

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



TRANSFERENCIA DE MASA Y BIODEGRADACION DE
HIDROCARBUROS DE UN SUELO INTEMPERIZADO EN UN
CULTIVO DE SUELO EN SUSPENSIÓN

T E S I S

Que para obtener el grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

M. en B. Mayola García Rivero

Director de tesis:
Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Enero de 2003

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo con el convenio **PFP-20-93**”.

México D.F. a 23 de Enero de 2003

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

**TRANSFERENCIA DE MASA Y BIODEGRADACION DE HIDROCARBUROS DE UN SUELO
INTEMPERIZADO EN UN CULTIVO DE SUELO EN SUSPENSIÓN**

que presentó la alumna

Mayola García Rivero

Director de tesis:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Jurado:

Asesor: Dr. Gerardo Saucedo Castañeda
Universidad Autónoma Metropolitana

Asesor: Dr. Santiago Flores y De Hoyos
Instituto Mexicano del Petróleo

Sinodal: Dra. Susana Saval Bohórque
Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México

Sinodal: Dra. Josefina Barrera Cortés
Departamento de Biotecnología, Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	xiii
1.Revisión bibliográfica	1
1.1. Contaminación del suelo con hidrocarburos	1
1.1.1. Composición y propiedades de los hidrocarburos del petróleo	2
1.1.2. Propiedades de los constituyentes del suelo	6
1.1.3. Sorción de los hidrocarburos en el suelo	7
1.2. Biodegradación de hidrocarburos	8
1.2.1. Intemperización y biodisponibilidad	9
1.2.2. Desorción y biodegradación de hidrocarburos	11
1.3. Medición de la biodisponibilidad	13
1.3.1. Biodisponibilidad y extracción con solventes	13
1.3.2. Estimación de la biodisponibilidad asociada a los fenómenos de transporte	14
1.4. Mejoramiento de la biodisponibilidad	17
1.4.1. Aplicación de surfactantes	18
1.4.2. Aplicación de solventes	20
1.5. Tratamiento de suelos contaminados en sistemas de suspensión de suelo	23
1.5.1. Biorreactores de suspensión de suelo: descripción y variables del proceso	23
1.5.2. Aplicaciones en campo	25
1.5.3. Procesos patentados	26
1.6. Modelamiento del consumo de compuestos en el suelo	28
2. Objetivos	35
3. Hipótesis	36
4. Materiales y métodos	37
4.1. Reactivos	37
4.2. Medio de cultivo	37
4.3. Caracterización del suelo	38

4.4. Consorcio microbiano	38
4.4.4. Obtención y conservación	38
4.4.5. Propagación del consorcio	38
4.4.6. Cuenta microbiana	38
4.5. Técnicas analíticas	39
4.5.1. Extracción de hidrocarburos	39
4.5.2. Solubilidad de hidrocarburos	40
4.5.3. Cuantificación de hidrocarburos	40
4.5.4. Fraccionamiento de hidrocarburos	41
4.5.5. Cuantificación de tolueno	42
4.5.6. Cuantificación de CO ₂ en frascos serológicos	42
4.6. Desorción de hidrocarburos	42
4.6.1. Desorción con diferentes solventes	42
4.6.2. Desorción en presencia de tolueno	43
4.6.3. Distribución de tolueno en el sistema	43
4.7. Cinéticas de biodegradación de hidrocarburos	49
4.7.1. Biodegradación de hidrocarburos en microcosmos con diferentes solventes	44
4.7.2. Biodegradación de hidrocarburos en microcosmos con tolueno	44
Resultados y discusión	
5. Caracterización del suelo y contaminantes	46
5.1. Propiedades fisicoquímicas del suelo	46
5.2. Características de los contaminantes	47
6. Desorción y biodegradación con diferentes solventes	48
6.1. Efecto de los solventes en la desorción de los hidrocarburos	48
6.1.1. Desorción y solubilidad de hidrocarburos	48
6.1.2. Composición de los extractos de desorción	50
6.2. Efecto de los solventes en la biodegradación de hidrocarburos	52
6.2.1. Desorción y biodegradación de hidrocarburos	52
6.2.2. Composición de los extractos de hidrocarburos de degradación	54
6.2.3. Mineralización de hidrocarburos	56
6.2.4. Consumo de oxígeno en presencia de diferentes solventes	61
6.3. Efecto del tolueno en la desorción de hidrocarburos	63
6.3.1. Desorción de hidrocarburos en presencia de tolueno	63
6.3.2. Efecto del tolueno en la tasa de desorción	67
6.3.3. Partición del tolueno en las fases del sistema de estudio	69
7. Desorción/biodegradación simultánea en presencia de tolueno	73
7.1. Efecto del tolueno en la desorción/biodegradación simultanea	73
7.1.1. Desorción/biodegradación simultanea	73
7.1.2. Mineralización de hidrocarburos	77

7.1.3. Consumo de oxígeno	80
7.1.4. Estimación del consumo de hidrocarburos en la fase líquida	83
7.2. Modelamiento matemático	85
7.2.1. Bases teóricas del modelo	86
7.2.2. Estimación de las constantes del modelo	90
7.2.3. Predicción del consumo de hidrocarburos en fase líquida	94
8. Conclusiones	96
9. Recomendaciones	97
10. Referencias bibliográficas	98
11. Anexos	107
11.1. Propiedades fisicoquímicas de los solventes	107
11.2. Análisis estadísticos de los análisis de desorción	108
11.3. Análisis estadísticos de los análisis de desorción/biodegradación simultánea	113
12. Glosario	118
Productos derivados de la formación doctoral	119

A mis padres por todo su amor y comprensión que me han brindado en todos los momentos...

