benzantraceno,7, 12- dimetilbenzantraceno, 3 metilcolantreno y benzopireno)	-Ingestión de alimentos asados y ahumados, -Humo curado. -Contaminantes del aire (productos de combustión incompleta de gasolina)	-Respiratoria -Digestiva	-Cáncer	NR**

*SNC. Sistema Nervioso Central.

**NR. No reportado.

1.4 Problemática ambiental de la contaminación de suelos por hidrocarburos.

En 1962, Rachel Carson publicó su libro llamado “Silent spring”, el cual inicio la concientización del cuidado del ambiente (Henry and Heinke, 1996). Este suceso dio lugar a que los gobiernos de algunos países tomaran la iniciativa de invertir en tecnologías de descontaminación amigables con el ambiente. Años más tarde, la biorremediación cobra auge como una herramienta para restaurar sitios contaminados (Rittmann y McCarty, 2001).

Cada día se torna más difícil la relación del hombre con la naturaleza, ya que los múltiples desechos y desperdicios de las distintas actividades humanas han sido, durante mucho tiempo, inadecuadamente tratados, generando graves impactos al ambiente, por ejemplo, la industria del petróleo puede propiciar contaminación en las distintas partes de su proceso, particularmente en el suelo, inutilizando dicho medio para cualquier actividad agrícola o humana en general (Echevarría, 2003).

El suelo no es el único medio afectado, el agua igualmente sufre los efectos de la contaminación por hidrocarburos. A lo largo de la historia se han registrado accidentes debidos al transporte de hidrocarburos en el mar que han causado graves daños al ambiente. Algunos casos notables se muestran en la Tabla 1.5.

La contaminación de suelos por hidrocarburos es un problema importante en la mayor parte de los países productores. El acelerado incremento en la población mundial, ha dado como resultado la demanda de mayores cantidades de combustibles fósiles (hidrocarburos). Aunque muchos de estos compuestos se utilizan para generar energía, un alto porcentaje se libera al ambiente, por accidentes en su funcionamiento, lo cual representa un riesgo potencial para los ecosistemas (Volke y Velasco, 2003)

Tabla 1.5 Derrames de hidrocarburos en el mar (Sodhi, 2000)

Caso	País	Año	Cantidad derramada de hidrocarburo (Toneladas)
Torrey Canyon	Kuwait	1967	1.19
Amoco Cádiz	Francia	1978	4,002.33
Exxon Valdez	Estados Unidos	1989	40,000
Sea Empress	Inglaterra	1996	6,000
Nakhodka	Japón	1997	19,000

En la explotación del petróleo es durante la etapa de perforación cuando se registran los impactos más significativos contra el ambiente. Además de los posibles daños temporales ocasionados a la vegetación y la fauna en las operaciones de transporte y preparación del terreno para recibir la maquinaria y equipos necesarios, los principales contaminantes son: el barro de perforación, el petróleo y el agua salada que existe en todo yacimiento y que sale junto con el petróleo o por separado (Jiménez, 2001).

Las principales fuentes de contaminación del suelo por hidrocarburos son las actividades de explotación, refinación y transporte, aunque también inciden significativamente en este problema actividades en instalaciones como las gasolineras, la actividad ferroviaria y aeronáutica, los talleres de reparación de flotillas de autotransporte, las instalaciones industriales en general y los pequeños talleres mecánicos (SEMARNAT, 2006).

En partes del sureste mexicano se encuentran sitios con diferentes niveles de contaminación, resultado de la actividad petrolera de aproximadamente cincuenta años (Adams *et al.*, 1999). Ejemplo de estos impactos son los reportados en Isla del Carmen, centro de operaciones de las plataformas petroleras de la sonda de Campeche y en Coatzacoalcos y Minatitlán, Estado de Veracruz, ciudades organizadas en torno a grandes complejos industriales dedicados a la transformación de hidrocarburos. De manera secundaria la explotación petrolera también ha afectado a los centros urbanos de mayor importancia del sureste en especial la ciudad de Villahermosa y el interior del estado de Tabasco (Ramírez *et al.*, 2000).

Según datos del Centro de Orientación para la Atención de Emergencias Ambientales (COATEA) y de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA), el 42 % del total de las emergencias ambientales de 1993 al 2002 estuvo relacionada con petróleo crudo (Leyva e Iturbe, 2006).

Los accidentes ocurridos en México durante los últimos años, como el derrame e incendio de petróleo crudo del Pozo Ixtoc en la sonda de Campeche (1979); la explosión de gas L.P. en San Juan Ixhuatepec, Estado de México (1984); la explosión del drenaje de Guadalajara, Jalisco (1992); la explosión con etano plus en el Complejo Procesador de Gas en Reforma, Chiapas (1996); y el incendio de la Terminal de PEMEX Satélite Norte, en San Juan Ixhuatepec, Estado de México (1996), entre otros, dan una idea clara de las enormes proporciones que puede tomar

una emergencia asociada con materiales peligrosos derivados del petróleo, cuyas consecuencias, en la mayor parte de los casos, se traducen en lamentables pérdidas humanas, graves afectaciones al medio ambiente y/o cuantiosas pérdidas materiales, cuando no se toman las adecuadas medidas de prevención y no se está preparado para responder, rápida y eficazmente, a esta clase de eventos (PROFEPA,2008).

1.5 Tecnologías de biorremediación.

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados comenzó a partir de la década de los 80's y presenta varias ventajas respecto de los métodos físico-químicos tradicionales. Algunas de estas ventajas son los bajos costos de instalación y operación, la facilidad de aplicación y la efectividad (Echevarría, 2003). Sin embargo, también presenta ciertas desventajas, como lo son: el requerimiento de mayores tiempos de tratamiento, es necesario verificar la toxicidad de intermediarios y/o productos y no pueden emplearse si el tipo de suelo no favorece el crecimiento microbiano (Volke y Velasco, 2002)

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan algunos organismos vivos (hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de la utilización de los contaminantes como fuente de alimento y energía. Para que esto ocurra, es necesario favorecer las condiciones para el crecimiento y la biodegradación (Volke y Velasco, 2003).

La biorremediación implica la alianza entre sistemas biológicos y sistemas de ingeniería para la remediación de la contaminación química. Uno de los objetivos de la biorremediación es descontaminar los sitios contaminados explotando los procesos que ocurren de manera natural (Sharma, 2005).

Los procesos de biorremediación han sido exitosamente aplicados en limpieza de suelos y en la actualidad se cuenta con diversas tecnologías. La biorremediación es considerada como la más deseable aproximación a la remediación de suelos contaminados en contraste a alternativas mucho más costosas y de menor aceptación pública tales como la incineración. Las técnicas de

biorremediación correctamente aplicadas son aceptables desde el punto de vista ecológico (Ercoli *et al.*, 2003).

Las estrategias biológicas de remediación pueden emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTPs), solventes (benceno y tolueno), explosivos, clorofenoles, plaguicidas, conservadores de madera (creosota) y HAPs (Van Deuren *et al.*, 2002).

Actualmente se han desarrollado diferentes tecnologías de biorremediación cuyas principales diferencias radican en las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso, en los parámetros que son controlados o modificados, así como en el lugar en que se aplican. Hamdan (2004) enlista las tecnologías de biorremediación, su aplicación y fundamentos, las cuales se muestran en la Tabla 1.6.

Cuando se administra como es debido, la biorremediación puede reducir el riesgo de impactos adversos de compuestos tóxicos y peligrosos en el medio ambiente y puede aplicarse a enclaves contaminados con una variedad de compuestos químicos, como se muestra en la Tabla 1.7 (Atlas y Bartha, 2002).

Tabla 1.6 Tecnologías de Biorremediación (Hamdan, 2004)

Tecnología	Aplicación	Características
Bioventeo	Suelos contaminados. Tratamiento <i>in situ</i> .	Introducción de oxígeno a través del suelo, por bombeo, para estimular el crecimiento microbiano y su actividad.
Biopilas	Suelos contaminados. Se aplica <i>in situ</i> , pero puede aplicarse <i>ex situ</i> .	El material contaminado se coloca sobre la superficie del terreno en forma de pilas. Estas pilas se mezclan periódicamente para favorecer la aireación. Se pueden agregar desechos agroindustriales.
Bioestimulación	Suelos contaminados. Tratamientos <i>in situ</i> .	Aplicación de soluciones con nutrientes y/u oxígeno, a través del suelo contaminado para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos.
Biolabranza	Suelos contaminados. Tratamientos <i>in situ</i> .	Durante el proceso, la superficie del suelo contaminado es tratada en el mismo sitio del suelo arado.
Composteo	Suelos contaminados. Tratamiento <i>in situ</i> y <i>ex situ</i> . Pueden utilizarse biorreactores.	Proceso biooxidativo controlado que involucra lodos activados y sustratos orgánicos heterogéneos en estado sólido, el cual evoluciona incluyendo una fase termófila, produciendo CO ₂ , agua, minerales y un material orgánico (Composta).
Biorreactores	Suelos, sedimentos y acuíferos contaminados. Tratamiento <i>ad situ</i> y <i>ex situ</i> .	Uso de reactores para el cultivo microbiano en fase líquida o semisólida.
Fitorremediación	Suelos contaminados. Aplicación <i>in situ</i> .	Utilización de plantas para la remoción de contaminantes.

Tabla 1.7 Compuestos potencialmente aptos para la biorremediación (Atlas y Bartha, 2002)

Clase	Ejemplo	Proceso aeróbico	Proceso anaeróbico
Compuestos aromáticos monoclorados	Clorobenceno	+	+
Hidrocarburos monoaromáticos	Benceno, tolueno, xileno	+	+
Fenolitos y cresoles no halogenados	2-Metilfenol	+	+
Hidrocarburos aromáticos polinucleares	Creosota	+	-
Alcanos y alquenos	Combustible	+	-
Bifenilos policlorados	Triclorobifenilo	+	-
Clorofenoles	Pentaclorofenol	+	+
Heterocíclicos nitrogenados	Piridina	+	+
Alcanos clorados	Cloroformo	+	+
Alquenos clorados	Tricloroetileno	+	+

1.5.1 Bioventeo.

El bioventeo es una tecnología cuyo objetivo es estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. El aire se suministra en el sitio contaminado a través de pozos de extracción, por movimiento forzado (extracción o inyección), con bajas velocidades de flujo, con el fin de proveer solamente el oxígeno necesario para sostener la actividad de los microorganismos degradadores (Van Deuren *et al.* 2002).

Se utiliza para tratar compuestos orgánicos semivolátiles (COS) o no volátiles. Además de favorecer la degradación de contaminantes adsorbidos, pueden degradarse COVs, por medio de su movimiento a través del suelo biológicamente activo. Se ha utilizado con éxito para remediar suelos contaminados con HTPs, solventes no clorados, plaguicidas y conservadores de la madera, entre algunos otros químicos (Van Deuren *et al.*, 2002). Algunos factores que pueden limitar la efectividad del bioventeo son:

1. El tipo y la concentración del contaminante,
2. Falta de nutrientes;
3. Bajo contenido de humedad y
4. Dificultad para alcanzar el flujo de aire necesario (Volke y Velasco, 2002)

La Figura 1.6 muestra el proceso de bioventeo utilizado para la biorremediación de sitios contaminados, el cual consiste en el suministro de aire y nutrientes al suelo contaminado a través de un pozo de inyección y su posterior extracción, pasando por la zona de bioventeo y absorción para retener los contaminantes y sacar un aire limpio.

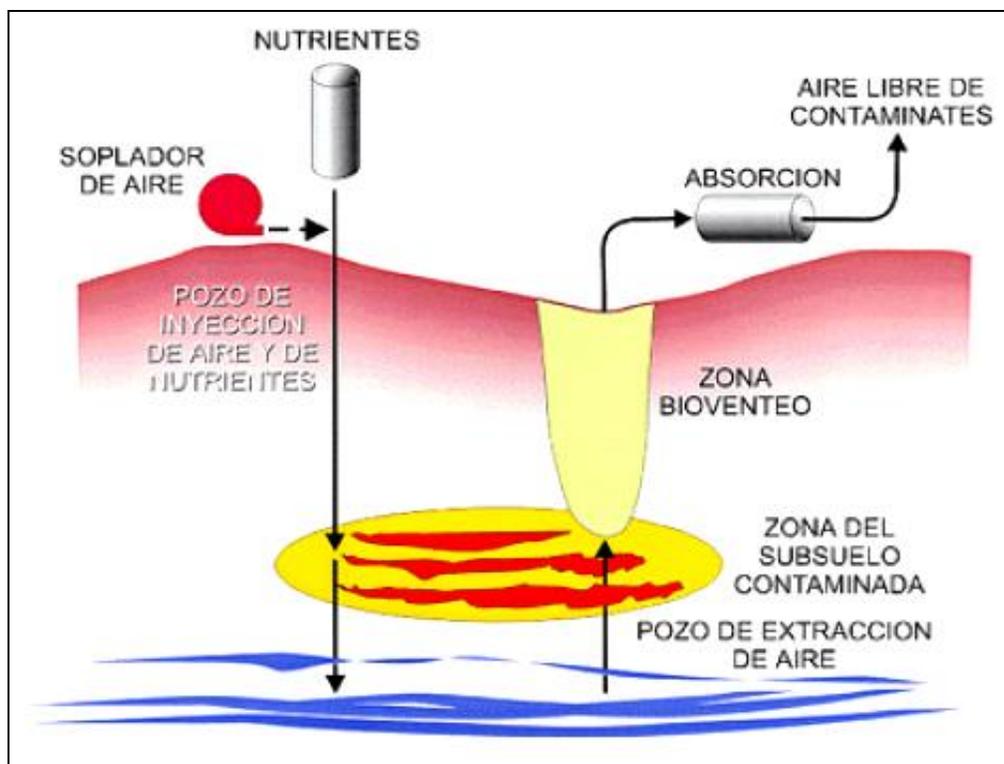


Figura 1.6 Funcionamiento del bioventeo en el proceso de Biorremediación *in situ* de agua y suelo (Peña *et al.*, 2001).

1.5.2 Bioestimulación

Bioestimulación está definida como el suministro de nutrientes que estimulan el metabolismo y la velocidad de crecimiento de los organismos degradadores (Vallejo *et al.*, 2005). Implica la adición de soluciones acuosas con nutrientes al suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos o bien, la inmovilización de contaminantes inorgánicos *in situ* (Margesin and Schinner, 2001)

Estudios previos en Colombia reportaron que la bioestimulación acelera las tasas de biodegradación en suelos contaminados con hidrocarburos, controlando factores como pH, porcentajes de humedad y la temperatura. Sin embargo, en la mayoría de estos estudios se logró incrementar la actividad de biodegradación únicamente con la adición de nutrientes en forma de fertilizantes inorgánicos compuestos y sales inorgánicas simples (Vallejo *et al.*, 2005).

1.5.3 Biolabranza

En la biolabranza, el suelo contaminado se mezcla con suelo limpio y nutrientes, y se remueve (labra) periódicamente para favorecer su aireación (Van Deuren *et al.*, 2002). El proceso de labra para favorecer la aireación durante la biolabranza se muestra en la Figura 1.7.

La biolabranza consiste en provocar la oxidación biológica de los hidrocarburos contenidos en el suelo, por medio de la estimulación de la micro flora natural. El proceso de biolabranza tiene una serie de ventajas como son: el no dejar residuos posteriores, no provocar (si se realiza en condiciones controladas) riesgos de contaminación, tanto superficial como subterránea. Debido a la migración de hidrocarburos, su impacto ambiental es mínimo, cuando el proceso está bien realizado, y puede resultar una técnica susceptible de emplearse en una gran variedad de condiciones climáticas. Además, si se realiza en condiciones óptimas, se consigue degradar una considerable proporción de los hidrocarburos contenidos en los suelos. Sin embargo, también presenta inconvenientes o desventajas, como es el tiempo necesario para eliminar los hidrocarburos (Ministerio de Medio Ambiente-Gobierno de España, 2007).



Figura 1.7 Suelo sometido a biolabranza durante su remoción para promover la aireación (Ministerio de Medio Ambiente-Gobierno de España, 2007)

La remoción de hidrocarburos por biolabranza es posible debido a la volatilización, la biodegradación y la adsorción. La efectividad de esta tecnología es más notoria en concentraciones de HTPs superiores a 50,000 ppm, logrando porcentajes de remoción mayores a 95 %. El tamaño del área de trabajo para la aplicación de dicha tecnología depende de la cantidad de suelo contaminado a tratar. El tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos por biolabranza puede estar limitado por la capacidad de aireación (Maila and Cloete, 2004)

1.5.4 Composteo

El composteo, representa una alternativa más para biorremediar sitios contaminados con residuos orgánicos como los hidrocarburos ya que es un proceso biológico mediante el cual es posible convertir dichos residuos en materia orgánica estable (Velasco y Volke, 2003). Debido a que los contaminantes orgánicos comúnmente no se encuentran en concentraciones suficientes para soportar un proceso de composteo, el material contaminado debe mezclarse con sustancias orgánicas sólidas biodegradables como aserrín, paja, bagazo, estiércol, composta madura y desechos agrícolas. Estos materiales son conocidos como materiales de contacto y se utilizan en el proceso de composteo con tres finalidades básicas:

1. Asegurar la generación del calor necesario para el proceso;
2. Mejorar el balance y disponibilidad de nutrientes (C/N) para la actividad microbiana y
3. Aumentar la porosidad de la composta y con esto la aireación y capacidad de retención de agua (Velasco y Volke, 2003).

Los principios básicos del composteo de residuos peligrosos o contaminantes orgánicos, son los mismos que para el composteo de desechos no peligrosos. En ambos casos, es necesario optimizar cinco parámetros: aireación, temperatura, humedad, relación de carbono y nitrógeno y el pH (Volke y Velasco, 2003).

Los procesos de composteo pueden aplicarse para tratar suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables. El composteo se ha usado con éxito, para la remediación de suelos contaminados con clorofenoles, gasolina, HTPs, HAPs, y se ha demostrado también una reducción en la concentración y toxicidad de explosivos hasta niveles aceptables (Van Deuren *et al.*, 2002)

1.5.5 Biopilas

Una de las tecnologías de composteo más utilizada para el tratamiento de extensas áreas de suelos contaminados, principalmente por HTPs, se lleva a cabo en condiciones aerobias y se conoce como biopilas, bioceldas, pilas de composteo o sistemas de co-composteo (Volke y Velasco, 2003).

Las biopilas, son una forma de composteo en el cual se forman pilas con el suelo contaminado y agentes de volumen. El sistema, que puede ser abierto o cerrado, se adiciona con nutrientes y agua y se coloca en áreas de tratamiento, que incluyen sistemas para coleccionar lixiviados y alguna forma de aireación (Volke y Velasco, 2003)

Para la elaboración de las biopilas la tierra contaminada se amontona en pilas de varios metros de altura sobre un sistema de distribución de aire. La aireación se realiza forzando el paso del aire por el montón de tierra con una bomba de vacío. La humedad y los nutrientes se mantienen en un nivel óptimo para la acción biocorrectiva. Los montones de tierra pueden colocarse en lugares cerrados. Los contaminantes volátiles son fáciles de controlar porque generalmente se integran a la corriente de aire que se hace pasar por la pila (EPA, 2006).