Con todo mi amor a Valery, por llenar de alegría mi vida....

A José Luis por estar a mi lado....

A Joel, Gaby, Mary, Lalo y Beto...

AGRADECIMIENTOS

Parte del trabajo de tesis fue financiado por el CONACYT a quien expreso un especial reconocimiento por apoyar la realización de mis estudios de Posgrado.

Agradezco al Instituto Mexicano del Petróleo la beca que me otorgó, como parte del proyecto IMP FIES-96F-48-VI, en apoyo al desarrollo del presente trabajo.

RESUMEN

El objetivo fundamental del trabajo fue mejorar la transferencia de masa de hidrocarburos intemperizados de un suelo contaminado a la fase líquida, incrementando la desorción de los hidrocarburos mediante la adición de un solvente. Todos los estudios se realizaron en microcosmos de 165 ml con un cultivo de suelo en suspensión al 30% (p/v). La muestra de suelo con la que se desarrolló el trabajo fue tomada en un sitio próximo a una refinería localizada en el estado de Veracruz. Del mismo sitio se tomó una planta nativa (*Cyperus Laxus* Loam), que crecía en el suelo contaminado, para a partir de su rizósfera aislar un consorcio microbiano adaptado a concentraciones elevadas de hidrocarburos, mismo que se utilizó para estudiar el proceso de biodegradación.

Se ha demostrado, por diversos investigadores, que la biodisponibilidad de hidrocarburos intemperizados, cuando se trabaja en un cultivo de suelo en suspensión, puede incrementarse por el uso de surfactantes o solventes. En este trabajo se optó por el uso de solventes para mejorar el proceso global de biodegradación dado que un surfactante podría favorecer un exceso de producción de espuma. Se compararon tres solventes de tipo polar, hexano, tolueno y benceno; y tres de tipo no polar, acetona, butanol y metanol. Se determinó que no existe correlación entre la polaridad del solvente y la desorción de los hidrocarburos en el suelo. La mayor desorción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) se obtuvo con tolueno, cuyo extracto contiene una alta proporción de compuestos aromáticos y asfaltenos. Posteriormente se estudio la desorción/biodegradación simultánea en la cual la adición de tolueno incrementó de manera significativa, con respecto al control sin solvente, el consumo de

HTP y particularmente el consumo de compuestos poliaromáticos. Los resultados de la desorción/biodegradación simultánea con los demás solventes probados no fueron significativamente diferentes al control sin solvente.

Con base en los resultados anteriores se seleccionó al tolueno para determinar el efecto de la concentración de tolueno en la desorción de HTP y en la desorción/biodegradación. La tasa de desorción mostró un comportamiento exponencial con respecto a la concentración de tolueno. En el intervalo de concentraciones de tolueno probadas, la mejor degradación ocurrió cuando se adicionaron 14 000 mg/kg de suelo base seca, en 30 días de tratamiento los HTP iniciales, 292 000 mg de HTP/kg de suelo base seca, disminuyeron un 47% a 30 °C, 150 rpm y 10 % de inóculo (v/v).

Sin embargo el consumo de HTP fue inhibido cuando se adicionaron más de 14 000 mg de tolueno/kg de suelo. Para los fines de este trabajo se supuso que el consumo de hidrocarburos sólo ocurre en la fase líquida y este consumo fue explicado por un modelo de inhibición por sustrato que generó una k_m y una k_i de 57 y 490 mg HTP/l de suspensión, respectivamente. Este modelo también permitió estimar el grupo adimensional de Damköhler (Da), como una relación entre la tasa de degradación máxima de hidrocarburos y la transferencia de masa máxima de hidrocarburos entre la superficie del suelo y la fase líquida. El Da indicó que la transferencia de masa de los hidrocarburos es el paso que limita el proceso de biodegradación en concentraciones de tolueno menores a 86 000 mg/kg de suelo. Con concentraciones de tolueno superiores, la reacción biológica se convierte en el paso limitante, según lo indica el Da . Los resultados se explican por el efecto inhibitorio de los compuestos

solubles en la fase líquida (HTP-tolueno) que pueden disminuir la actividad de la población microbiana provocando la acumulación de HTP-Tolueno.

Los resultados obtenidos confirmaron que es factible el uso de solventes, específicamente tolueno, para acelerar la desorción y mejorar la biodegradación de HTP. Tratamiento sur podría ser aplicable a otros suelos altamente contaminados con hidrocarburos intemperizados siguiendo la estrategia propuesta pero utilizando otros solventes.