Dos de los sistemas de biopilas más empleados para el tratamiento de suelos contaminados, son las biopilas alargadas y las biopilas estáticas (Figura 1.8). La diferencia entre ambas tecnologías radica en el método de aireación que se emplea para proveer de oxígeno el proceso de composteo. En los sistemas estáticos, el material a compostear se airea por inyección (sopladores) o extracción (bombas de vacío) a través de tuberías perforadas, colocadas debajo de las pilas. En el caso de las biopilas alargadas, el material es mezclado periódicamente con el uso de un equipo móvil (tractores o máquinas diseñadas especialmente para este fin), este tipo de biopilas se considera actualmente como la alternativa más económica de composteo (Van Deuren *et al.*, 2002).

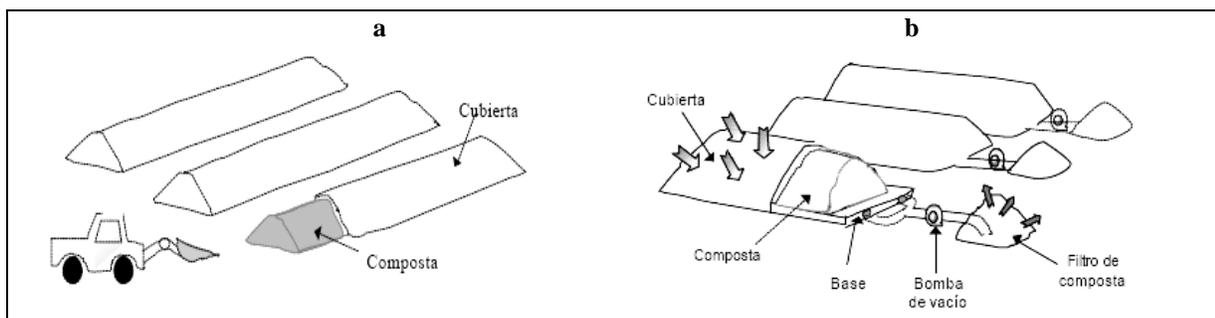


Figura 1.8 Representación esquemática de un sistema de (a) biopilas alargadas y(b) biopilas estáticas (Volke y Velasco, 2003).

1.5.6 Biorreactores.

Los biorreactores son uno de los tipos de técnicas de biorremediación *ad situ* y *ex situ* más importantes. Los tratamientos de suelo con biorreactores se han convertido en una de las mejores opciones para la biorremediación de suelos contaminados, con compuestos recalcitrantes, bajo condiciones ambientales controladas (Robles *et al.*, 2008)

Los biorreactores pueden usarse para tratar suelos heterogéneos y poco permeables, o cuando es necesario disminuir el tiempo de tratamiento, ya que es posible combinar controlada y eficientemente, procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoren y aceleren la biodegradación (Riser-Roberts, 1998).

Es la tecnología más adecuada cuando existen peligros potenciales de descargas y emisiones. Uno de los reactores más utilizados para biorremediar suelos es el biorreactor de lodos, en el cual el suelo contaminado se mezcla constantemente con un líquido, y la degradación se lleva a cabo en la fase acuosa por microorganismos en suspensión o inmovilizados en la fase sólida. El tratamiento puede realizarse también en lagunas construidas para este fin o bien en reactores sofisticados con control automático de mezclado (Volke y Velasco, 2003).

Los biorreactores de lodos aerobios, se utilizan principalmente para tratar HTPs, Compuestos Orgánicos Semivolátiles (COS's) no halogenados y Compuestos Orgánicos Volátiles (COVs). Se utilizan también reactores secuenciales de lodos aerobios/anaerobios para tratar Bifenilos

Policlorados (BPCs), COS halogenados, plaguicidas y desechos de artillería (Van Deuren *et al.*, 2002). Algunos factores que pueden limitar el uso y efectividad de los biorreactores son:

1. El suelo debe tamizarse
2. Suelos heterogéneos y arcillosos pueden generar problemas de manipulación
3. Los productos intermediarios pueden ser más tóxicos que el contaminante original
4. Los residuos pueden requerir de tratamiento o disposición final (Van Deuren *et al.*, 2002, Riser- Roberts, 1998).

1.5.7 Fitorremediación

La fitorremediación es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como *ex situ*. Los mecanismos de fitorremediación incluyen la rizodegradación, la fitoextracción, la fitodegradación y la fitoestabilización (Van Deuren *et al.*, 2002).

La rizodegradación se lleva a cabo en el suelo que rodea a las raíces. Las sustancias excretadas naturalmente por éstas, suministran nutrientes para los microorganismos, mejorando así su actividad biológica. Durante la fitoextracción, los contaminantes son captados por las raíces (fitoacumulación), y posteriormente éstos son traslocados y/o acumulados hacia los tallos y hojas (fitoextracción). En la fitoestabilización, las plantas limitan la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo, debido a la producción en las raíces de compuestos químicos que pueden adsorber y/o formar complejos con los contaminantes, inmovilizándolos así en la interfase raíces-suelo. La fitodegradación consiste en el metabolismo de contaminantes dentro de los tejidos de la planta, a través de enzimas que catalizan su degradación (Volke y Velasco, 2003).

Puede aplicarse eficientemente para tratar suelos contaminados con compuestos orgánicos como Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos (BTEX); solventes clorados; HAPs; BPCs; desechos de nitrotolueno; agroquímicos clorados y organofosforados; además de compuestos inorgánicos

como Cd, Cr(VI), Co, Cu, Pb, Ni, Se y Zn. Se ha demostrado también su eficiencia en la remoción de metales radioactivos y tóxicos de suelos y agua (Van Deuren *et al.*, 2002).

Se ha comprobado que las raíces de la mora roja (*Morus rumbra*), liberan compuestos fenólicos al suelo, los cuales sirven como fuente de carbono para el crecimiento de bacterias degradadoras de BPCs (Goetz and Brenner, 2002)

Existen varias limitaciones que deben considerarse para su aplicación:

- El tipo de plantas utilizado determina la profundidad a tratar.
- Altas concentraciones de contaminantes pueden resultar tóxicas.
- Puede depender de la estación del año.
- No es efectiva para tratar contaminantes fuertemente sorbidos.
- La toxicidad y biodisponibilidad de los productos de la degradación no siempre se conocen y pueden movilizarse o bioacumularse en animales.

1.5.8 Bioaumentación

En los procesos de biorremediación se utilizan diversas estrategias para acelerar la biodegradación de los contaminantes que se encuentran en un sitio contaminado, una de estas estrategias es la bioaumentación la cual se define como la adición o introducción de microorganismos endógenos o exógenos en un sitio determinado, para promover y acelerar una actividad biológica específica, como puede ser la degradación de un contaminante (Smith *et al.*, 2005).

La bioaumentación se utiliza cuando se requiere un tratamiento inmediato del sitio contaminado o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Consiste en la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Velasco y Volke, 2003)

Se ha usado para tratar suelos contaminados con herbicidas (2,4-D, clorofam), insecticidas (lindano, clordano, paratión), clorofenoles (PCP) y nitrofenoles, BPC, HTP y HAP. También se

ha aplicado efectivamente para tratar desechos con concentraciones relativamente altas de metales (Volke y Velasco, 2003)

Antes de llevar a cabo la bioaumentación en un sitio, deben realizarse cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono, y cultivarlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Volke y Velasco, 2003).

1.6 Factores que influyen en la biorremediación.

Para que una técnica de biorremediación opere eficientemente, deben cumplirse varias condiciones: el residuo debe ser susceptible de degradarse biológicamente, y presentarse en una forma física que sea aprovechable por los organismos; deben estar disponibles los microorganismos apropiados, y las condiciones ambientales (temperatura, pH, humedad, disponibilidad de oxígeno y disponibilidad de nutrientes) deben ser las apropiadas (BIOETICA, 2008).

Temperatura: La temperatura del suelo afecta considerablemente la actividad microbiana y las tasas de biodegradación. La mayoría de las especies bacterianas presentes en los suelos son clasificadas como mesófilas, las cuales se desarrollan entre 15°C y 45°C, teniendo un intervalo de crecimiento óptimo entre 25°C y 35°C. Por regla general, se considera que aproximadamente por cada 10°C de incremento en la temperatura, la tasa de biotransformación se duplica. Ello se atribuye a un aumento en la solubilidad del contaminante y a una disminución de los compuestos adsorbidos en la matriz del suelo, conforme aumenta la temperatura. De esta forma, se maximiza la biodisponibilidad del compuesto contaminante, resultando en un crecimiento en la tasa de biodegradación (Van Deuren *et al.*, 2002).

pH: La presencia de contaminantes extremadamente ácidos ó alcalinos, pueden llevar el pH del suelo a valores inhibitorios para el desarrollo microbiano. El crecimiento de muchos microorganismos, particularmente del suelo, es máximo a pH cercano a la neutralidad, es decir en un intervalo de 6.5 a 8. El pH del suelo afecta también la solubilidad del fósforo, un nutriente importante para los microorganismos y el transporte de metales peligrosos presentes en muchos

contaminantes. La solubilidad del fósforo se maximiza a pH 6.5 y el transporte de metales se minimiza a valores de pH superiores a 6 (BIOETICA, 2008).

Humedad: Se considera que la humedad adecuada para la actividad microbiana se encuentra entre el 40 y 60 % para sistemas aerobios. En suelos con humedad mayor al 70 % se reduce la transferencia de oxígeno y disminuye de manera significativa la actividad microbiana. Suelos con poca humedad presentan zonas secas lo cual ocasiona una disminución de la actividad microbiana (Arce, 2004).

Disponibilidad de oxígeno: El oxígeno (O₂) puede constituir uno de los factores limitantes para el desarrollo del proceso de biodegradación en suelos, sedimentos y acuíferos. La presencia del oxígeno como aceptor terminal de electrones es esencial en el metabolismo microbiano aeróbico. En particular, los pasos iniciales en la biodegradación de hidrocarburos, implican generalmente, la oxidación del sustrato mediante oxigenación, lo cual supone una gran demanda de este elemento. La concentración de oxígeno en el suelo, puede ser aumentada labrando, drenando y/o volteando el suelo no saturado, para incorporar el oxígeno atmosférico en el sistema. La oxigenación es muchas veces el paso inicial del catabolismo de hidrocarburos. La disponibilidad de oxígeno en suelos depende del consumo microbiano, del tipo de suelo o si se encuentra inundado (Atlas y Bartha, 2002).

Disponibilidad de nutrientes: El metabolismo microbiano está orientado hacia la reproducción de los organismos. Ello requiere que los componentes químicos de la célula se encuentren disponibles para la asimilación y síntesis del nuevo material celular. Los nutrientes necesarios son asimilados sólo si se encuentran en determinados estados elementales, es por ello que la cantidad y el estado de los mismos, es muy importante en el diseño y operación de los tratamientos biológicos de suelos y aguas contaminados. El carbono, el nitrógeno y el fósforo son los nutrientes de mayor importancia. Éstos pueden limitar la velocidad de degradación microbiana, si no se encuentran en concentraciones suficientes y en un estado asimilable por los microorganismos (Atlas y Bartha, 2002).

1.7 Antecedentes

Desde el año 1976 un grupo de investigación de la Universidad de Barcelona ha trabajado en el campo de los procesos de biodegradación microbiana aeróbica de hidrocarburos logrando en la actualidad resultados prometedores en la remoción de petróleo mediante cepas aisladas. Los trabajos iniciales se centraron en aguas industriales contaminadas por hidrocarburos, donde se estudiaron distintos procesos de bioestimulación de la microbiota autóctona, y la optimización de las condiciones de biodegradación. Asimismo, se obtuvieron consorcios microbianos que se adaptaron a distintas familias de hidrocarburos del crudo ligero, el crudo pesado degradado y la gasolina, que también fueron utilizados en ensayos de inoculación de aguas o suelos. Posteriormente, se amplió el campo de investigación a la biorremediación de los suelos contaminados con hidrocarburos, con la aplicación de ensayos de tratabilidad y realización de pruebas a escala piloto (Viñas, 2005).

La mayor parte de los estudios realizados se han llevado a cabo con cepas bacterianas individuales o con la combinación de diferentes cepas aisladas entre las que destacan: *Pseudomona sp F21*, *Arthrobacter sp F101*, *Pseudomona mendocina MC2*, *Sphingomona paucimobilis JS5* y *Sphingomona JS1* (Viñas, 2005).

En 2003, Yerushalmi y colaboradores, realizaron un estudio, con muestras de suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo tomadas en Quebec, Canadá, las cuales presentaban una baja capacidad de degradación de HTPs de manera natural, a pesar de la alta capacidad de mineralización de hidrocarburos aromáticos. Se probaron algunas estrategias de biorremediación como: la bioestimulación, la cual no logró una gran remoción de hidrocarburos; la bioaumentación, que removió de 20.4 % a 49.2 % y los biorreactores, donde la remoción de HTPs fue de 70 % en 45 días (Yerushalmi *et al.*, 2003)

Volke y Velasco en el año 2003, llevaron a cabo la biorremediación por composteo de un suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos del petróleo (45,000 mg/kg). Con el objetivo de incrementar la biodisponibilidad de los contaminantes para los microorganismos degradadores, antes de comenzar el proceso de biorremediación por composteo, el suelo intemperizado fue sometido a tres tratamientos fisicoquímicos: electroquímico (EQ), adición de surfactantes (S) y, adición de tolueno como solvente (T). Cada porción de suelo tratado se mezcló con cuatro

aditivos (bagazo de caña, de zanahoria, estiércol de caballo y composta) con la finalidad de incrementar el contenido de nutrientes y de microorganismos en los sistemas de composteo utilizados (biopilas alargadas). Las tres biopilas con suelo tratado, más una biopila control con suelo sin tratar (30 kg/biopila), se mantuvieron protegidas de la intemperie durante 206 días y se realizaron muestreos periódicos para determinar la eficiencia de cada tratamiento en la biodegradación de los HTPs presentes en el suelo (Volke y Velasco, 2003).

A partir del primer muestreo, a los 20 días, se observó una biodegradación significativa de HTPs en las biopilas tratadas (S: 27 %; EQ: 22 %; T: 12 %), en comparación con el control (10%). Después de 206 días, los valores de biodegradación fueron: 48 % (± 1) para EQ, 46 % (± 4) para S, 39 % (± 1) para T y 36 % (± 3) para el control, equivalente a una disminución en el contenido de HTP de 20,304, 19,892, 16,712 y 14,852 mg/kg, respectivamente. Los valores de degradación obtenidos en los sistemas de biopilas fueron muy satisfactorios, considerando que el tiempo del tratamiento fue de 7 meses y que se utilizó un suelo intemperizado, en el cual los contaminantes se encuentran sorbidos, limitando su biodisponibilidad y con ello su biodegradación. El incremento en la biodegradación en las biopilas tratadas en comparación con un control, indican que los pretratamientos aumentaron la biodisponibilidad de los contaminantes inicialmente sorbidos (Volke y Velasco, 2003).

La contaminación ambiental, a pesar del significativo aumento de la conciencia ecológica, es todavía un gran problema. En años recientes la biorremediación se ha convertido en uno de los métodos usados en la restauración de sitios contaminados con hidrocarburos. Muchas especies microbianas tales como bacterias, hongos y levaduras (Tabla 1.8) están implicadas en procesos de biodegradación (Kaczorek *et al.*, 2005).

La alteración de ecosistemas terrestres por contaminación con hidrocarburos, es hoy en día uno de los problemas ambientales más importantes. En Colombia, la industria eléctrica utiliza aceite dieléctrico como sistema aislante en los transformadores de distribución y potencia, los cuales deben someterse a mantenimiento periódicamente, generando desechos aceitosos como la tierra fuller y el papel kraft. En el año 2006, Duran y Contreras, realizaron una investigación en la que se evaluó un procedimiento que combina el lavado de la tierra fuller con agua y detergente a 70°C, seguido con un proceso de biolabranza, obteniéndose una disminución total de hidrocarburos de petróleo superior al 73 % (Duran y Contreras, 2006).

Tabla 1.8 Microorganismos capaces de degradar petróleo crudo y sus derivados (Feijoo *et al.*, 2003)

Bacterias	Levaduras	Hongos
<i>Achromobacter</i>	<i>Candida</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Cryptococcus</i>	<i>Botrytis</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Endomyces</i>	<i>Cephalosporiu</i>
<i>Arthrobacter</i>	<i>Hansenyla</i>	<i>Chaetomium</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Mycotorula</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Pichia</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Cornybacterium</i>	<i>Rhodotorula</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Torulopsis</i>	<i>Phanerochaete</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Trichosporon</i>	<i>Bjerkandera</i>
<i>Pseudomonas</i>		<i>Trichoderma</i>
<i>Vibrio</i>		

En Corea, en el año 2006, Baek y colaboradores, realizaron una investigación, en la cual se valoraron los índices de degradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, por *Nocardia sp. H17-1*. La composición de los hidrocarburos de la muestra fue la siguiente: 58.1 ± 3.7 %, de hidrocarburos alifáticos, 10.5 ± 2.6 % aromáticos, 18.2 ± 1 % resinas y 13.4 ± 0.8 % asfaltenos. La incubación se llevó a cabo por seis días a 30°C y en agitación. *Nocardia sp. H17-1* degradó rápidamente durante los dos primeros días de incubación la fracción alifática, sin embargo, la fracción aromática fue degradada más lentamente. Después de 6 días de incubación, los hidrocarburos alifáticos y aromáticos separados de crudo ligero, fueron degradados en 99 % y 23.8 % respectivamente (Baek *et al.*, 2006).

En el año 2007 Straud y colaboradores, realizaron un estudio en el cual analizaron las interacciones entre los hidrocarburos alifáticos y los microorganismos presentes en el suelo, encontrando que los organismos autóctonos eran capaces de degradar compuestos alifáticos (C_{14} - C_{20}), sin embargo la capacidad de biodegradación de dichos organismos era limitada, por lo que se probó la bioestimulación para aumentar los porcentajes de remoción (Straud *et al.*, 2007).

Minai y Herfatmanesh, en el año 2007, realizaron un estudio en el cual evaluaron la biodegradación de las fracciones alifáticas y aromáticas en un suelo contaminado con petróleo. El efecto de fertilizantes químicos y del estiércol de animales fue comparado y la reducción de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos fue estudiada durante 8 meses. Se montaron 6 sistemas. Los tres primeros fueron sistemas control, lo cuales variaban por el porcentaje de humedad y aireación del suelo; al sistema 4 se le agregó estiércol de animales en una proporción de 5 % del

total; al sistema 5 se le agregaron fertilizantes químicos (fosfatos y nitratos) y el sistema 6 recibió el mismo tratamiento que el sistema 5 pero además se le agregó un 10 % de aserrín. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: La remoción más alta de HTPs se obtuvo en el sistema 6 (56 %); seguido del sistema 4 (46 %). El sistema 4 removió los hidrocarburos alifáticos en un 62 % y el 6 en un 68 %. El sistema 6 removió hidrocarburos aromáticos en un 58 % y el 4 en un 54 %. Los demás sistemas presentaron remociones muy por debajo de los sistemas 4 y 6 (Minai y Herfatmanesh, 2007).

Debido a la existencia de un gran número de áreas contaminadas con HTPs, en Egipto se han empezado a tomar medidas para remediar estos sitios. Al principio los métodos químicos y mecánicos eran los más usados, actualmente estas técnicas son consideradas inadecuadas para la completa remoción de los contaminantes y en su lugar han surgido distintas técnicas de biorremediación que representan una alternativa viable de descontaminación de suelos. Por ejemplo, en el año 2008 se logró, en estudios a nivel microcosmos, la biorremediación por bioaumentación de un suelo contaminado con petróleo crudo, utilizando algunas bacterias autóctonas, las cuales fueron previamente aisladas. Las bacterias utilizadas fueron *Pseudomonas aeruginosa* y *Brevibacterium casei* y después de 60 días, los resultados obtenidos fueron de 64 % y 58 % de remoción respectivamente (Farahat and El-Gendy, 2008).

1.8 Justificación

La obtención de hidrocarburos en México y el deterioro ambiental que le es inherente, abarcan grandes extensiones del territorio nacional. El alto consumo del petróleo hace que cada vez se instalen nuevos centros de explotación para cubrir la demanda. Paralelo a la creación de dichos centros, se generan asentamientos humanos con su correspondiente demanda de servicios, generación de aguas residuales y residuos sólidos. Al no estar preparada la zona para soportar los nuevos cambios, la alteración del medio es potenciada junto con los perjuicios ocasionados por la actividad petrolera (Jiménez, 2001)

Durante 2006 el volumen de hidrocarburos líquidos derramados en instalaciones y ductos de PEMEX fue de 25,707 barriles (3,432.91 toneladas); sin embargo, fuera de PEMEX, el volumen que se pierde por actos ilícitos (tomas clandestinas descontroladas) representó el 26% del volumen total (PEMEX, 2006). El reporte de derrames en el año 2006 se presenta en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9 Derrames líquidos ocurridos durante el 2006 reportados por PEMEX (PEMEX, 2006)

Organismos	Número	Volumen derramado estimado (barriles)	Cantidad derramada estimada (toneladas)
PEMEX Exploración y Producción	220	3,410.10	487.95
PEMEX Refinación	58	22,297.07	2,944.96
TOTALES	278	25,707.17	3,432.91

Debido a la magnitud del problema de contaminación por hidrocarburos, es apremiante la búsqueda de soluciones redituables y a corto plazo y sin generar impactos acumulativos al área afectada, por tanto, la biorremediación por bioestimulación, bioaumentación y composteo encaja adecuadamente con el objetivo de descontaminación del suelo.

Entre las distintas tecnologías disponibles para la descontaminación de un suelo, es importante diferenciar aquellas que suponen una solución temporal, o el posible traslado del contaminante a otros compartimentos ambientales, de aquellas que potencialmente pueden transformar los contaminantes en productos inocuos (Viñas, 2005).

La Biorremediación tiene ciertas ventajas respecto a los métodos fisicoquímicos (excavación, extracción química e incineración) tanto por su menor costo económico, como por la no afectación de otros compartimentos ambientales (Viñas, 2005); pero también tiene desventajas como son los mayores tiempos de tratamiento y la necesidad de que el sitio a tratar pueda dar sustento a los microorganismos que realizan la degradación del contaminante (Volke y Velasco, 2002).

En la biorremediación de un sitio contaminado, una disminución en la actividad microbiana provoca una disminución de la degradación y aumenta el periodo de tratamiento; por ello el éxito del proceso depende de la capacidad para poder crear y mantener las condiciones ambientales necesarias para el crecimiento microbiano. Existe el riesgo de que ciertos compuestos originalmente inocuos puedan ser convertidos en productos tóxicos para una u otra especie (Velasco y Volke, 2003).

La eficacia de las medidas biocorrectivas es limitada en lugares con concentraciones elevadas de hidrocarburos, por ser compuestos tóxicos para los microorganismos en grandes cantidades (Van Deuren *et al.*, 2002)

1.9 Objetivos

1.9.1 Objetivo general

- Evaluar la remoción de hidrocarburos de un suelo contaminado, usando las técnicas de composteo, bioestimulación y bioaumentación en sistemas a nivel microcosmos.

1.9.2 Objetivo específico

- Determinar la actividad biológica en ensayos de biorremediación, cuantificando parámetros como remoción de carbono orgánico y fósforo disponible.
- Evaluar dentro de la técnica de composteo la eficacia de diferentes materiales de contacto.
- Comparar la eficacia de las técnicas de biorremediación aplicadas.

CAPITULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Plan de trabajo

La parte experimental de este estudio se realizó en las instalaciones de los laboratorios de Microbiología Ambiental e Institucional de Química de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) unidad Chetumal, Quintana Roo, y en el laboratorio de Xenobióticos del CINVESTAV-IPN. En la Figura 2.1 se esquematiza el plan de trabajo que se siguió en la presente investigación.

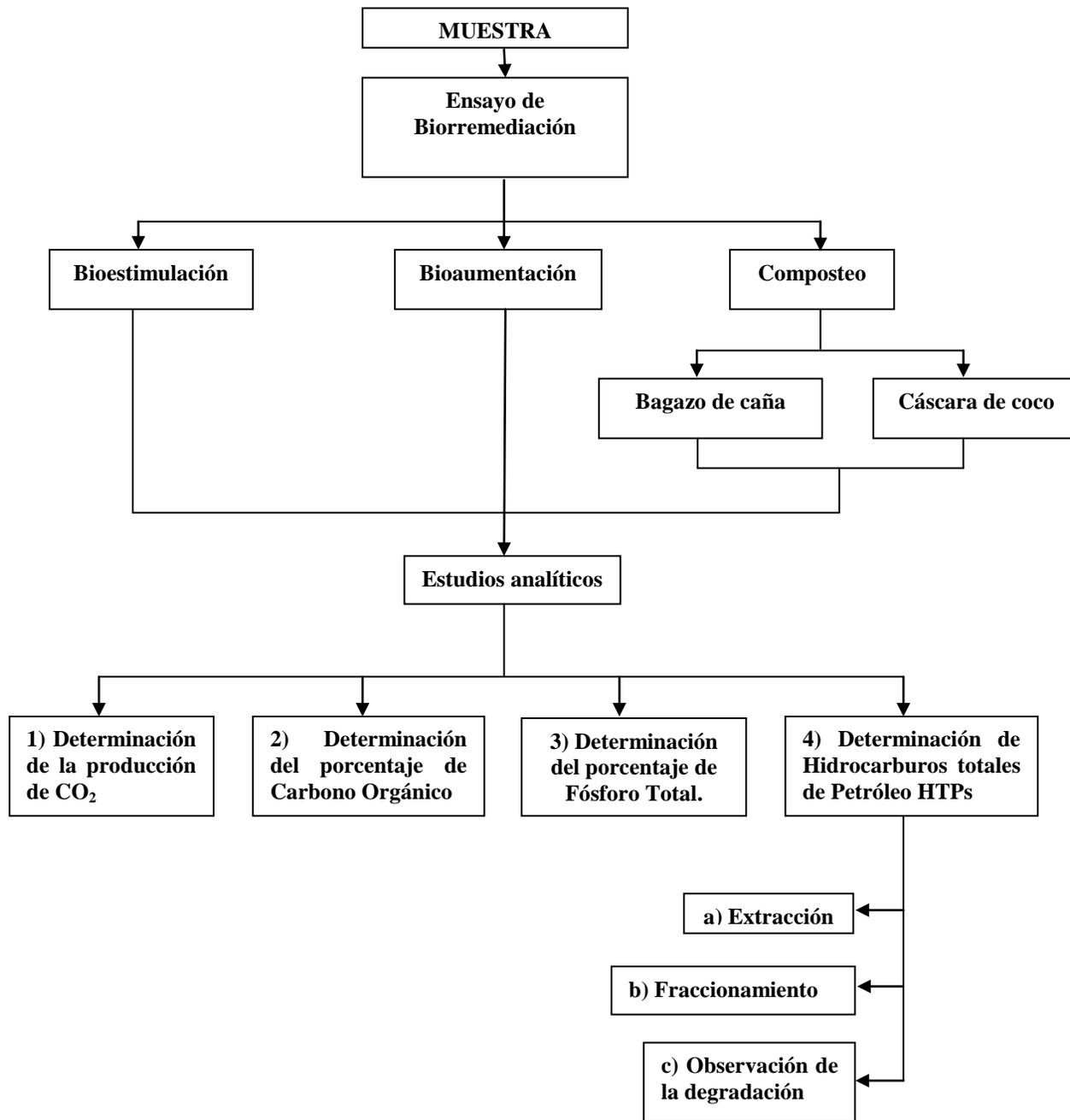


Figura 2.1 Plan de trabajo.

2.2 Evaluación de sistemas de biorremediación a nivel microcosmos

Con el fin de cubrir los objetivos de esta investigación, se realizaron cuatro sistemas a nivel microcosmos, donde se llevaron a cabo ensayos de biorremediación por composteo utilizando residuos agrícolas (bagazo de caña y cáscara de coco), bioestimulación y bioaumentación.

El suelo que se utilizó en todos estos sistemas provino de un sitio contaminado con hidrocarburos del estado de Tabasco. Antes de montar los sistemas fueron tamizados 450 g de este suelo en una malla de 2 mm y se le determinaron las siguientes características fisicoquímicas al igual que a los residuos agrícolas con el propósito de establecer la relación Carbono/Nitrógeno/Fósforo (C/N/P).

- Carbono orgánico total (método de Walkley y Black),
- Fósforo disponible (método de Bray modificado)
- Nitrógeno total (método de Kjeldahl)

Para realizar el ensayo de bioaumentación el equipo de trabajo de Biotecnología Ambiental de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) cuenta con cepas capaces de utilizar como única fuente de carbono un destilado de petróleo. Las cepas fueron obtenidas del suelo referido de Tabasco, mediante la técnica de enriquecimiento en medio líquido.

En los cuatro sistemas se adicionó nitrógeno y fósforo para mantener una relación C/N/P mínima de 100/10/1 respectivamente. La fuente de nitrógeno utilizada fue urea y la de fósforo, fosfato de potasio monobásico. La humedad se mantuvo entre 40 y 50 %. Esta se cuantificó con una balanza para humedad de halógeno MB35 marca OHAUS. El montaje de los sistemas se observa en la Figura 2.2.

Las diferencias en cada uno de los sistemas se describen a continuación:

Sistema 1 Control:

100g de suelo seco, adición 1.2 g de urea y 0.12 g fosfato de potasio monobásico, con la humedad entre el 40 y 50 %.

Sistema 2 Composteo-caña:

100g de suelo seco, adición 2 g de urea, 0.12 g de fosfato de potasio monobásico, 10g de bagazo de caña, con la humedad entre el 40 y 50 %.

Sistema 3 Composteo- coco:

100g de suelo seco, adición 2 g de urea, 0.17 g de fosfato de potasio monobásico, 15g de cáscara de coco, con la humedad entre el 40 y 50 %.

Sistema 4 Bioaumentación:

100g de suelo seco, adición de 1.21 g de urea, 0.12 g de fosfato de potasio monobásico y 0.1g de biomasa del inóculo adaptado, con la humedad entre el 40 y 50 %.

En cada uno de los sistemas de biorremediación se llevó a cabo la evaluación de los siguientes parámetros: producción de CO₂, humedad, HTPs (fracción alifática y aromática), carbono orgánico total (COT) y fósforo disponible. La frecuencia con que se evaluaron los parámetros antes mencionados, así como los métodos usados se indican en la Tabla 2.1.

En cada muestreo se tomaron aproximadamente 9 g de los diferentes sustratos en diferentes tiempos desde 0 a 60 días.



Figura 2.2 Sistemas de biorremediación en los recipientes de ensayo.

Tabla 2.1 Parámetros evaluados, frecuencia y método utilizado.

Determinación	Frecuencia	Método
Producción de CO ₂	Diario	ISO 9439(1999)
HTPs	Semanal	Fernández (2006)
COT	Semanal	NMX-AA-021-1985
Fósforo disponible	Semanal	Fernández (2006)

2.3 Estudios analíticos

2.3.1 Determinación de la producción de CO₂

Como una medida de evaluar la actividad biológica en los sistemas se determinó la producción de CO₂ siguiendo la norma ISO 9439:1999- *“Evaluación de la biodegradabilidad aerobia final de los compuestos orgánicos en medio acuoso. Método por valoración del dióxido de carbono producido”*. El montaje del sistema con los aditamentos para el respirómetro se muestra en la Figura 2.3.

Los sistemas se montaron con frascos de cristal de 1 L para el contenedor de agua, 600 mL para la trampa de CO₂, 700 mL para los recipientes de ensayo y 350 mL para la trampa de CO₂ con indicador y se interconectaron con mangueras de plástico. El suministro de aire fue realizado con ayuda de una bomba de pecera, con capacidad de 1.6 L/min. Para mantener los frascos herméticamente sellados se utilizó cinta teflón.

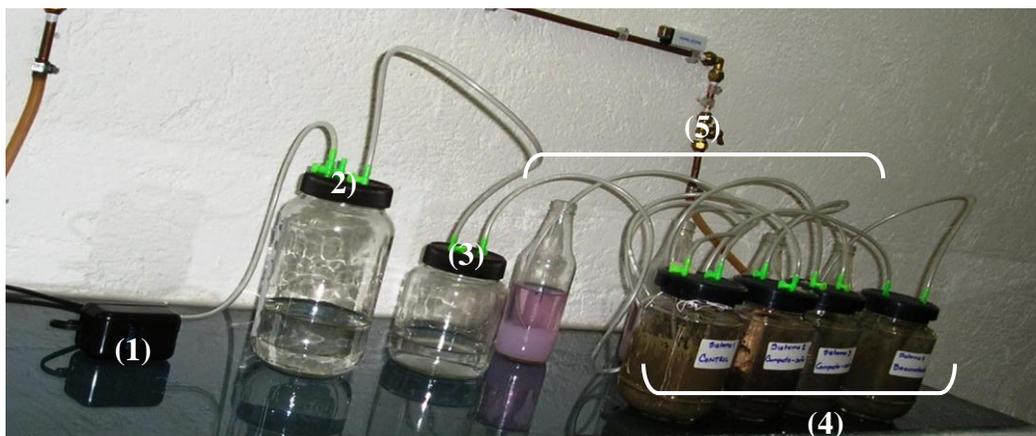


Figura. 2.3 Respirómetro montado para evaluar la producción de CO₂. (1) Bomba, (2) Agua, (3) Trampa de CO₂, (4) Recipientes de ensayo, (5) Trampa de CO₂ con indicador.

El recipiente con agua (2) tuvo el propósito de humedecer el aire suministrado por la bomba. La trampa de CO₂ (3), se puso con el fin de capturar el CO₂ que pudiera acarrear en el aire que fluía por el sistema antes de entrar a los recipientes de ensayo (4) y se preparo con 80 g de NaOH diluidos en 200 mL de agua. La trampa de CO₂ con indicador (5) fue preparada con 200 mL de agua, 2 g de Na₂HPO₄ usando fenolftaleína como indicador.

Para determinar la producción de CO₂ en cada uno de los sistemas se tomaron 25 mL del contenido de la trampa de CO₂ con indicador (5) conectada al respirómetro durante 24 horas y se titularon con una solución de NaOH 0.01 N. Los cálculos se describen a continuación:

$$mgCO_2 = \left(\frac{2C_{Na} \times V_0}{C_{NaOH}} - V_A \frac{V_{BT}}{V_{BZ}} \right) \times C_{NaOH} \times 22 \quad (i)$$

Donde:

C_{Na}= Concentración de la solución de Na₂HPO₄ en moles por litro.

V_{B0}= Volumen en mililitros de la solución de Na₂HPO₄ al comienzo del ensayo.

C_{NaOH}= Concentracion de la solución de NaOH en moles por litro.

V_A= Volumen en mililitros de la solución de NaOH gastados en la titulación de la solución de Na₂HPO₄ contenida en la trampa de CO₂ con indicador (5).

V_{BT}= Volumen en mililitros de la solución de Na₂HPO₄ preparados al inicio.

V_{BZ}= Volumen en mililitros de las alícuotas de la solución de Na₂HPO₄ utilizados para la titulación

2.3.2 Determinación del porcentaje de COT.

Para determinar el porcentaje de COT se siguió el siguiente procedimiento:

1. Se pesaron 0.1 g de muestra y se colocaron en un matraz erlenmeyer de 200 mL.
2. Se agregaron 5 mL de K₂Cr₂O₇ 2N.
3. Se agregaron 20 mL de H₂SO₄ concentrado y se agitó de manera manual por 1 minuto.
4. Se dejó reposar por media hora y después se agregaron 100 mL de agua destilada
5. Se adicionaron 10 mL de H₃PO₄ concentrado y una gota de difenilamina al 1%.
6. Una vez homogenizada la mezcla se tituló con FeSO₄ 0.5N. El procedimiento para la determinación del porcentaje de carbono orgánico se ilustra en la Figura 2.4.

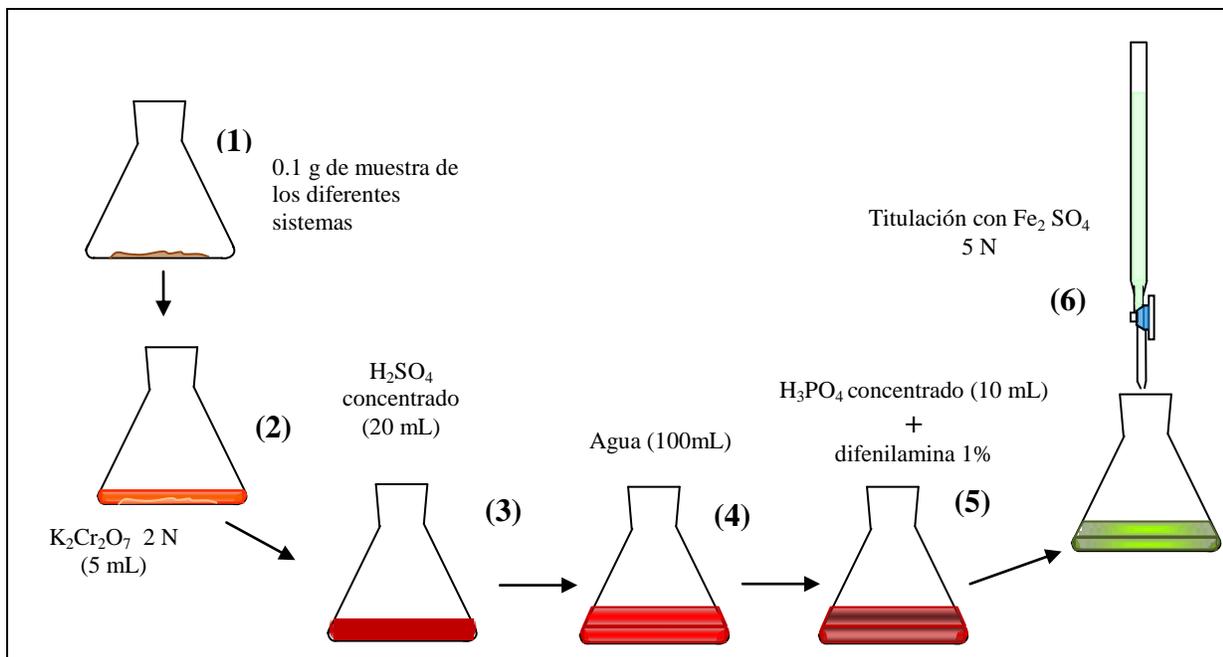


Figura 2.4 Determinación del porcentaje de COT.

Los cálculos se hicieron con base en la siguiente fórmula:

$$\%MateriaOrganica = \frac{(V_1 N_1 - V N F)_K}{P} \quad (i)$$

$$F = \frac{V_0 N_1}{V_B N} \quad (ii)$$

$$\%CarbonoOrganicoTotal = \frac{\%Materiaorganica}{1.724} \quad (iii)$$

Donde:

V_1 = Volumen de solución de $K_2Cr_2O_7$ empleado en la muestra (5 mL).