ABSTRACT

The objective of this study was to improve the mass transfer of aged hydrocarbons from contaminated soil to liquid phase. We study the feasibility of use solvents as treatment to increase the desorption rate and the biodegradation rate. The assays were performed in soil slurry (30% w/v) in 165-mL serological bottles. The soil was obtained from a site next to a refinery localized in the state of Veracruz, Mexico. The microbial consortium used was isolated from the rizosphere of a native plant (*Cyperus laxus* Lam) that naturally grown in the contaminated site.

Surfactants or solvents are used to increase the bioavailability of aged hydrocarbons in slurry phase. In this work, we proposed the use of solvents to improve the biodegradation rate, because some surfactants are toxic and excess of foam could complicate the treatment in soil slurry. A comparison of the hydrocarbons extracted with different solvents: hexane, toluene and benzene (polar) and acetone, butanol and methanol (non-polar) were made. The desorption rate was not correlated with polarity solvent. The higher desorption rate of total petroleum hydrocarbons (TPH) was obtained with toluene, in this case the extract was composed by polyaromatic compounds and asphaltenes. In desorption/biodegradation assays, toluene addition increased the hydrocarbon consumption rate significantly, while other solvents did not a significative effect on hydrocarbon consumption rate.

Toluene was selected to studied the effect of its concentration on desorption of hydrocarbons and on desorption-biodegradation assays. Our studies showed that toluene increase exponentially the desorption rate. Addition of 14 000mg/kg of soil increases the

consumption rate three times in comparison to control without solvent. In 30 days the initial TPH concentration in soil, 292 000 mg/kg of soil, diminished 47% when the serological bottles contained 10% (v/v) precultured microorganisms and they were incubated at 30°C in a rotatory shaker at 150 rpm.

Toluene probably yield a highly toxic toluene-hydrocarbon phase when more than 14 000 mg/kg of soil was added. The inhibitory effect of toluene-TPH was also studied. A substrate inhibition model was used: the k_m and k_i constants were 57 and 490 mg TPH/L liquid phase, respectively. The proposed model lead us the dimensionless Damkhöler number (Da) that is defined as the ratio of the rate of maximum degradation to maximum convective mass transfer between soil surface and liquid phase. Da Evaluation showed that rate of mass transfer was the limiting step in overall biodegradation in non-solvent control. When high concentration of toluene was added then bioreaction was the limiting step, but inhibitory effect of toluene-TPH should be considered. The data in the system are well described by the proposed model involving sequential desorption and biodegradation restricted to liquid phase.

Results showed clearly that solvents could be used to increase desorption rate. A greater increase of desorption and desorption/biodegradation of hydrocarbons were obtained when toluene was added.

INTRODUCCION

La liberación accidental de hidrocarburos al suelo trae como consecuencia efectos negativos sobre la vegetación y frecuentemente la acumulación de los contaminantes en las plantas así como en el suelo. Sin bien la biorremediación es una tecnología ampliamente aceptada para el saneamiento de suelos contaminados, se desconoce a fondo los fenómenos químicos y biológicos implicados durante el proceso de biorremediación.

El tratamiento de suelos contaminados puede efectuarse en fase sólida o en suspensión de suelos (slurry phase), en este último proceso el suelo o lodo contaminado se trata en un biorreactor en donde se realizan la extracción y la biodegradación de los contaminantes. El mezclado continuo en el biorreactor permite mantener el suelo en suspensión a la vez que permite el rompimiento de los agregados de suelo. Favoreciendo la disolución de contaminantes y en consecuencia se reduce la resistencia a la transferencia de masa de los contaminantes de la fase sólida a la fase líquida. Cuando un compuesto ha permanecido por un largo período de tiempo en el suelo tiende a migrar hacia los poros y microporos del suelo, sitios a los cuales no tienen acceso los microorganismos (Alexander, 2000). Para que estos compuestos estén disponibles para los microorganismos deben difundir para llegar a la superficie del suelo. Aunque algunos investigadores señalan que el consumo ocurre tanto en la superficie del suelo como en la fase líquida (Zhao y Voice, 2000), en este trabajo se supone que el consumo ocurre sólo cuando los hidrocarburos están disueltos en la fase líquida.

El proceso global de biodegradación puede ser controlado por la transferencia de masa o la reacción biológica. Cuando se trabaja con hidrocarburos en suelos intemperizados

(Carmichael y col. 1997) el paso que limita el proceso es la transferencia de masa. Para incrementar la tasa de desorción se ha propuesto el uso de surfactantes (Boopathy y Manning, 1999) y solventes (Castaldi, 1993). Los surfactantes han mostrado efectos contradictorios (Liu y col. 1995) y tienen la desventaja de incrementar la formación de espuma en un reactor con agitación. En cuanto al uso de solventes se ha preferido a los de baja toxicidad: aceite de parafina (Jiménez y Bartha, 1996) o aceite de silicón (Villemour y col. 2000). Sin embargo, se ha demostrado que la tolerancia de los microorganismos y estimulación de la biodegradación aumenta el espectro de posibles solventes que pueden utilizarse, como es el caso del tolueno (Robertson y Alexander, 1996).

Es poco lo que se ha publicado sobre el tratamiento de suelos intemperizados con cultivos en suspensión aplicando solventes para mejorar la biodegradación. Debido a esto surgió como interés de este trabajo: (i) incrementar la desorción de HTP mediante la adición de solventes, (ii) controlar la tasa de desorción y equilibrar la desorción/biodegradación, (iii) identificar el paso que limita el proceso global y (iv) predecir el consumo de los hidrocarburos en la fase líquida.

El trabajo se dividió en tres partes, en la primera se estudió el efecto del hexano, tolueno y benceno, butanol, acetona y metanol en la solubilización y desorción de HTP del suelo en microcosmos de 165 ml. Posteriormente se estudió como se modifica la desorción/biodegradación simultánea de HTP en un cultivo de suelo en suspensión a nivel microcosmos por la adición de los mismos solventes.

En la segunda parte, se estudió el efecto de la concentración de tolueno en la desorción y después en el proceso global desorción/ biodegradación en cultivo de suelo en suspensión. Se

sabe que algunos compuestos en concentraciones altas son tóxicos a los microorganismos y que el consumo de esos compuestos puede ser descrito por una cinética de inhibición por sustrato. Bajo esa premisa se propuso un modelo de inhibición por sustrato acoplado a un mecanismo sencillo de desorción en estado transitorio. El modelo permitió apoyar la hipótesis de que el consumo de HTP se lleva a cabo en la fase líquida. Se estimaron las constantes de afinidad (k_m) y de inhibición (k_i) y el grupo adimensional de Damköhler que proporciona información sobre la relación entre la biodegradación de hidrocarburos y la transferencia de masa de hidrocarburos entre la superficie del suelo y la fase líquida.

REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

1. Revisión bibliográfica

Con el fin de ubicar el trabajo en el contexto del avance científico del tratamiento de suelos intemperizados contaminados con hidrocarburos se presenta la siguiente revisión bibliográfica. En este capítulo se discute sobre las propiedades de los hidrocarburos y del suelo que inciden sobre la biodegradación de compuestos sorbidos. Así mismo se discute sobre algunas alternativas que se han empleado para mejorar el proceso global de biodegradación y finalmente se hace una semblanza del tratamiento de suelos en biorreactores de suelo en suspensión.

1.1. Contaminación del suelo con hidrocarburos

En México existen varias áreas contaminadas con hidrocarburos del petróleo como consecuencia de las actividades de extracción, refinamiento y transporte, además de los derrames accidentales. Los sitios más afectados se localizan esencialmente en el sudoeste de la república, al sur de Veracruz y en el norte de Tabasco. Una de las zonas más contaminadas se localiza en las inmediaciones de la Refinería de Minatitlán, Veracruz, específicamente en el Pantano de Santa Alejandrina, con una extensión de 720 Ha. Esta zona ha estado expuesta por casi 100 años a los efectos de los hidrocarburos. En el pantano, la concentración de los contaminantes varía en los diferentes sitios pero puede alcanzar valores tan altos como 500 000 ppm (Gallegos y col. 2000). Entre los principales contaminantes se distinguen compuestos que pertenecen al grupo de los alifáticos y al de los asfaltenos con un 39.8 y 32.4%, respectivamente.

En los últimos años PEMEX ha realizado diversos trabajos, en colaboración con instituciones de educación superior o contratando empresas de consultoría que han aplicado tratamientos de biorremediación, con la intención de recuperar el sitio. Sin embargo, el alto grado de contaminación y la inexperiencia de muchas empresas no ha permitido resolver el problema. De ahí la importancia de tratar de identificar y explicar cuales son los fenómenos que limitan el tratamiento biológico para plantear estrategias. Antes de detallar los fenómenos que ocurren en la biodegradación de los contaminantes en el suelo, a continuación se describen las propiedades del suelo y de los hidrocarburos que tienen un efecto directo en la biodegradación.

1.1.1. Composición y propiedades de los hidrocarburos del petróleo

El petróleo se compone de carbono e hidrógeno y en menor proporción de los otros elementos que se listan en la Tabla 1.1. Los compuestos presentes en el petróleo crudo y derivados pueden dividirse en cuatro grupos: alifáticos, aromáticos, polares o resinas y asfaltenos (Tissot y Welte, 1982). Los alifáticos incluyen alcanos ramificados y de cadena lineal; cicloalcanos con diferente número de anillos y cadenas laterales (Huesemann y Moere, 1993). El patrón de enlace de los hidrocarburos alifáticos permite una distribución uniforme de la carga electrónica y por tanto son moléculas no polares o ligeramente polares. La fuente de sus interacciones electromagnéticas es función del movimiento aleatorio de la nube de electrones que circundan la molécula. Constantemente la distribución de la nube electrónica cambia de manera aleatoria provocando fluctuaciones polares que cambian la superficie molecular. Aunque no se forman configuraciones polares, temporalmente se crean dipolos.