N_1 = Normalidad de la solución de $K_2Cr_2O_7$.

V = Volumen de la solución de $FeSO_4$ gastado en la titulación de la muestra en mL.

N = Normalidad de la solución de $FeSO_4$.

P = Peso de la muestra en gramos.

F = Factor de corrección.

V_0 = Volumen de la solución de $K_2Cr_2O_7$ empleado en el blanco en mL.

V_B = Volumen de $FeSO_4$ gastado en la titulación del blanco en mL.

$K = 0.69$ (constante obtenida del valor miliequivalente de carbono y el factor de recuperación obtenido de la titulación del blanco).

Este procedimiento se realizó cada día a cada muestra tomada por triplicado.

2.3.3 Determinación del porcentaje de fósforo disponible

Para evaluar la cantidad de fósforo disponible en el suelo se siguió el procedimiento establecido en el “Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados” (Fernández *et al.*, 2006), como se indica a continuación:

1. Se pesaron 0.1 g de muestra y se colocaron en un tubo falcon de 15 mL,
2. Se agregaron 7 mL de solución extractora, la cual estuvo compuesta por una solución 0.03 N de fluoruro de amonio y ácido clorhídrico 0.025 N.
3. Se agitó con vortex durante 15 segundos de tal manera que el suelo y la solución extractora se mezclaron bien. Se utilizó un agitador vortex marca Genie 2 Scientific, modelo G-560, el cual se muestra en la Figura 2.5.
4. Se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 3,000 rpm.
5. Del sobrenadante se tomaron 0.5 mL y se colocaron en un tubo de ensayo de 10 mL.
6. Se agregaron 6.5 mL de agua destilada.
7. Se adicionaron 2 mL de una solución de molibdato de amonio-ácido clorhídrico, la cual estaba compuesta por una solución de molibdato de amonio al 4.2% y ácido clorhídrico 10N.
8. Se agregó 1 mL de solución de cloruro estañoso diluido (0.1 mL de solución madre de cloruro estañoso en 33 mL de agua), y nuevamente se mezcló. La solución madre de cloruro estañoso fue preparada con 5 g de cloruro estañoso dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y disuelto en 12.5 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl)
9. Pasados 10 minutos se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 640 nm. Se utilizó un espectrofotómetro marca Genesys 20, modelo 4001/4, el cual se muestra en la Figura 2.6.



Figura 2.5 Agitación en vortex durante la etapa de extracción de fósforo disponible.



Figura 2.6 Espectrofotómetro utilizado en la determinación de fósforo disponible.

Previamente se hizo una curva de calibración como lo indica el manual referido anteriormente.

El Porcentaje de fósforo total se obtuvo a partir de la relación de la concentración resultante de la interpolación con los mililitros de aforo del tubo falcon, en la curva de calibración, de la absorbancia obtenida, como se indica a continuación:

$$\% Fosfordisponible = s \times (1 \times 10^{-4}) \quad (i)$$

$$S = \frac{E \times 7}{P} \quad (ii)$$

$$E = \frac{X \times 10}{e} \quad (iii)$$

$$X = \frac{A + 0.072}{0.364} \quad (iv)$$

Donde:

S = Concentración de fósforo en el suelo.

1×10^{-4} = Factor de conversión a porcentaje.

E = Concentración de fósforo en el tubo de extracción.

7 = mL de solución extractora empleados.

P = Peso seco de la muestra.

X = Concentración obtenida de la ecuación de la línea de tendencia de la curva patrón.

10 = Volumen en mL de solución de lectura.

e = Volumen en mL de la solución extraída empleada para preparar la solución de lectura en el espectrofotómetro.

A = Absorbancia obtenida de la lectura de la muestra en el espectrofotómetro a 640 nm.

0.072 = Constante de concentración de la línea de tendencia de la curva patrón.

0.364 = Constante de la ecuación de la línea de tendencia de la curva patrón.

Este procedimiento se realizó cada día a cada muestra tomada por triplicado.

...2.3.4 Determinación de HTPs

Para cuantificar la cantidad de hidrocarburos en el suelo se siguió el procedimiento establecido en el manual de técnicas de análisis de Fernández *et al.*, 2006, el cual contempla tres etapas: extracción, fraccionamiento y cuantificación de cada una de las fracciones por cromatografía de gases con detector FID.

2.3.4.1 Extracción

Para realizar la extracción, se procedió de la siguiente manera:

1. Se pesaron 0.5 g de muestra y se agregaron a un tubo falcon de 15 mL.
2. Se agregaron 1.5 g de Na_2SO_4 y se homogenizó en seco.
3. Se agregaron 5 mL de diclorometano y se homogenizó con vortex.
4. Se centrifugó la muestra durante 3 minutos a 4,000 rpm en una centrifuga modelo J-300 marca SOL-BAT de 8 tubos(Figura 2.7)
5. Se colectó la fase líquida en un vial. Los pasos 3, 4 y 5 se repitieron 2 veces más hasta alcanzar un volumen de 15 mL.
6. Se concentró la muestra con ayuda de un rotaevaporador modelo RE-111, un baño maría modelo B461 (ambos marca Büchi) y un enfriador modelo 1006 P marca Fisher Scientific (Figura 2.8). La concentración se llevo a cabo a 40 °C y 1 atm de presión.



Figura 2.7 Centrifugadora empleada en la extracción de hidrocarburos

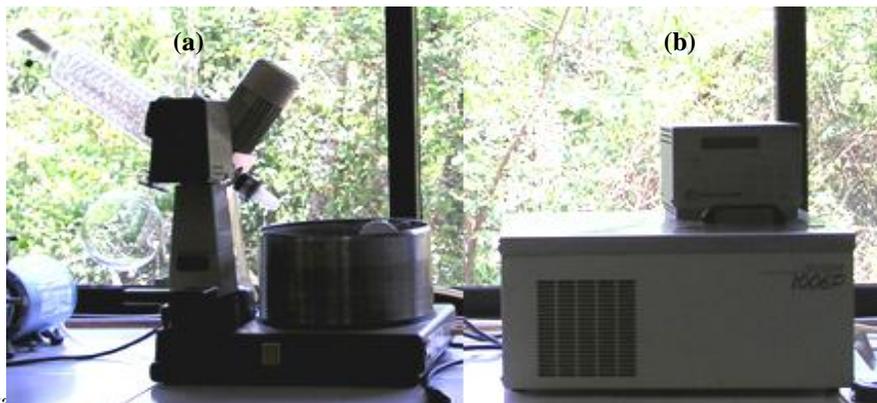


Figura 2.8 (a) Rotación evaporadora y (b) cromatógrafo de gases para el análisis de hidrocarburos

2.3.4.2 Fraccionamiento (cromatografía sólido-líquido, en columna)

Esta técnica se basa en la separación de los componentes (fracciones) del extracto de la muestra de suelo, rica en hidrocarburos del petróleo, de acuerdo con su polaridad, en una columna empacada con óxido de aluminio (alúmina). Las fracciones de compuestos alifáticos (1ª fracción) y aromáticos (2ª fracción) se separaron mediante la elución con diferentes solventes, hexano para la primera fracción y tolueno para la segunda (Fernández *et al.*, 2006). El desarrollo del fraccionamiento se muestra en la Figura 2.9

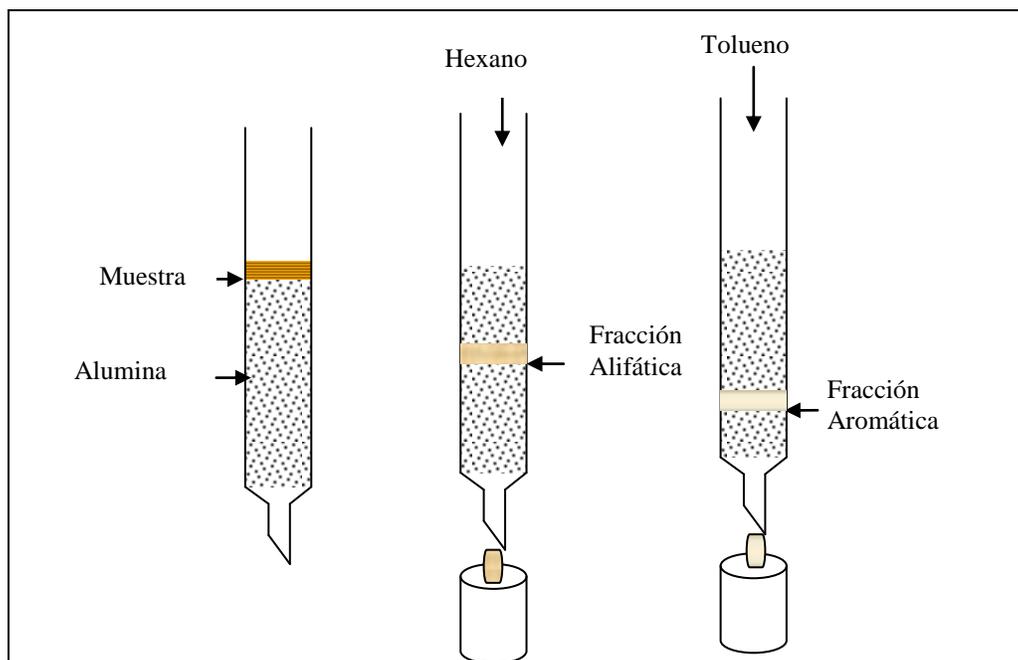


Figura 2.9 Fraccionamiento de hidrocarburos por cromatografía sólido líquido en columna

Para realizar el fraccionamiento se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

1. Se pesaron por separado 0.75 y 1.5 g de óxido de aluminio (alúmina).
2. A los 0.75 g de alúmina se agregaron aproximadamente 0.5 mL del extracto de la muestra homogenizando con una espátula.
3. En una columna de vidrio empacada con algodón y sellada con una aguja y un septo de hule se agregaron 2 mL de hexano.
4. La columna se empacó con los 1.5 g de alúmina.
5. Una vez sedimentada la alúmina se agregaron nuevamente 2 mL de hexano.
6. Se agregó la mezcla de alúmina con el extracto y se inició la elución.
7. Se colectaron a la salida de la columna de 2.5 a 2.7 mL de hexano con los compuestos alifáticos.
8. En seguida se adicionaron 7.5 mL de tolueno y se continuó la elución. A la salida de la columna se colectó el disolvente restante hasta que esta quedó vacía recuperando los compuestos aromáticos. La columna utilizada en el fraccionamiento de hidrocarburos se muestra en la Figura 2.10.

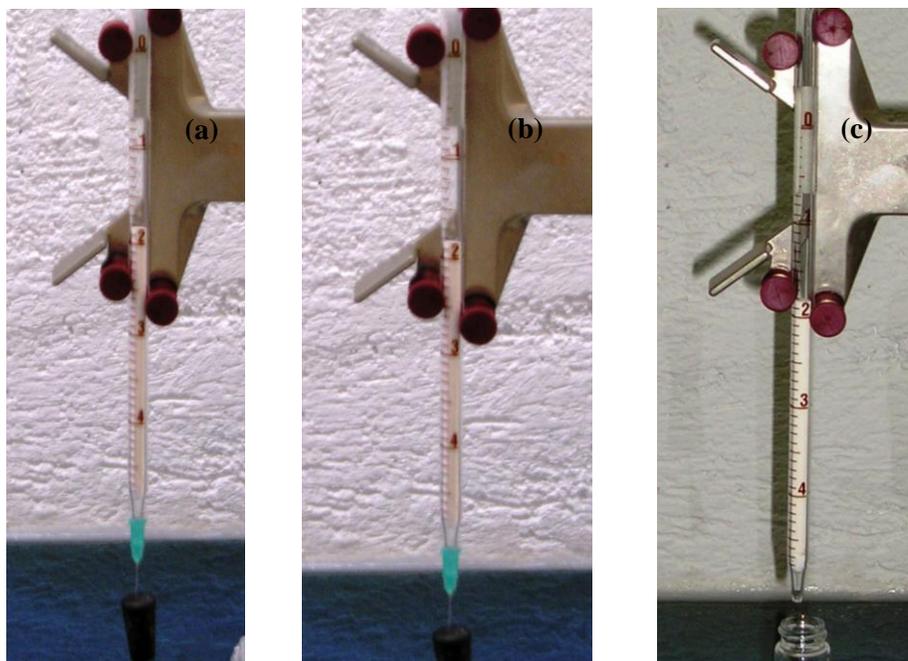


Figura 2.10 Columna utilizada para el fraccionamiento de hidrocarburos (a) columna con solvente, (b) columna empacada, (c) elución.

Una vez obtenidas las fracciones del petróleo, se evaporó el solvente de cada una de ellas con ayuda del rotaevaporador. Para el hexano se utilizó una temperatura de 30 °C y 300 mm Hg de presión y para el tolueno una temperatura de 70 °C y 100 mm Hg de presión. En ambos casos, el solvente se evaporó hasta un volumen final de 0.5 mL. La muestra se recuperó con ayuda de una pipeta pasteur y se vació a un matraz aforado de 2 mL. La fracción correspondiente se aforó (con hexano o tolueno) hasta un volumen final de 2 mL.

Este procedimiento se realizó todos los días a cada sistema y por triplicado.

2.3.4.3 Cuantificación de HTPs por cromatografía de gases.

El análisis de las fracciones alifática y de la aromática, se realizó mediante cromatografía de gases con Detector de Ionización de Flama o “FID” (por sus siglas en inglés) marca THERMO, utilizando una columna DB1, programado bajo las siguientes condiciones de temperatura en el horno: temperatura inicial 50 °C por 2 minutos, 30 °C/min hasta 220 °C, 5 °C/min hasta 290 °C manteniendo esta temperatura por 2 minutos.

Para obtener la concentración de hidrocarburos en la muestra, se consideró la curva de calibración que tiene una correspondencia lineal entre el área bajo la curva y la concentración del extracto de acuerdo con la ecuación obtenida (Fernández *et al.*, 2006):

$$C(\text{mgL}^{-1}) = \frac{(A - b)}{m}$$

Donde:

C = Concentración de HTPs (mg L^{-1}).

A = Área bajo la curva.

b = Ordenada al origen de la ecuación obtenida.

m = Pendiente de la ecuación obtenida.

Con la ecuación anterior y conociendo el área bajo la curva resuelta para cada muestra, se puede obtener la concentración de hidrocarburos presentes en ella, en mg L^{-1} . Para tener el valor en mg kg^{-1} de suelo hay que considerar la cantidad de suelo que se utiliza para la extracción, y el

volumen de hexano donde está resuspendida la muestra, así como las diluciones correspondientes, si las hay (Fernández *et al.*, 2006).

$$HTP_s \left(\frac{mg}{Kgs.s} \right) = \frac{(C) \times \left(\frac{V}{FC_1} \right) \times FC_2}{(P \times FH)}$$

Donde:

HTPs (mg / kg s.s.) = Hidrocarburos totales del petróleo en mg kg⁻¹ de suelo seco

C = Hidrocarburos totales del petróleo en mg L⁻¹.

V = Volumen disolvente donde está resuspendida la muestra (5 mL o 60 mL).

FC₁ = Factor de corrección para obtener los HTPs contenidos en el hexano = 1,000.

FC₂ = Factor de corrección para convertir los HTPs contenidos en la muestra en mg kg⁻¹ s.s.= 1,000

P = Cantidad de suelo extraído (g).

FH = Factor de corrección de humedad del suelo (1-(%humedad/100)).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Estudios analíticos realizados a los sistemas de biorremediación

Con la finalidad de mantener una relación C/N/P de 100/10/1 en cada uno de los sistemas se realizó previamente la determinación del porcentaje de carbono orgánico, nitrógeno total y fósforo disponible al suelo y los residuos agrícolas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Porcentajes iniciales de carbono orgánico, nitrógeno total y fósforo disponible de los componentes de los sistemas y cantidad de urea y fosfato de potasio monobásico necesaria para ajustar la relación C/N/P a 100/10/1

Sistemas	Componentes	Porcentaje			Cantidad (g)	
		COT	Nitrógeno total	Fósforo disponible	Urea	Fosfato de potasio monobásico
Control	Suelo	23.3	1.1	0.11	1.2	0.12
Composteo-caña	Suelo	23.3	1.1	0.11	1.35	0.13
	Caña	2.76	1.5	0.12		
Composteo-coco	Suelo	23.3	1.1	0.11	0.82	0.15
	Coco	4.89	6	0.13		
Bioaumentación	Suelo	23.3	1.1	0.11	1.2	0.12

Durante el monitoreo de los sistemas de biorremediación a nivel microcosmos, se realizaron los siguientes estudios analíticos: producción de CO₂, determinación de carbono orgánico, determinación de fósforo disponible y determinación de la fracción alifática de los hidrocarburos presentes en el suelo contaminado. Los resultados obtenidos se presentan a continuación:

3.1.1 Producción de CO₂.

En la Figura 3.1 se reportan los miligramos de CO₂ producidos a lo largo de la cinética de biorremediación en los diferentes sistemas. Se puede notar que el sistema “composteo-coco” presentó una mayor producción de CO₂ en relación con los otros 3 sistemas aunque entre los días del 4 al 9, el sistema pasa por un estado de inactividad, retomando una acelerada producción a partir del día 10 y hasta acabar el monitoreo. En el caso del sistema “bioaumentación” se observó que a partir del día 14 el incremento en la producción de CO₂ se detuvo, lo que indicó que la actividad biológica en el sistema también se detuvo.

Los sistemas “composteo-caña” y sistema “control”, presentaron un comportamiento similar al sistema “composteo-coco”, apreciándose que alrededor de los días 19 y 20 mostraron un incremento acelerado en la producción de CO₂.

La cantidad de CO₂ producido en un medio con hidrocarburos como única fuente de carbono, es una medida directa de mineralización. La producción de CO₂ es un indicador de actividad biológica, lo cual podría indicar que el sistema que más CO₂ produjo es el sistema que más hidrocarburos removió. En este estudio, la relación CO₂-Remoción de hidrocarburos, resultó efectiva únicamente en la remoción de hidrocarburos alifáticos.

El sistema “composteo-coco” logro un máximo de producción, en relación a los demás sistemas, de 950 mg de CO₂, siendo también el sistema que removió un mayor porcentaje de hidrocarburos alifáticos (87.5).

Los miligramos de CO₂ producidos a lo largo de la cinética de biorremediación en los diferentes sistemas se muestran en la Tabla 1-Anexo 1.