Los hidrocarburos aromáticos sencillos son compuestos tales como el tolueno, benceno, xileno, naftalenos y bifenilos. Los aromáticos tri y policíclicos (HPA), presentes en menor cantidad son: fenantreno, antraceno, criseno, benzofluoreno y pireno. La estructura de anillos en estas moléculas es simétrica y se distribuyen en forma de láminas con nubes de electrones sobre y debajo del plano de la molécula (Cerniglia, 1992). Los patrones de enlaces les proporcionan cierta polaridad, ya que las nubes de electrones alrededor de la molécula pueden ser deformadas por moléculas adyacentes dando como resultado una carga parcial positiva o negativa.

Tabla 1.1. Composición elemental promedio del petróleo crudo

% en peso		ppm	
C	83 - 87	V	5 - 1500.0
H	10 - 14	Ni	3 - 120.0
S	0.05 - 6	Fe	0.04 - 120.0
N	0.1 - 2.5	Cu	0.2 - 120.0
O	0.5 - 1.5	Co	0.001 - 12.0
		Si	0.1 - 5.0
		Mg y Ca	1 - 2.5
		Zn y Al	0.5 - 1.0
		Pb	0.001 - 0.2
		Hg	0.03 - 0.1

El grupo polar o de las resinas se define como la fracción de compuestos que son solubles en *n*-alcanos (pentano) y solventes aromáticos (tolueno) e insolubles en acetato (Diallo y col. 2000). Esta fracción está compuesta por hetero-compuestos con átomos polares como nitrógeno, azufre y oxígeno. Entre los compuestos representativos se pueden mencionar los ácidos nafténicos, mercaptanos y tiofenos. Los compuestos polares de bajo peso molecular se

forman como consecuencia de la degradación microbiana de compuestos alifáticos y aromáticos (Huesemann y Moore, 1993), en los residuos de biodegradación se han identificado principalmente cetonas, ácidos grasos y ésteres, además de cicloalifáticos y aromáticos (Riss y col. 1996).

Por último, los asfaltenos son la fracción más pesada del petróleo, insoluble en *n*-alcanos (pentano y heptano) (Diallo y col. 2000). Se forman debido a la oxidación de las resinas naturales. Cuando se precipitan son partículas semisólidas de color café o negro, una descripción esquemática de su estructura se muestra en la Fig.1.1 (Altamirano, 1986). A escala microscópica están compuestos por estructuras alifático/nafténicas que rodean o conectan láminas de aromáticos polinucleares. Esas láminas se ordenan en grupos pequeños para formar el núcleo de las partículas de asfaltenos, que a su vez es rodeado por otras unidades alifático/nafténicas (corona). Se cree (Fenistein y col. 1998) que en solución conservan su estructura debido a la solvatación de la corona.

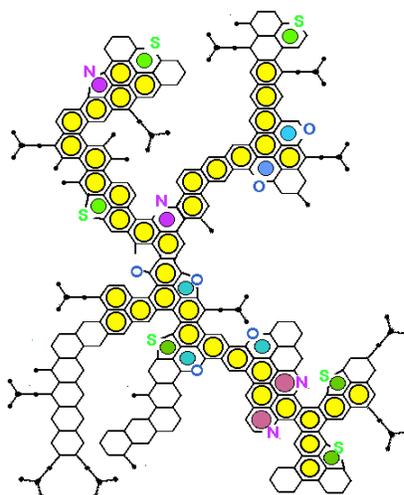


Fig. 1.1 Estructura molecular de un asfalteno de petróleo crudo maya.

Blackburn y Hafker (1993) sugirieron que la susceptibilidad de biodegradación de los compuestos puede resumirse según se muestra en la Tabla 1.2. Los alcanos lineales de la fracción saturada son los más susceptibles, seguidos de los cicloalcanos y aromáticos de bajo peso molecular; la resistencia de los compuestos aromáticos aumenta con el número de anillos. Generalmente la persistencia de los hidrocarburos del petróleo en el ambiente se incrementa en relación directa con el punto de ebullición de los compuestos. Los asfaltenos generalmente han sido considerados como recalcitrantes (resistentes) a la biodegradación microbiana. Aunque se ha reportado que la degradación de estos compuestos es posible en condiciones en donde las moléculas están dispersas o solubles (Riser-Roberts, 1997).

Tabla 1.2 Susceptibilidad de hidrocarburos a la degradación

Susceptibilidad de degradación	Hidrocarburos
Altamente susceptibles	n- alcanos e iso-alcanos
Muy susceptibles	1-, 2-, 5- y 6- cicloalcanos, aromáticos de 1-anillo aromáticos
Moderadamente	cicloalcanos de 3- y 4- anillos, y aromáticos de 2 y 3 -anillos-
Muy resistentes	Tetra-aromáticos, estereanos, triterpenos y aromáticos nafténicos
Altamente resistentes	Penta-aromáticos, asfaltenos y resinas

La biodegradación de los hidrocarburos en el ambiente natural de los suelos no sólo está controlada por la estructura química de los compuestos, también intervienen factores ambientales y físicos. Los primeros se refieren a las condiciones que permiten el desarrollo de los microorganismos nativos del suelo y su actividad de biodegradación. En cuanto a los

factores físicos, el más importante es la disponibilidad de los compuestos a los microorganismos, ésta involucra la afinidad del contaminante o la repartición de los contaminantes en las fases presentes en el suelo: sólida, líquida y gaseosa. Para comprender el tipo de interacciones que ocurren entre los contaminantes y los componentes del suelo, en la siguiente sección se describe brevemente las propiedades de los constituyentes del suelo.