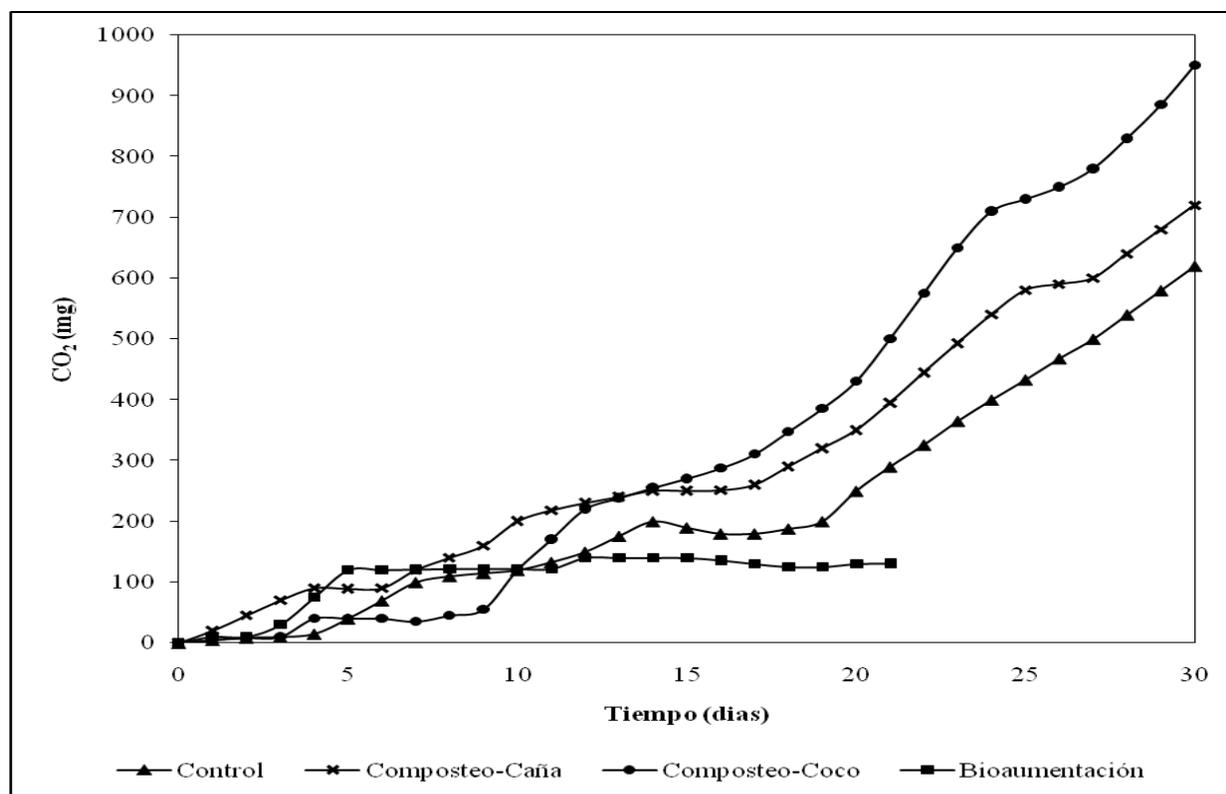


Figura 3.1 Miligramos de CO₂ producidos durante la cinética en los diferentes sistemas de biorremediación.

3.1.2 Porcentaje de COT.

Se determinó el COT a las muestras de los sistemas durante la cinética, el cual mostro el consumo de carbono durante el ensayo de biorremediación.

En la Figura 3.2 se observan los porcentajes de carbono orgánico, el cual fue asimilado en los sistemas de biorremediación a lo largo de 60 días de la cinética. Se observó un descenso gradual en cada uno de los sistemas. El sistema “control” presentó una disminución de carbono orgánico de 14.1 % entre el día 0 y el día 30. El sistema “composteo caña” mostró una disminución de 15 % hasta el día 30. El periodo en que hubo una mayor disminución fue del día 0 al día 14. El sistema “composteo-coco”, fue el que mayor porcentaje de carbono orgánico tuvo al día 0 (43.5 %) y también fue el que asimiló más en menos tiempo, logrando una disminución de 16.2 al día 7 y de 28 % al día 60. El sistema bioaumentación disminuyó un menor porcentaje de carbono orgánico a lo largo de su funcionamiento, logrando disminuir hasta el día 23 un 14.1 %.

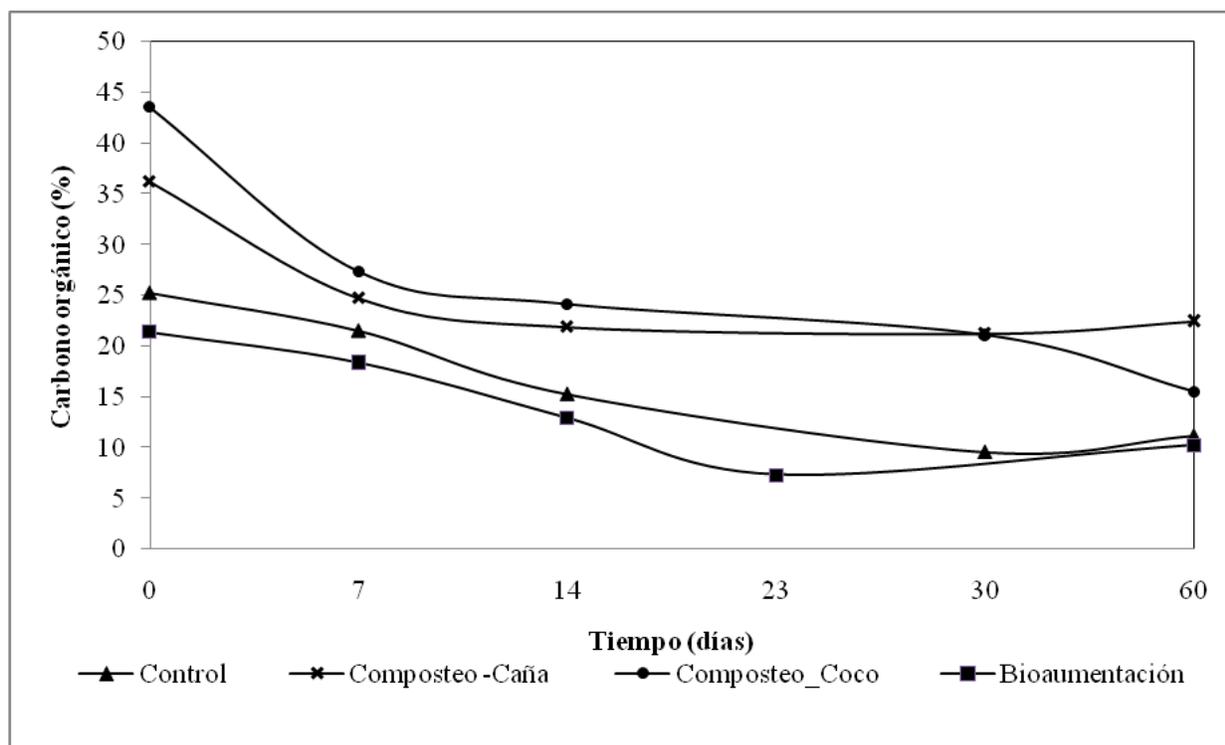


Figura 3.2 Porcentaje de carbono orgánico consumido a lo largo de la cinética de biorremediación por los diferentes sistemas ensayados.

Debido al aporte de COT por los residuos agrícolas, fueron los sistemas de composteo los que presentaron los porcentajes de COT mas altos. El coco apporto mas carbono orgánico que la caña, es por eso que el sistema “composteo-coco” obtuvo los porcentajes mas elevados.

El sistema “bioaumentacion fue el que menor porcentaje de carbono orgánico disminuyó y también el que menor porcentaje de hidrocarburos alifáticos degradó, lo cual indica que los microorganismos presentes en este sistema, no utilizaron como fuente principal de carbono organico a los hidrocarburos alifáticos (presentes en mayores concentraciones) sino otra fuente de carbono organico presente en el suelo, distinta a dichos hidrocarburos.

Los porcentajes de carbono orgánico de los sistemas de biorremediación se encuentran en la Tabla 2-Anexo 1.

3.1.3 Porcentaje de fósforo disponible.

En la Figura 3.3 se reporta el porcentaje del fósforo disponible en cada uno de los sistemas de biorremediación. A lo largo de la cinética, en los 4 sistema se observó una disminución muy pequeña de fósforo disponible, (60 días), alcanzándose en promedio 0.03 %. A partir del día 7 se observó un ligero aumento en los 4 sistemas, lo que se atribuye a la capacidad de los compuestos fosforados de transformarse en otros compuestos de igual manera disponibles para los organismos degradadores.

El sistema que más fósforo asimiló es el sistema “composteo-coco”, pero también es el sistema que más incrementó el porcentaje de dicho elemento a partir del día 7. El sistema “bioaumentación” fue el que se mantuvo más estable a lo largo de su funcionamiento con porcentajes de alrededor de 0.15 %.

El comportamiento de los sistemas con respecto al fósforo disponible, se debe a la capacidad del fósforo de ser transformado por los microorganismos, en otras sustancias igualmente disponibles para otros microorganismos. Las relaciones de sinergia entre los distintos microorganismos presentes en el suelo, permiten que el fósforo sea disponible en las distintas formas en que se puede encontrar después de ser transformado por la actividad microbiana.

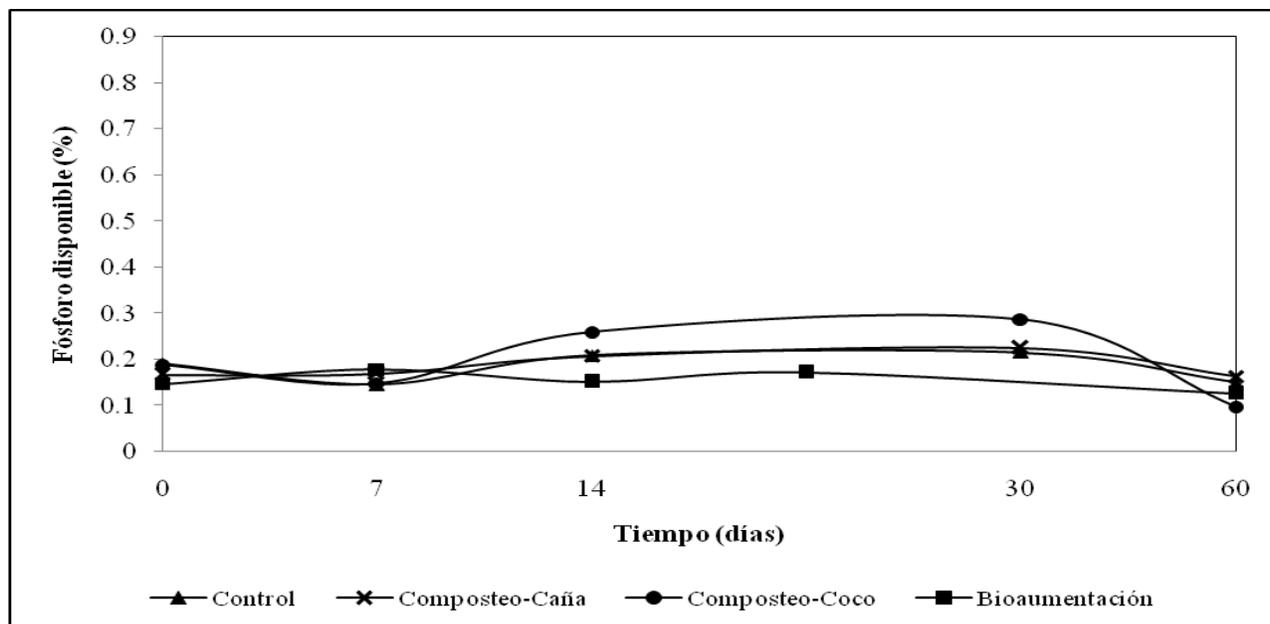


Figura 3.3 Porcentaje de Fósforo disponible presente en los sistemas de biorremediación a lo largo de la cinética de degradación.

Los porcentajes de fósforo disponible de los sistemas de biorremediación se encuentran en la Tabla 3-Anexo 1.

3.1.4 Determinación de la remoción de las fracciones alifática y aromática de los hidrocarburos totales del petróleo.

3.1.4.1 Remoción de la fracción alifática

Los resultados obtenidos de la remoción de hidrocarburos alifáticos se muestran en la Figura 3.4. El sistema que removió un mayor porcentaje de estos compuestos fue el de “composteo-coco” alcanzando una remoción final de 87.5 %. Los porcentajes de remoción obtenidos por los sistemas “control” y “composteo-caña” no se encuentran muy alejados: 86.5 y 87 % respectivamente. Los sistemas “control” y “bioaumentación” lograron una remoción de 55.4 y 55.19 % respectivamente al día 14 mientras que los sistemas “composteo-caña” y “composteo-coco” removieron en ese mismo tiempo de 38 y 34.8 % respectivamente.

En el periodo comprendido del día 14 al 30, el sistema “control” tuvo un avance pequeño en la remoción (4.5%) mientras que para el mismo periodo los sistemas “composteo-caña” y

“composteo-coco” tuvieron un mejor funcionamiento logrando remover adicionalmente a lo ya removido 32.7 y 42.7 % respectivamente. El sistema “bioaumentación” fue el que alcanzó un menor porcentaje de remoción de hidrocarburos alifáticos al final de la cinética (64.8 %).

En los sistemas de composteo se presentaron mejores resultados, ya que al adicionar los residuos agrícolas se mejoró el balance y la disponibilidad de nutrientes para la actividad microbiana. Por otra parte la actividad biológica en el sistema “control” estuvo limitada únicamente a los nutrientes agregados y a los nutrientes propios del suelo, lo cual pudo haber reducido el tiempo de vida de del sistema.

A pesar de que al final de la cinética el sistema “composteo-coco” obtuvo mejores resultados, el comportamiento de la grafica indica que en una cinética más larga, el sistema “composteo-caña” hubiera presentado mejores resultados debido su rápida adaptación.

En todos los sistemas, la eficiencia para eliminar los hidrocarburos se correlacionó con un incremento de la actividad biológica, la cual es demostrada con la producción de CO₂ de cada uno de los diferentes sistemas.

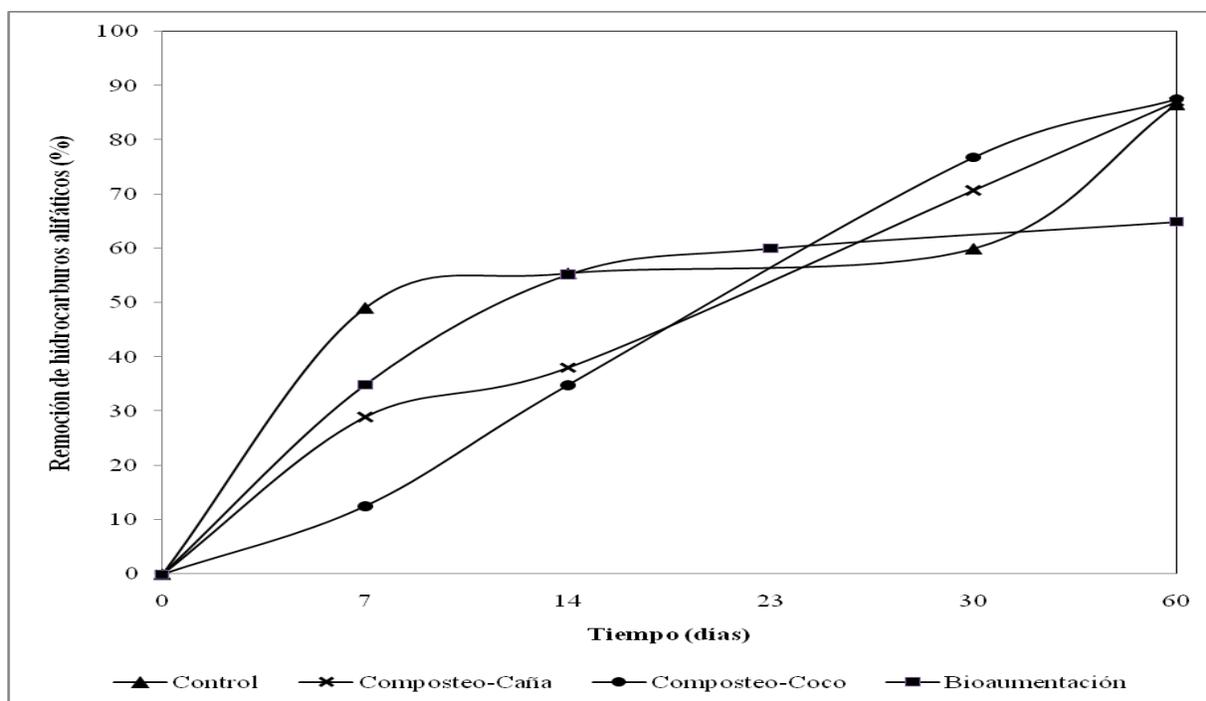


Figura 3.4 Porcentaje de remoción de la fracción alifática de hidrocarburos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.

Las concentraciones en cada día de muestreo y los porcentajes de remoción de los hidrocarburos alifáticos se muestran en las Tablas 4 y 5-Anexo 1.

Los cromatogramas que representan la remoción de hidrocarburos de la fracción alifática en los sistemas: “control”, “composteo-caña”, “composteo-coco” a los días 0 y 30 se muestran en las Figuras 3.5 a 3.7 y los del sistema bioaumentación en tiempo 0 y 14 días se muestran en la Figura 3.8.

En el sistema “control” se observó que hubo una mayor remoción de hidrocarburos alifáticos de 10,12, 14 y 16 átomos de carbono, la cual es representada por la disminución de las áreas bajo la curva comprendidas entre el tiempo 5.1 a 8.04 minutos.

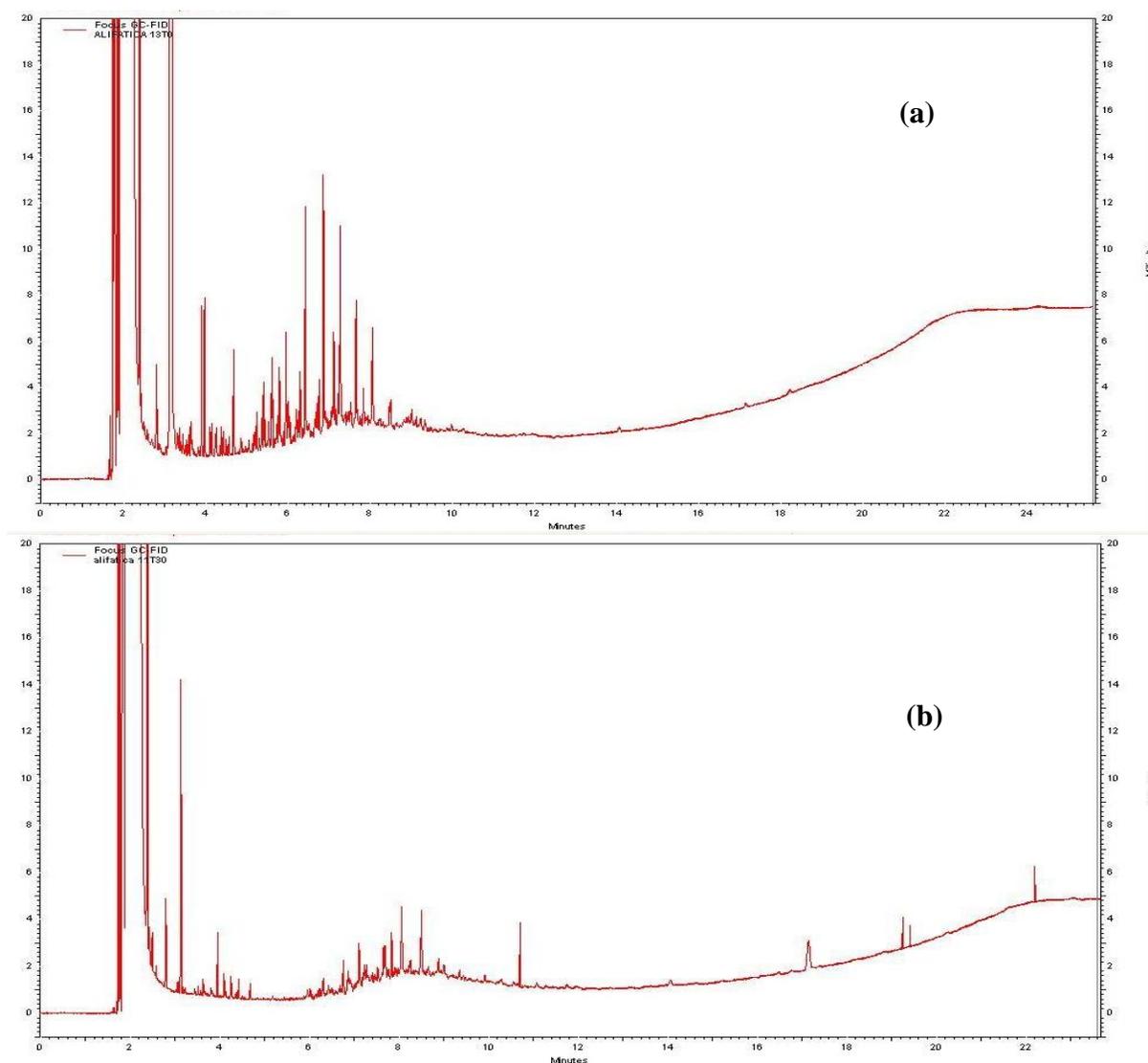


Figura 3.5 Cromatogramas que muestran la disminución de la fracción alifática en el sistema “control” (a) día 0 y (b) día 30.

El sistema “composteo-caña” logró remover los compuestos de 10, 12, 14 y 16 átomos de carbono. Las disminuciones más notables en el área bajo la curva se encuentran en los tiempos de retención 6, 6.6, 6.8, 7.2 y 7.6 minutos, lo que representa una mayor disminución en los compuesto C₁₂ y C₁₄. Los compuestos C₁₀ y C₁₆ se removieron en menor cantidad..

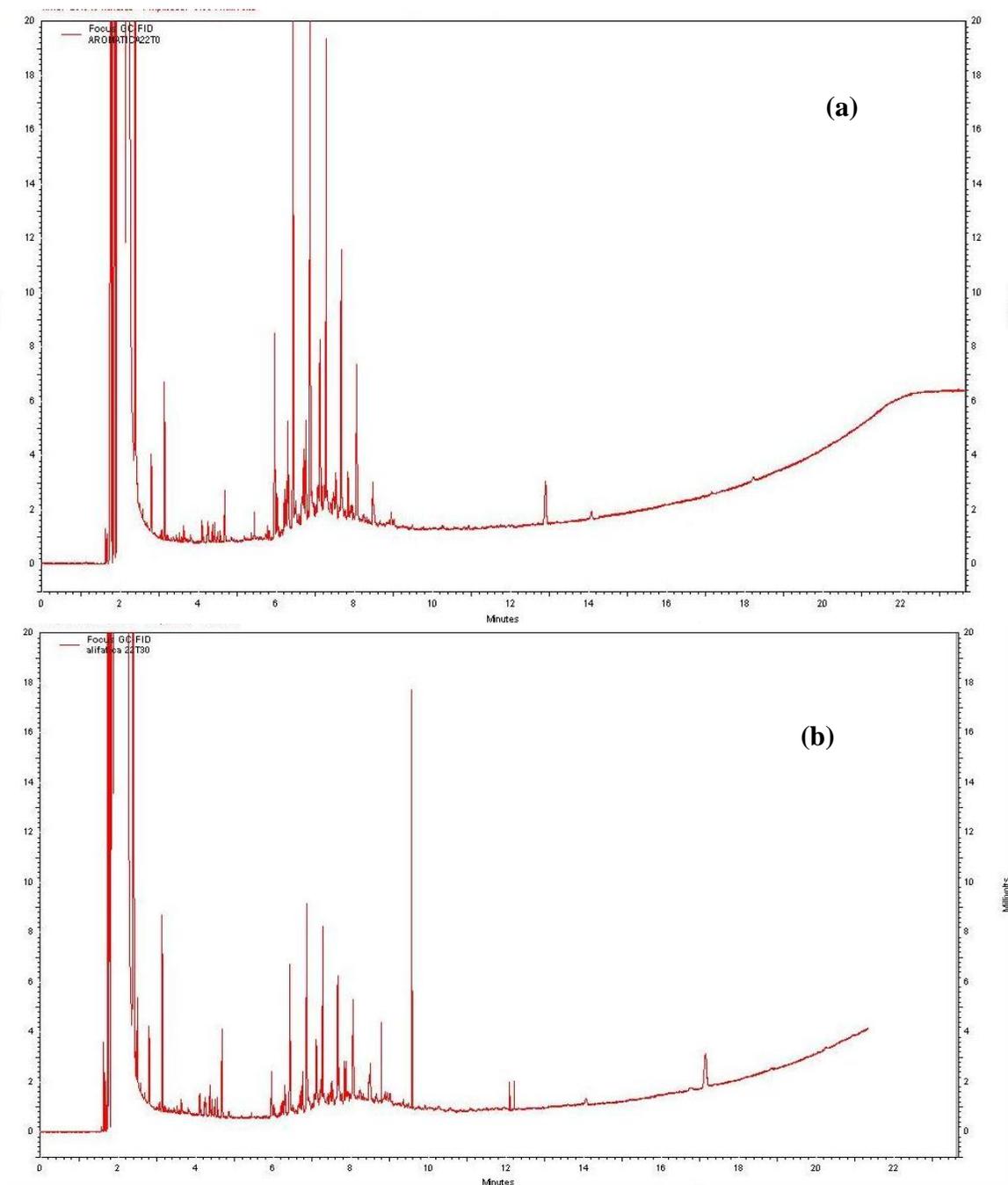


Figura 3.6 Cromatograma que muestra la disminución de la fracción alifática en el sistema “composteo-caña”. (a) día 0 y (b) día 30.

El sistema “composteo-coco” logró una remoción de los compuestos de 12, 14, y 16 átomos de carbono. Las disminuciones más notables en el area bajo la curva se encuentran en los tiempos de retención 6.4, 6.8, 7.2, 7.6 y 8.2 minutos, lo que representa una mayor disminución en los compuesto C₁₂, C₁₄ y C₁₆, lo cual se debe a que los microorganismos presentes en el suelo son diferentes por lo que sus requerimientos carbono pueden ser distintos.

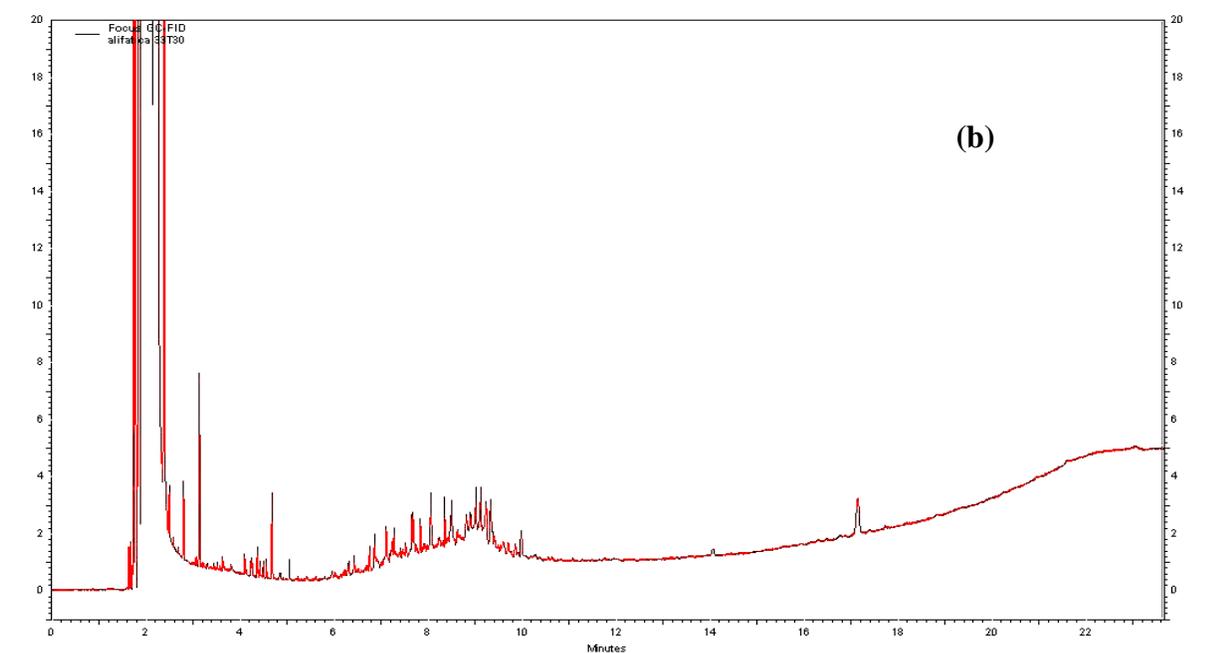
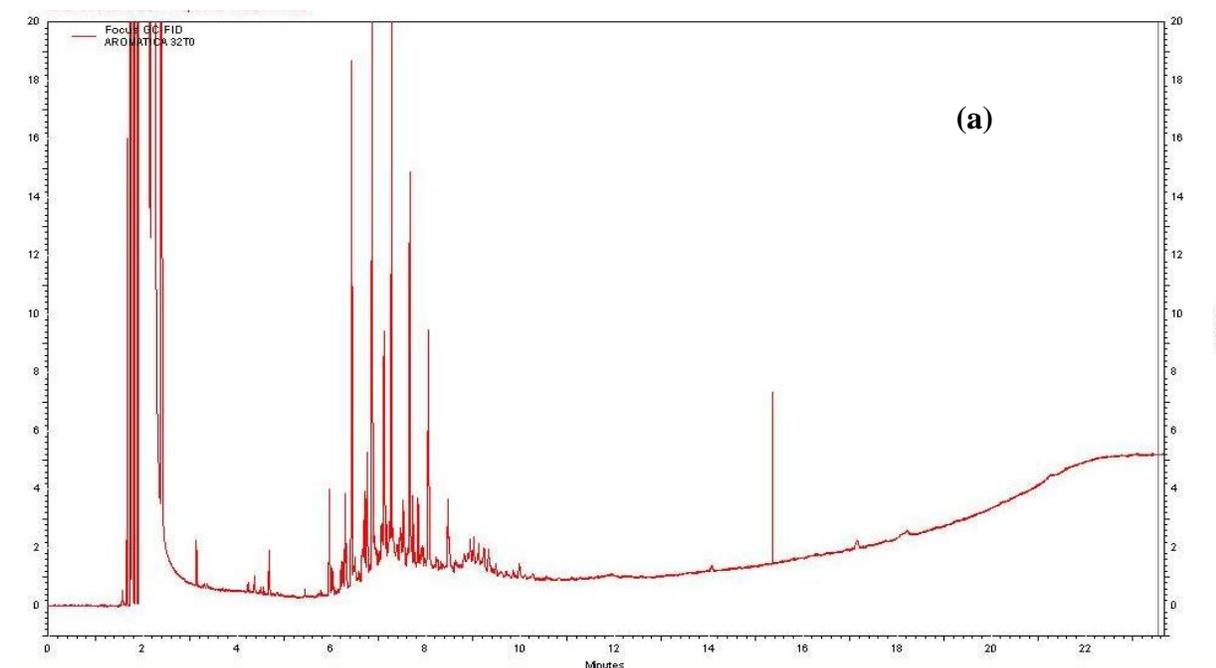


Figura 3.7 Cromatograma que muestra la disminución de la fracción alifática en el sistema “composteo-coco”. (a) día 0 y (b) día 30.

El sistema “bioaumentación” logró una remoción de los compuestos de 10 a 18 átomos de carbono. Las disminuciones más notables en el area bajo la curva se encuentran en los tiempos de retención 6.4, 7, 7.2, 7.8 y 8.4 minutos, lo que representa una mayor disminución en los compuesto C₁₂, C₁₄, y C₁₆. Los compuestos C₁₀ y C₁₈ fueron removidos en menores cantidades.

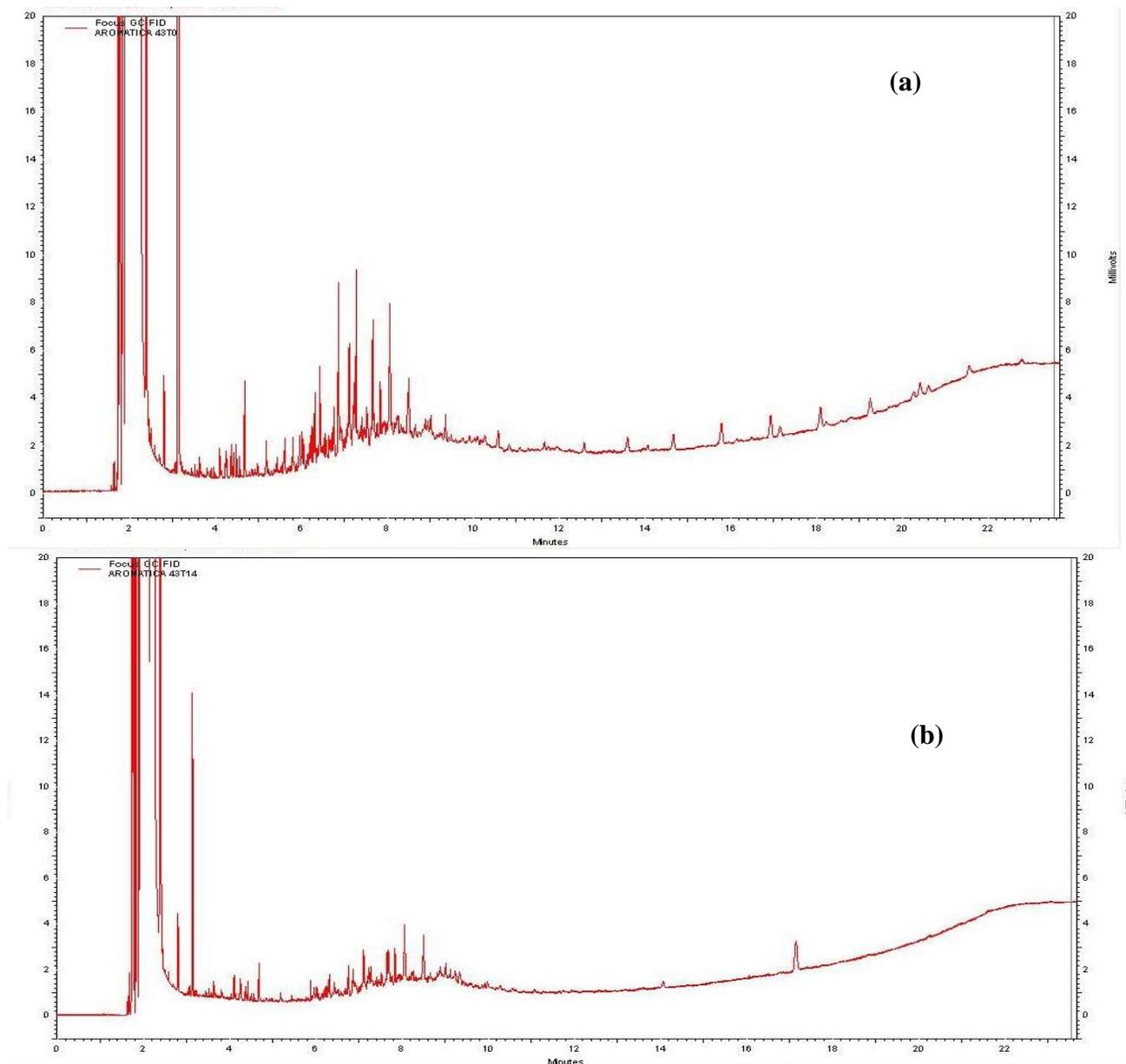


Figura 3.8 Cromatograma que muestra la disminución de la fracción alifática en el sistema “bioaumentación”. (a) día 0 y (b) día 14.

Los hidrocarburos alifáticos identificados que se lograron remover durante la cinética en los diferentes sistemas de biorremediación, fueron compuestos con 10, 12, 14, 16 y 18 átomos de carbono, y en el cromatograma se representan las áreas bajo la curva que aparecen entre los tiempos de retención 5.199 y 8.466 minutos. Los tiempos de retención de los compuestos alifáticos identificados durante la cinética en los distintos sistemas de biorremediación se muestran en la Tabla 6-Anexo 1.

3.1.4.2 Remoción de la fracción aromática

Los porcentajes de remoción de los hidrocarburos aromáticos que se obtuvieron en los diferentes sistemas de la cinética de biorremediación se representan en la Figura 3.9. El sistema que mejores resultados logro fue “bioaumentación”, alcanzando un porcentaje de remoción, después de 60 días, de 82.4 %. Los sistemas “control”, “composteo-caña” y “composteo-coco” obtuvieron resultados similares entre si alcanzando 69.8, 66.7 y 70.1 % de remoción respectivamente. El día 14 los sistemas “control” y “bioaumentación” presentaron el porcentaje de remoción más alto hasta ese momento (56 %) y el sistema “composteo-coco” mostraba el porcentaje más bajo (35.5 %). Entre los días 7 y 14 el sistema “composteo-coco” presento un periodo de latencia mostrando un incremento de la remoción entre el inicio y el final de dicho periodo de 1.2 %. A partir del día 14 el sistema “composteo-coco” comenzó a remover de una manera más acelerada la fracción aromática de hidrocarburos alcanzando el día 30 un 67 % de remoción. Este comportamiento se le puede atribuir al periodo de adaptación por el que los microorganismos pasan antes de empezar a degradar hidrocarburos aromáticos en el caso del sistema “composteo-coco” dicho periodo quedo comprendido entre el día 0 y el día 14.

Cuando el periodo de adaptación de los microorganismos degradadores es corto se logran porcentaje más altos y periodos más largos de remoción. Lo anterior, fue lo que sucedió en el sistema “bioaumentación“, lo cual le permitió que alcanzara el porcentaje más alto de remoción de compuestos aromáticos en comparación con los demás sistemas.