1.1.2. Propiedades de los constituyentes del suelo

La fase sólida del suelo es una mezcla de materiales inorgánicos y orgánicos que determinan la estructura del suelo. La fracción inorgánica está compuesta por fragmentos de rocas y minerales de diferente tamaño y composición. De acuerdo al tamaño, las fracciones del suelo se clasifican en arena, limo y arcilla. La arena es de tamaño uniforme (0.02-2.0 mm) aunque de formas irregulares, es químicamente inerte y no tiene carga eléctrica por tanto tiene una baja capacidad de intercambio iónico (Kim, 1994). El limo tiene un tamaño intermedio (0.002-0.02 mm) y presenta características que están entre la arena y la arcilla. La arcilla es la partícula más pequeña (< 0.002 mm), posee carga negativa y es el constituyente inorgánico más activo en el suelo. Su presencia confiere al suelo una alta capacidad de intercambio catiónico (Cresser y col. 1993).

La fracción orgánica es considerada como un polímero tridimensional amorfo compuesto por hidrocarburos aromáticos y alifáticos con cadenas hidrófobas laterales y gran variedad de compuestos polares. Su presencia en el suelo mejora la agregación de partículas produciendo estructuras estables e incrementa la capacidad de intercambio catiónico. Cuando un suelo tiene un alto contenido de materia orgánica posee una gran porosidad y área

superficial lo que implica una importante retención de compuestos exógenos contaminantes. Los componentes del suelo, como cualquier fase sólida, retienen los compuestos contaminantes por sorción. Los mecanismos implicados para cada tipo de compuesto dependen tanto del compuesto mismo como de la fracción del suelo con la que interactúen. A continuación se detalla el caso de los hidrocarburos como contaminantes en el suelo.

1.1.3. Sorción de los hidrocarburos en el suelo.

El término sorción involucra a cualquier asociación reversible de compuestos con la fase sólida, es decir adsorción y absorción. La adsorción se refiere a la retención de compuestos, originalmente presentes en la fase líquida, por la superficie de los componentes del suelo mediante enlaces químicos o físicos. Si los compuestos difunden al interior de los microporos de la fase sólida, entonces ocurre la absorción. Los diferentes mecanismos de sorción incluyen a la "sorción hidrófoba" (o partición), interacciones de van der Waals-London, enlaces de hidrógeno, intercambio de ligandos o reacciones de intercambio iónico (Alexander, 1999).

Entre los componentes del suelo mencionados en la sección 1.1.2, las arcillas y la materia orgánica son los constituyentes que absorben más compuestos exógenos. Cuando se trata de moléculas de elevado peso molecular se retienen en las superficies minerales por enlace de hidrógeno y en el caso de compuestos de bajo peso molecular por intercambio iónico. Las arcillas tipo 1:1, como la kaolinita, tienen menor capacidad de sorción por que las moléculas sólo se adsorben en las superficies externas. En las arcillas 2:1, como es la montmorillonita, la absorción de contaminantes ocurre tanto en la superficie externa como la interna incrementándose por tanto la capacidad de sorción (Weber y col. 1969).

La fracción orgánica del suelo es responsable de la sorción de compuestos hidrófobos, muchos HPA y otros contaminantes no polares son sorbidos principalmente por materia orgánica más que por las arcillas. La retención de compuestos está directamente relacionada con el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) de los compuestos y con el contenido de carbono orgánico del suelo. En el caso de fenantreno, Nam y col. (1998) demostraron que un suelo con un contenido de carbono orgánico mayor a 2%, la retención es evidente después de 200 días de intemperización. Para la sorción de compuestos en la materia orgánica se han propuesto (Alexander, 1999) dos explicaciones: (i) ocurre un enlace físico o químico del compuesto a la superficie del sólido, y (ii) sucede la partición de las moléculas orgánicas hacia la materia orgánica del suelo debido a su solubilidad y penetran en la matriz del sólido que actúa como sorbente.

La sorción es un fenómeno que ocurre en dos etapas, una inicial rápida seguida por una larga etapa lenta controlada por la transferencia de masa del soluto hacia los sitios de absorción. Las cinéticas de sorción y desorción controlan la concentración en la fase líquida de los compuestos sorbidos y por tanto es parte esencial de estudio para un riguroso análisis de la biodegradación de los hidrocarburos que contaminan el suelo.