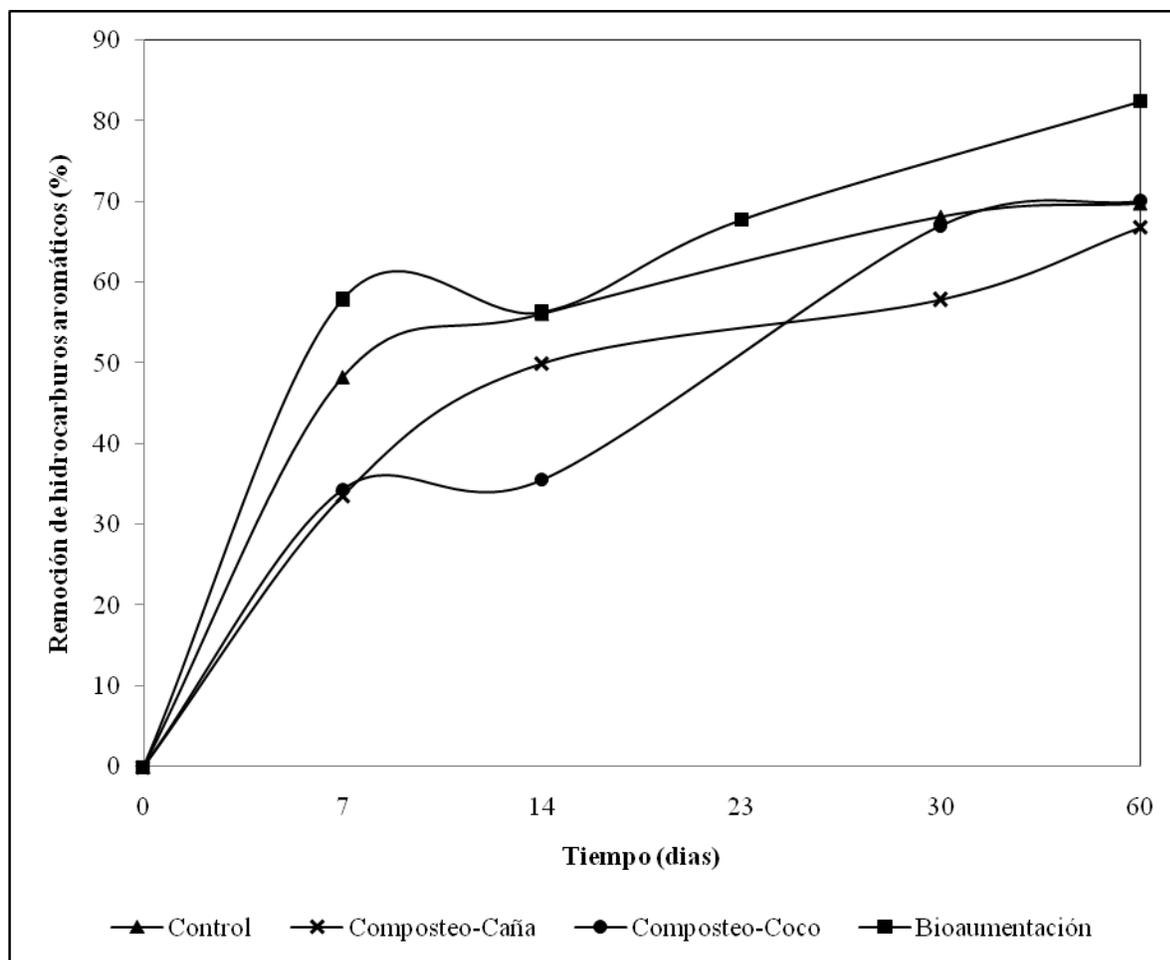


Figura 3.9 Porcentaje de remoción de la fracción aromática de hidrocarburos en los sistemas de biorremediación a lo largo de los días de funcionamiento.

Las concentraciones y los porcentajes de remoción de los hidrocarburos aromáticos se muestran en las Tablas 7 y 8-Anexo 1.

Los compuestos identificados que presentaron variaciones son el naftaleno, el fenantreno y el benzo (a) pireno. Sus tiempos de retención se muestran en la Tabla 9-Anexo 1

Los cromatogramas que representan la remoción de hidrocarburos de la fracción aromática en los sistemas de biorremediación se muestran a continuación:

El sistema “control” al día cero no presenta ninguno de los tres compuestos identificados, sin embargo al día 30 estos compuestos aparecen. En los mismos cromatogramas se muestran otros

compuestos no identificados que se generan entre el día cero y el día 30. Esto se puede atribuir a la transformación que sufrieron los compuestos durante la biorremediación y debido a los procesos metabólicos de los microorganismos degradadores que logran convertir un compuesto inicial en otro diferente.

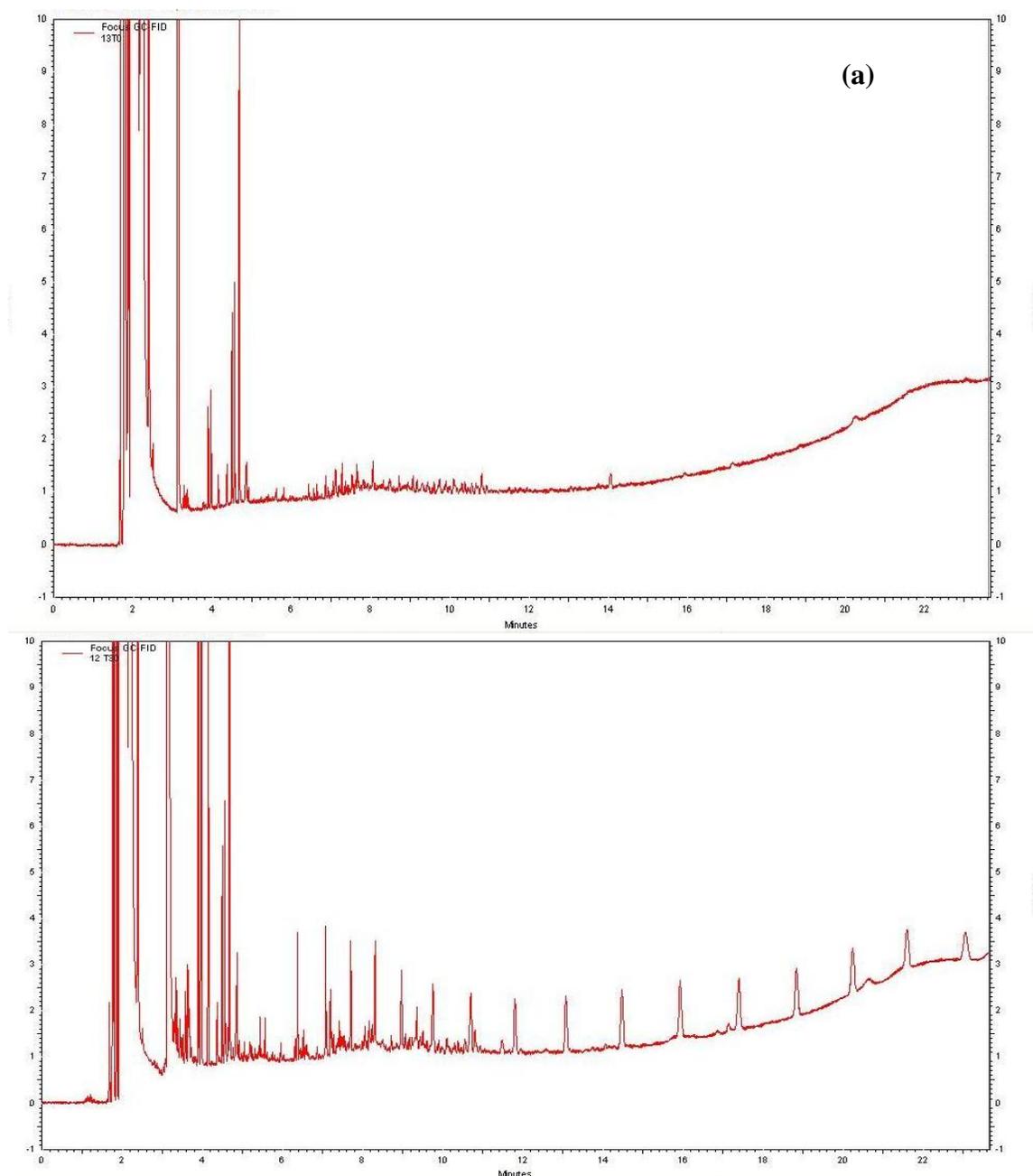


Figura 3.10 Cromatograma que muestra los cambios en la fracción aromática en el sistema “control”. (a) día 0 y (b) día 30.

De los tres compuestos identificados, únicamente el fenantreno disminuye entre el día 0 y día 30, el naftaleno y el benzo (a) pireno no se encuentran en el sistema “composteo-caña”. Entre el día 0 y el día 30 se observa la disminución de algunos compuestos no identificados y la generación de otros, lo cual es posible en los procesos de degradación y los compuestos en los que se transforman dependen del microorganismo degradadores.

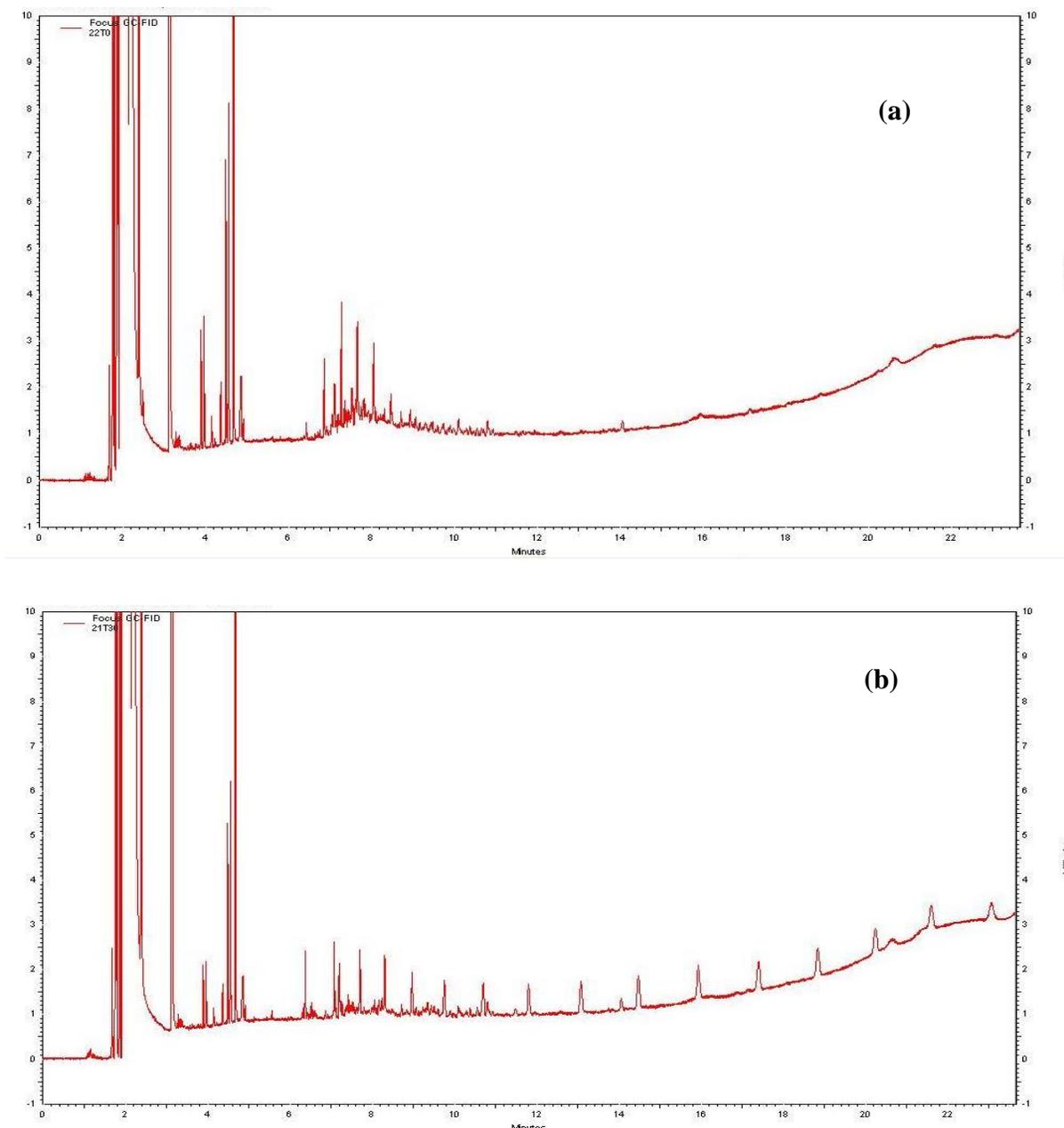


Figura 3.11 Cromatograma que muestra los cambios en la fracción aromática en el sistema “composteo-caña”. (a) día 0 y (b) día 30.

En el sistema “composteo-coco” el fenantreno tuvo una pequeña disminución y el naftaleno se mantiene igual, el benzo (a) pireno no se encontró en sistema . El día 30 se observó la disminución de algunos compuestos no identificados y la aparición de otros nuevos que en el día 0 no estaban presentes. Esto se puede atribuir a la transformación que sufrieron los compuestos durante la biorremediación y debido a los procesos metabólicos de los microorganismos que realizan la degradación.

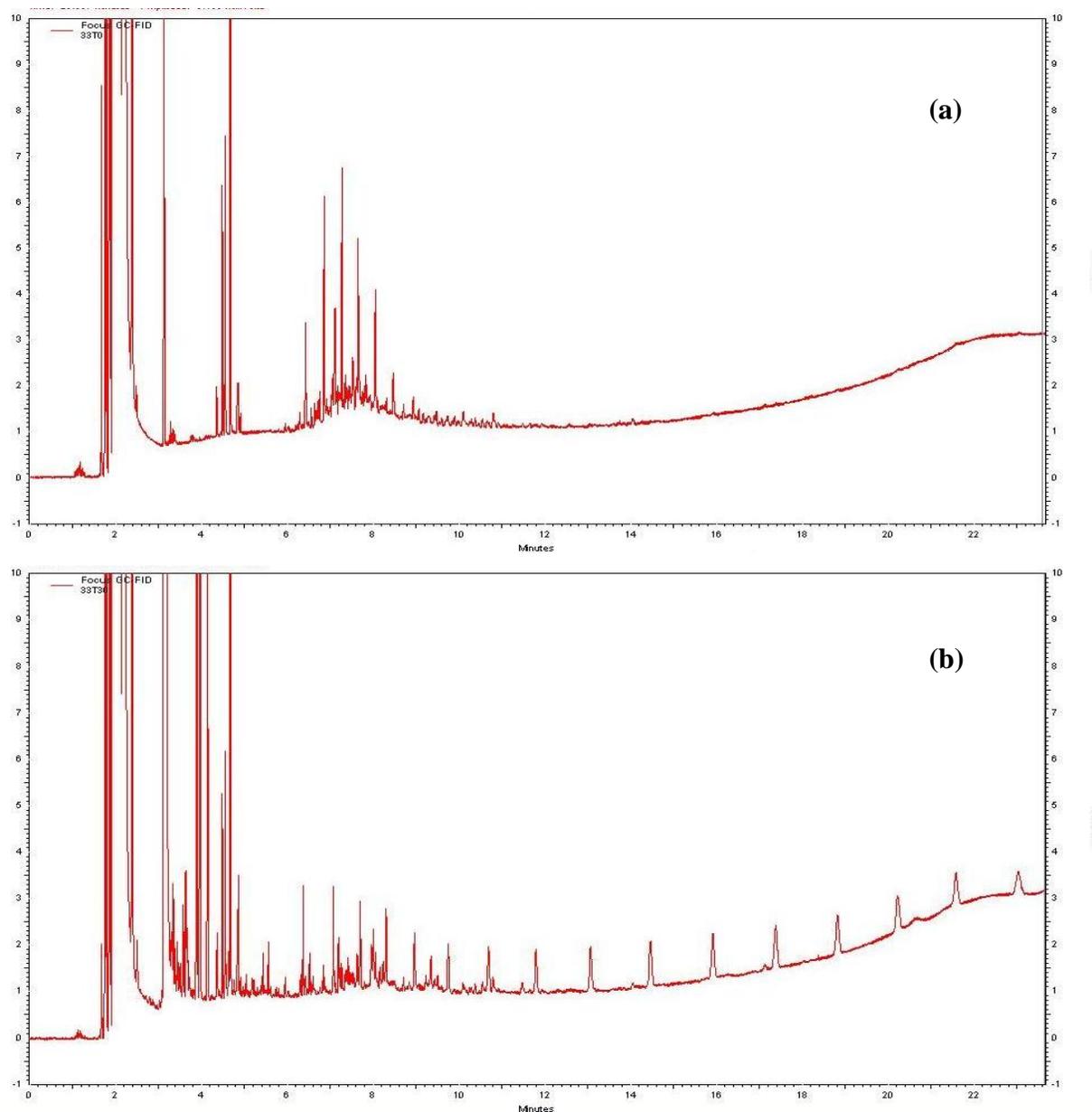


Figura 3.12 Cromatograma que muestra los cambios en la fracción aromática en el sistema “composteo-coco”. (a) día 0 y (b) día 30.

En el sistema “bioaumentación” no se encontró el naftaleno, en fenantreno aumento entre el día 0 y el día 30, por su parte el benzo (a) pireno fue generado por los microorganismos degradadores dentro de sus rutas metabólicas. El día 30 aparecen nuevos compuestos que en el día 0 no se encontraban. Esto se puede atribuir a la transformación que sufrieron los compuestos durante la biorremediación y debido a los procesos metabólicos de los microorganismos degradadores.

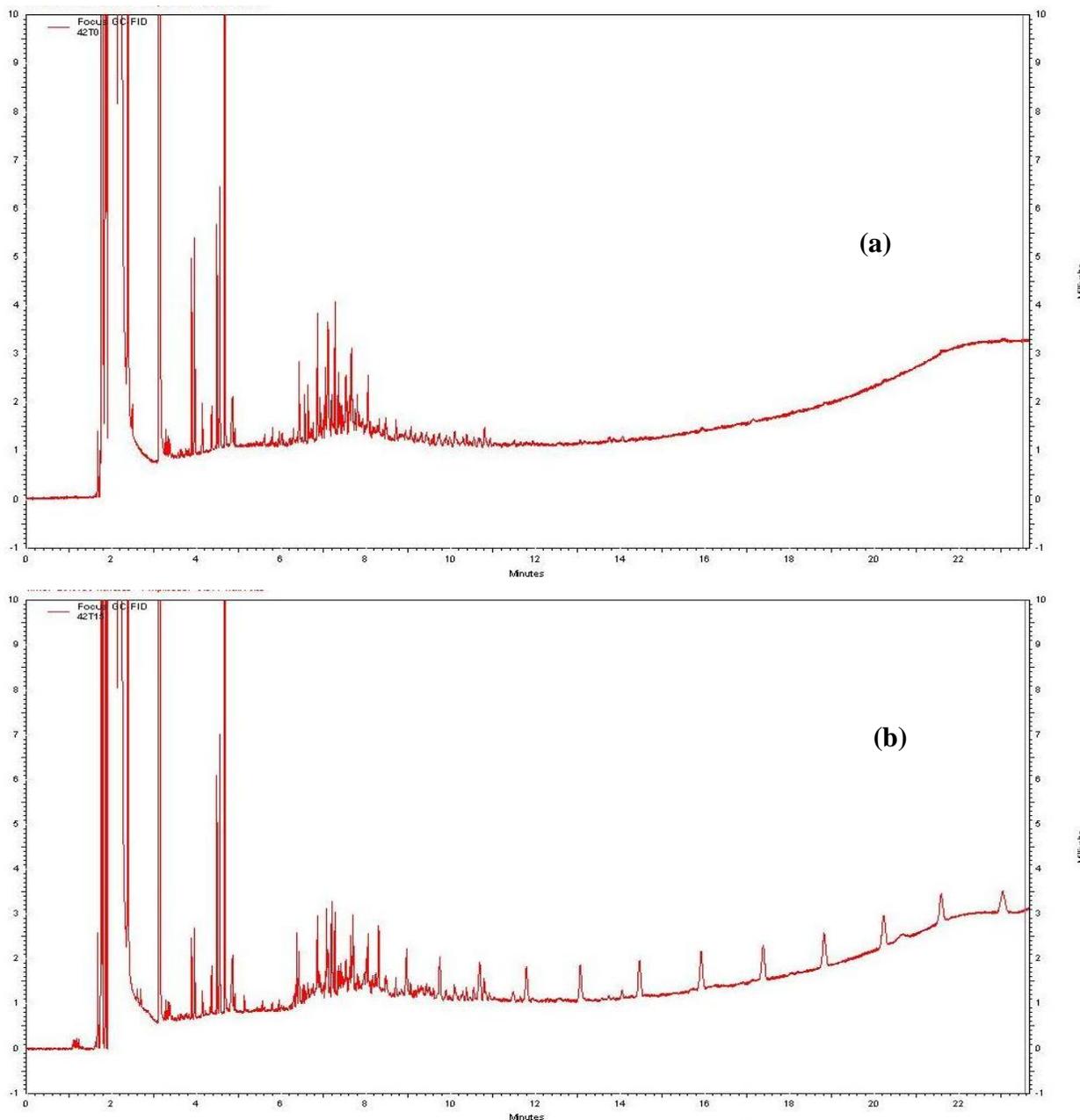


Figura 3.13 Cromatograma que muestra los cambios en la fracción aromática en el sistema “bioaumentación”. (a) día 0 y (b) día 14.