1.2 Biodegradación de hidrocarburos

Los hidrocarburos liberados al medio por derrames accidentales, rupturas de tuberías o fugas de tanques pueden entrar en el suelo desplazando el agua. En contraste con los compuestos solubles, quedan sorbidos o presentes formando gotas de fase líquida no acuosa

(FLNA). Estos compuestos están sometidos a efectos ambientales y biológicos que provocan cambios químicos que afectan a la biodegradación de los contaminantes. Estos son algunos de los aspectos que se describen en esta sección, además se discute cómo ocurre la biodegradación de los compuestos sorbidos en el suelo.

1.2.1. Intemperización y biodisponibilidad

La composición química y concentración de los hidrocarburos en el suelo son modificadas por el proceso de intemperización, es decir, por efecto de fenómenos tales como evaporación, disolución/lixiviación, oxidación química y biodegradación (Dragun, 1998). Conforme el tiempo de residencia de un compuesto contaminante en el suelo se incrementa se hace menos disponible a los microorganismos debido a la difusión a los microporos y sorción en los componentes del suelo. En este contexto la biodisponibilidad es la facilidad relativa con la que un compuesto puede ser usado por los microorganismos nativos del suelo y se puede entender como la suma del efecto neto entre la desorción y la biodegradación. Así la biodisponibilidad de los compuestos sorbidos es inversamente proporcional a la tasa de desorción. En la Fig. 1.2 se presenta esquemáticamente el conjunto de eventos que rigen la biodisponibilidad de compuestos sorbidos en suelo. Comúnmente las bacterias se alojan en poros, de 0.8 a 3 μm de diámetro, formando biopelículas sobre los agregados de suelo donde se encuentran prácticamente inmóviles. Por tanto el consumo de los contaminantes por los microorganismos depende de las tasas de transferencia de los compuestos y del sitio donde estén presentes: (1) si los compuestos se encuentran en el interior de los microporos, con un diámetro menor a 1 μm , la biodisponibilidad de los compuestos estará siempre gobernada por

liberación a un sitio accesible (Alexander, 2000), es decir a los macroporos. Esto implica una secuencia de desorción-sorción-difusión en el interior de los microporos y la velocidad de transferencia dependerá de la longitud y tortuosidad del poro y de los coeficientes de transporte. (2) cuando los compuestos se encuentran sobre los agregados de suelo, es decir, en los macroporos la liberación a la fase líquida depende sólo de la desorción/adsorción. (3) cuando el contaminante está disuelto en la fase líquida el transporte a la biopelícula sucede por convección debido a gradientes de concentración provocados por el consumo de los contaminantes.

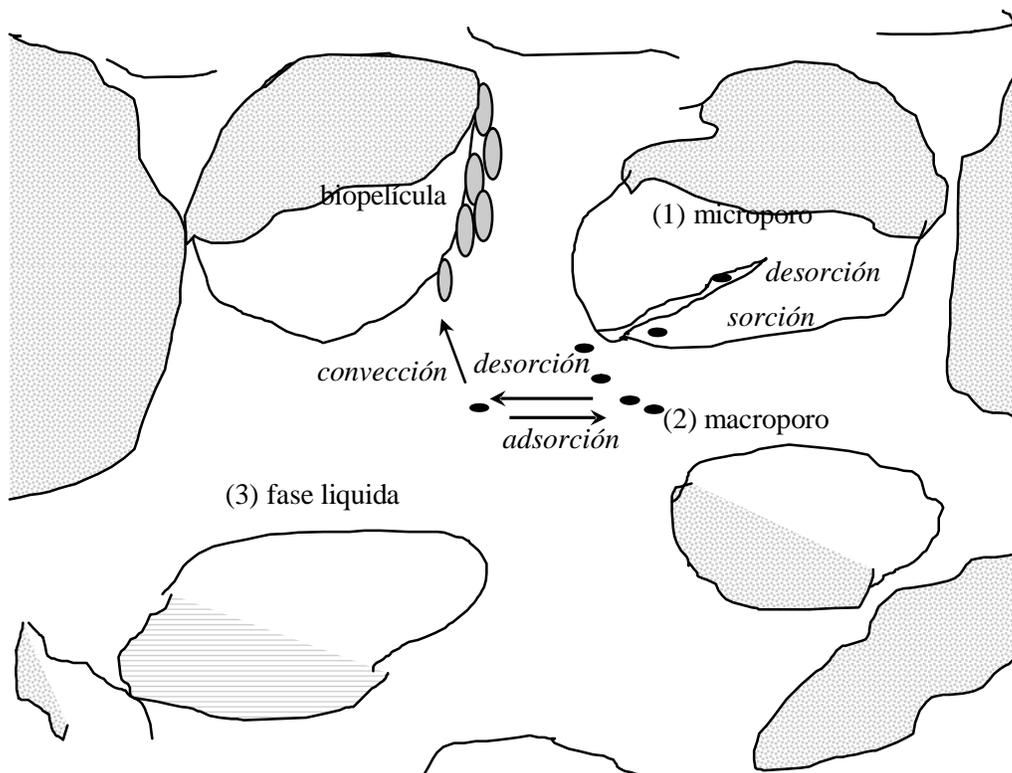


Fig. 1.2. Representación esquemática de los eventos que rigen la biodisponibilidad de las moléculas de contaminantes (=) en el suelo.