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

En los diferentes sistemas de biorremediación, se observó un mayor porcentaje de remoción de hidrocarburos alifáticos en los dos sistemas de composteo al día 30. En el sistema “composteo-coco” se observó una remoción del 76.79%, mientras que en el sistema “composteo-caña” la remoción fue de 70.74%. Para los sistemas “control” y “bioaumentación” estas cifras fueron del 59.98% y 60.01% respectivamente.

Con respecto a los hidrocarburos aromáticos, los mejores porcentajes de remoción se presentaron en el sistema “bioaumentación”, con una degradación del 82.41 % en 60 días. Los sistemas “control”, “composteo-caña” y “composteo-coco” lograron remover en el mismo periodo de tiempo 69.83, 66.75 y 70.10 % respectivamente. En este punto se comprueba la capacidad que tienen los consorcios de bacterias autóctonas de suelos contaminados con petróleo, para la degradación de hidrocarburos aromáticos.

En los ensayos de biorremediación donde se midió el carbono orgánico total, se presentaron valores iniciales mas altos en los sistemas de composteo (43.53% para “composteo-coco y 36.24% para “composteo-caña”). La adición de los materiales de contacto proporcionó una fuente de carbono y de microorganismos exógenos adicional a la de los suelos, lo que se presume, permitió una mayor remoción de hidrocarburos alifáticos. En la determinación del fósforo disponible, se observó que posiblemente por irregularidades en la aplicación del método y/o debido a error humano, los resultados mostraron discrepancias en lo que debió ser un proceso de asimilación constante para el crecimiento bacteriano. Aún así, se logró observar que el sistema que mas fosforo disponible disminuyo, fue el de “composteo-coco”, probablemente por la alta actividad biológica que presentó.

La utilización de microorganismos autóctonos y exógenos al mismo tiempo en los sistemas de composteo logro un mejor funcionamiento en la remoción de hidrocarburos alifáticos. En el sistema “bioaumentación” se lograron los mayores porcentajes de remoción de hidrocarburos aromáticos utilizando únicamente microorganismos autóctonos para bioaumentar el suelo.

El sistema “composteo-coco” logró mejores resultados que el sistema “composteo-caña” tanto en la remoción de hidrocarburos alifáticos como de aromáticos, lo que indica que la cascara de coco es un mejor material de contacto debido a su porosidad, ya que permite una mejor aeración del sistema y posiblemente le adiciona mas nutrientes y microorganismos exógenos habituados a la degradación de compuestos complejos presentes en la cáscara.

CAPITULO 5. ANEXOS

Anexo 1

Tabla 1 Miligramos de CO₂ producidos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.

Tiempo (días)	mg de CO ₂ producidos			
	Control	Composteo-Caña	Composteo-Coco	Bioaumentación
0	0	0	0	0
1	5	20	5	10
2	9	45	8	10
3	10	70	10	30
4	15	90	40	75
5	40	89	40	120
6	70	90	40	120
7	100	120	35	121
8	110	140	45	122
9	115	160	55	122
10	120	200	120	122
11	133	218	170	122
12	150	230	220	140
13	176	240	238	140
14	200	250	255	140
15	190	250	270	140
16	180	251	287	136
17	180	260	310	130
18	188	290	347	125
19	200	320	385	125
20	250	350	430	130
21	290	395	500	131
22	326	445	575	-
23	365	493	650	-
24	400	540	710	-
25	433	580	730	-
26	468	590	750	-
27	500	600	780	-
28	540	640	830	-
29	580	680	885	-
30	620	720	950	-

Tabla 2 Porcentajes de carbono orgánico total presente en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.

Días de muestreo	Control	Composteo-Caña	Composteo-Coco	Bioaumentación
0	25.3126578	36.2463252	43.534432	21.4359943
7	21.5852042	24.7855333	27.3740974	18.4408128
14	15.3393651	21.9434458	24.178115	12.9589178
23	-	-	-	7.35266595
30	9.63307253	21.2821772	21.1587067	-
60	11.2444988	22.4947879	15.5990751	10.2799624

Tabla 3 Porcentajes de fósforo disponible presente en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.

Días de muestreo	Control	Composteo-Caña	Composteo-Coco	Bioaumentación
0	0.19148045	0.16653227	0.18860145	0.14738483
7	0.14597361	0.1691903	0.1486113	0.17797982
14	0.20932424	0.20800613	0.25974792	0.15172984
23	-	-	-	0.17244723
30	0.21562997	0.2256151	0.28670253	-
60	0.15110326	0.16350343	0.09805023	0.12649701

Tabla 4 Concentración (ppm) de hidrocarburos alifáticos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.

Días de muestreo	Control	Composteo-Caña	Composteo-Coco	Bioaumentación
0	8,853	8,407	9,333	8,188
7	4,509	5,971	8,161	5,329
14	3,944	5,208	6,081	3,669
23	-	-	-	3,274
30	3,543	2,460	2,167	-
60	1,189	1,087	1,166	2,875

Tabla 5 Porcentajes de remoción de hidrocarburos alifáticos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.

Días de muestreo	Control	Composteo-Caña	Composteo-Coco	Bioaumentación
0	0	0	0	0
7	49.07	28.97	12.56	34.92
14	55.45	38.05	34.85	55.19
30	59.98	70.74	76.79	60.01
60	86.57	87.07	87.51	64.89

Tabla 6 Compuestos alifáticos identificados durante la cinética en los distintos sistemas de biorremediación.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Compuesto	Tiempo de Retención (min)
C ₁₀	5.199	C ₁₂	6.224	C ₁₆	7.650
C ₁₀	5.247	C ₁₂	6.266	C ₁₆	7.825
C ₁₀	5.318	C ₁₂	6.367	C ₁₆	7.890
C ₁₀	5.367	C ₁₂	6.462	C ₁₆	8.045
C ₁₀	5.399	C ₁₂	6.550	C ₁₈	8.297
C ₁₀	5.444	C ₁₂	6.624	C ₁₈	8.464
C ₁₀	5.482	C ₁₂	6.654	C ₁₈	8.933
C ₁₀	5.558	C ₁₂	6.694	C ₁₈	9.466
C ₁₀	5.627	C ₁₄	6.744		
C ₁₀	5.689	C ₁₄	6.850		
C ₁₀	5.752	C ₁₄	7.054		
C ₁₀	5.802	C ₁₄	7.100		
C ₁₀	5.849	C ₁₄	7.138		
C ₁₀	5.912	C ₁₄	7.255		
C ₁₀	5.977	C ₁₄	7.322		
C ₁₀	6.025	C ₁₄	7.463		
C ₁₀	6.085	C ₁₄	7.511		
C ₁₀	6.158	C ₁₄	7.600		

Tabla 7 Concentración (ppm) de hidrocarburos aromáticos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.

Días de muestreo	Control	Composteo-Caña	Composteo-Coco	Bioaumentación
0	830	772	571	887
7	429	513	375	373
14	364	387	368	387
30	264	325	188	286
60	250	257	171	156

Tabla 8 Porcentajes de remoción de hidrocarburos aromáticos en los diferentes sistemas a lo largo de la cinética de biorremediación.

Días de muestreo	Control	Composteo-Caña	Composteo-Coco	Bioaumentación
0	0	0	0	0
7	48.32	33.56	34.38	57.96
14	56.14	49.95	35.56	56.33
30	68.18	57.86	67.05	67.76
60	69.83	66.75	70.10	82.41

Tabla 9 Compuestos aromáticos identificados durante la cinética en los distintos sistemas de biorremediación.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
Naftaleno	6.07
Fenantreno	8.80
Benzo(a)pireno	18.50

CAPÍTULO 6. REFERENCIAS

- Adams, R., Domínguez, V. y García, L. (1999). Potencial de la Biorremediación de Suelo y Agua Impactados por Petróleo en el Trópico Mexicano. *TERRA Latinoamericana*, 17(2): 159-174.
- Albert L. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud, Limusa. (253-264).
- Arce J. M., (2004). Remoción de las Fracciones Alifática, Policíclica Aromática y Azufrada de Petróleo en Suelo por Cultivo Sólido. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Zacatenco .Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Tesis que presenta para obtener el grado de Doctor en Ciencias.190 pp. (1,96).
- Atlas, R., y Bartha, R., (2002). *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Madrid: Pearson Education S.A. 677 pp. (559).
- Baek, K., Yoon, B., Oh, H. and Kim, H. (2006). Biodegradation of Aliphatic an Aromatic Hydrocarbons by *Nocardia-Sp* H17-1. *Geomicrobiology Journal*, (23): 253-259.
- Bautista, G. y Flores, C. (2008), (en línea). Disponible en <http://www.femisca.org/publicaciones/XIVcongreso/XIVCNIS050.pdf>
- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S. y Miranda, J. (2006). Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos Derivados del Petróleo. *Nova*, 4(5): 82-90.
- BIOETICA. (2008), (en línea). Disponible en http://www.tesis.bioetica.org/lp1.htm#_Toc122116137 (25 de mayo de 2008).
- Duran, N y Contreras, M. (2006). Alternativas de Tratamiento para Tierras Fuller Contaminadas con Aceite Dieléctrico. *Scientia et technica*, (32): 419-424.

-
- Echevarría, E., (2003). Devoradoras de Petróleo Biorremedian Suelos Contaminados, (en línea). Disponible en <http://www.invdes.com.mx/forma01.cfm?id=357&publicant=Sep%202003> (30 de septiembre de 2007).
 - EPA, (2006). Bioremediation. (en línea). Disponible en <http://www.epa.gov/nrmrl/pubs/bioreem/pdf/iibiov.pdf> (7 de mayo de 2008).
 - EPA, (2008). Glossary. (en línea). Disponible en <http://www.epa.gov/OUST/pubs/esa-glos.pdf> (7 de mayo de 2008).
 - Ercoli, E., Galvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Videla, S.y Medaura, C., (2003). Biorremediación de Suelo Altamente Contaminados, (en línea). Disponible en <http://biblioteca.iapg.org.ar/iapg/archivosadjuntos/ingepet/EXPL-8-EE-03.PDF> (25 de marzo de 2008).
 - Farahat L. and El-Gendy N. (2008). Biodegradation of Baleym Mix Crude Oil in Soil Microcosmos by some Locally Isolated Egyptian Bacterial Strains. *Soil & Sediment Contamination*, (17): 150-162.
 - Fernández, L., Rojas, N., Roldan, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Uribe, R., Reyes, R., Flores, D. y Arce J. (2006). *Manual de Técnicas de Análisis de Suelos Aplicadas a la Remediación México*: INE. 180 pp. (89-115).
 - Feijoo, G., Moreira, M. y Lema, J., (2003), Recuperación de Litoral Contaminado por Fuel Mediante Técnicas de Biorremediación. *Boletín das Ciencias Especial Prestiqe*.(52): 87-102
 - Goetz J. and Brenner R., (2002). Application, Performance, and Costs of Biotreatment Technologies for Contaminated Soils. *Estados Unidos de América: Enviromental Protection Agency*. 115 pp. (28-39).

- Hamdan A., (2004). Biomonitoring: Seguimiento de Poblaciones Microbianas en Procesos de Biorremediación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos. México: UAM. 80 pp. (8-16).
- Henry, J. G. and Heinke, G. W., (1996). Environmental Science and Engineering. Estados Unidos: Prentice Hall. 778 pp. (69-61).
- Jiménez B., (2001). La Contaminación Ambiental en México: Causas Efectos y Tecnología Apropiaada. México: Limusa. 926 pp. (33-315).
- Kaczorek, E., Olaszanowski, A. and Cybulski, Z. (2005). Analysis of Surface Tension during Biodegradation of Hydrocarbons. Polish Journal of Environmental Studies. 14 (2): 179-183.
- Leyva, D. e Iturbe, R., (2006). Comparación de Técnicas de Saneamiento en un Suelo Contaminado con Petróleo Crudo de Tabasco. (en línea). Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/339/33909608.pdf> (22 de mayo de 2008).
- Maila, M. y Cloete, T. (2004) Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons through Landfarming: are Simplicity and Cost-Effectiveness the only Advantages. Reviews in Environmental Science. (3): 349-360.
- Margensin, R. and Schinner, C., (2001). Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of Diesel-Oil-Contaminated Soil Alpine Glacier Skiing Area. Applied and environmental microbiology. 67 (7): 3127-3133.
- Minai, D. and Herfatmanesh, A., (2007). Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Fractions of Heavy Crude Oil-Contaminated Soil: A Pilot Study. Bioremediation journal. 11 (2): 71-76.
- Ministerio del Medio Ambiente de España. (2007). Usos alternativos para lodos procedentes de la depuración de aguas residuales urbanas: biorrecuperación de suelos contaminados con hidrocarburos en ambientes semiáridos, (en línea). Disponible en

www.biorrehid.cebas.csic.es/ant_tecnicas.html (22 de mayo de 2008).

- Morrison R. y Neilson R. (1998). Química Orgánica. México: Addison Wesley Longman. 1474p (1147-1158)
- PEMEX (2006). PEMEX. (en línea). Disponible en <http://www.pemex.com/index.cfm?action=content§ionID=119&catID=11480> (6 de mayo de 2008).
- (PEMEX, 2006). PEMEX (en línea). Disponible en <http://desarrollosustentable.pemex.com/index.cfm?action=content§ionID=1&catID=112&contentID=130> (6 de mayo de 2008)
- PEMEX (2007). Anuario Estadístico 2007, (en línea). Disponible en: <http://www.pemex.com/index.cfm?action=content§ionID=1&catID=11421> (6 de mayo de 2008)
- PEMEX (2008). PEMEX en Números: Información y Estadísticas, (en línea). Disponible en http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?PG_REQTYPE=REDIRECT&PG_MRsaved=false&PG_Func=GETBINARY&PG_File=rnfxsmcg.pdf (6 de mayo de 2008)
- Peña, C., Carter, D. y Ayala, F. (2001). Toxicología ambiental. Evaluacion de riesgos y restauración ambiental. (en línea). Disponible en (<http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/c4-3-1-1.html>)
- Pine S., (1998). Química Orgánica. México: Mc Grall Hill. 1088 pp (31-32).
- (PROFEPA (2008) en COATEA, (en línea). Disponible en : <http://www.profepa.gob.mx/PROFEPA/InspeccionIndustrial/EmergenciasAmbientalesIndustria/Presentacion.htm>
- Ramírez, L., Bouchot, G., Flores, J., Duran, R., Trejo, J., Olmsted, I., Valencia, M. y Morales,

-
- L. (2000). *Petróleo Medio Ambiente y Sociedad; el Incremento de la Explotación Petrolera y su Impacto en la Península de Yucatán*. México: Limusa 123 pp (18-32).
- Riser-Roberts, E. (1998). *Remediation of Petroleum Contaminated Soils. Biological, Physical and Chemical Processes*. Estados Unidos de América: Lewis Publishers, 542 pp. (6- 33).
 - Rittmann B. y McCarty P. (2001). *Biotecnología del Medio Ambiente: Principios y Aplicaciones*. España: Mc Graw Hill, 745 pp (555-639).
 - Robles, I., Fava, F. And Poggi, H. (2008). A Review on Slurry Bioreactors for Bioremediation of Soils and Sediments. *Microbial cell factories*. 7 (5): 64-79
 - SEMARNAT, (2006) (en línea). Disponible en http://www.semarnat.gob.mx/queessemarnat/politica_ambiental/ordenamientoecologico/documents/documentos_monarca0participacion/recursos_programa_federal.pdf (26 de septiembre de 2007).
 - Sharma P. D., (2005). *Environmental Microbiology*. Delhi: Alpha Science International Ltd. 372 pp. (148-149).
 - Silke, C., Ortiz, R. y Paez, R., (2004) *Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos*. En: *Sustancias Toxicas Persistentes*. Fernández, A., Yarto, M. y Castro, J. México: INE. 269 pp. (173-200).
 - Smith, A., Hristova, K., Wood, I., Mackay, D., Lory, E., Lorenzana, D. and Scow K., (2005). Comparison of Biostimulation versus Bioaugmentation with Bacterial Strain PM1 for Treatment of Groundwater Contaminated with Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE). *Environmental Health Perspectives* 113(3): 317-332.
 - Sodhi G.S, (2000). *Fundamentals Concepts of Environmental Chemistry*. Delhi: Alpha Science International Ltd. 465 pp. (162-163).

-
- Soto, L., Sánchez, S. y López, D., (2004). Ambientes Influidos por Emanaciones Naturales de Hidrocarburos y Gas en el Suroeste del Golfo de México. *Universidad y Ciencia*. (1): 51-58.
 - Straud, J., Paton, G. and Semple, K., (2007). Microbe-Aliphatic Hydrocarbon Interaction in Soil: Implications for Biodegradation and Bioremediation. *Journal of Applied Microbiology* (102): 1239-1253.
 - Vallejo, V., Salgado, L. y Roldan, F., (2005). Evaluación de la Bioestimulación en la Biodegradación de HTPs en Suelos Contaminados con Petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 7(2): 67-78.
 - Van Deuren, J., Wang, Z. and Ledbetter, J., (2002) Remediation Technologies Screening Matrix and References Guide. Technology Innovation office, EPA. (en línea). Disponible en <http://www.epa.gov/tio/remed.htm> (4 de Abril de 2008).
 - Viñas M., (2005). Biorremediación de Suelos Contaminados por Hidrocarburos: Caracterización Microbiológica, Química y Ecotoxicológica. Universitat de Barcelona. Disponible en http://www.tesisenxarxa.net/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0920105_085623//TESIS_MVI%D1AS_CANALS.pdf (19 de septiembre de 2007).
 - Volke T. y Velasco J., (2002). Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados. México: INE-SEMARNAT. 62 pp. (27-46).
 - Volke T. L. y Velasco J. A., (2003). Biodegradación de Hidrocarburos del Petróleo en Suelos Intemperizados mediante Composteo. México: SEMARNAT-INE. 33 pp. (5-18).
 - Yarza, J., Martínez, J. y Tolosa, I., (1999) Petróleo, Materia Prima para la Industria Química, (en línea): Disponible en <http://www.envirotools.org/factsheets/bioremediation.html> (10 de mayo de 2008).

- Yerushalmi, I., Rocheleau, S., Cimpoaia, R., Sarrazin, M., Sunahara, G., Peisajovich, A., Leclair, G. and Guiot, S. (2003). Enhanced Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Contaminated Soil. *Bioremediation Journal*. 7(1): 37-51.