Los fenómenos de difusión, adsorción/desorción y convección que se esquematizan en la Fig. 2 pueden manipularse bajo condiciones controladas. Para realizar un control de la desorción es necesario comprender la interrelación de la desorción y la biodegradación, tal que pueda garantizarse la concentración de hidrocarburos mínima requerida en la fase líquida para mantener la actividad microbiana de biodegradación.

1.2.2. Desorción y biodegradación de hidrocarburos

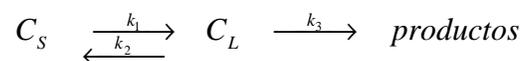
Inicialmente cuando los hidrocarburos están libremente disponibles, la tasa de biodegradación está controlada por el consumo y metabolismo bacteriano, es decir, la degradación está limitada por la reacción. Conforme transcurre el tiempo y todos los hidrocarburos disponibles fueron metabolizados, la tasa de biodegradación disminuye y llega a estar controlada por la tasa de desorción de los hidrocarburos residuales sorbidos en suelo, es decir, la biodegradación está limitada por la transferencia de masa.

El efecto de la sorción de compuestos orgánicos sobre la biodegradación es determinado principalmente por tres factores: *(i)* tipo de compuesto, *(ii)* los mecanismos por los cuales el compuesto está enlazado y *(iii)* la capacidad de los microorganismos para usar los compuestos sorbidos. Esta última propiedad establece una división entre los microorganismos que pueden utilizar compuestos sorbidos y los que requieren que las moléculas estén en solución acuosa. Los mecanismos que permiten a una molécula sorbida estar biodisponible se han explicado (Alexander, 1999) basándose en dos hipótesis. *(i)* los microorganismos al utilizar los compuestos que están en solución favorecen la desorción espontánea permitiendo así que

otros compuestos entren a la fase acuosa. Esto implica que se establece un equilibrio entre la superficie que retiene al compuesto y el ambiente líquido. Una vez que el compuesto en solución es consumido, la tasa metabólica será controlada por la tasa de desorción. Esta hipótesis supone una alta densidad microbiana con una importante capacidad de degradación.

(ii) los microorganismos excretan metabolitos que facilitan la desorción, de tal manera que la tasa de desorción real es mayor a la determinada en ausencia de los microorganismos. En estas circunstancias la tasa de desorción espontánea no limita la biodegradación.

A pesar de la importancia de la sorción de los compuestos en la biodegradación se ha puesto poca atención a las cinéticas de biodegradación de compuestos sorbidos. Una aproximación para explicar las cinéticas es la aplicación de modelos de dos etapas. Los modelos suponen que el sustrato está presente en dos entidades: en la primera el compuesto sorbido (C_S) no está disponible para el consumo microbiano; una vez que es desorbido (C_L), en la segunda etapa, entra a la solución y puede ser metabolizado. Esto puede describirse como:



Una vez que el sustrato libre es consumido la subsiguiente velocidad de degradación es controlada por la tasa de desorción (k_1) (Zhao y Voice, 2000).

En general los estudios de desorción/biodegradación se han realizado con compuestos modelo adicionados al suelo, sin embargo este tipo de compuestos no refleja el comportamiento real de los compuestos intemperizados (Carmichael y col. 1997). Por tanto se requiere profundizar en el estudio de biodegradación de estos compuestos, haciendo énfasis en los mecanismos de transporte, para plantear estrategias que permitan distinguir o medir en el

mejor de los casos la contribución de los efectos de la desorción y la biodegradación en el proceso global. Es decir, desarrollar técnicas que permitan medir la biodisponibilidad.

1.3. Medición de la biodisponibilidad

En los últimos años, los investigadores se han interesado profundamente en predecir la biodisponibilidad de compuestos orgánicos que están secuestrados en el suelo. Básicamente se distinguen dos enfoques para la predicción de la biodisponibilidad: (i) estimación por medio de una relación entre la extracción de los compuestos y el consumo por organismos de diferentes niveles tróficos. En este enfoque un compuesto disponible es aquel que se puede extraer fácilmente con solventes; (ii) estimar la biodisponibilidad de un compuesto en el suelo basándose en los fenómenos de transporte que anteceden a la reacción biológica.

1.3.1 Biodisponibilidad y extracción con solventes

En este enfoque se considera que la utilización de los compuestos depende de las características de los organismos y del compuesto mismo. Así, el objetivo es determinar si los compuestos pueden ejercer un efecto tóxico o si son accesibles al consumo biológico. Esto implica que el interés se centra en los compuestos libres o que se extraen fácilmente de la superficie del suelo; que no son precisamente los compuestos extraídos con las técnicas vigorosas usadas en los métodos comunes de análisis de suelos (Alexander, 2000). En los primeros trabajos, Kelsey y col. (1997) aproximaron el consumo de fenantreno y antrazina por una lombriz de tierra (*Eisenia foetida*) y *Pseudomas sp.* con la recuperación de los compuestos con diferentes solventes. Con estos mismos compuestos se observó (Chung y Alexander, 1998) que la biodisponibilidad está asociada a la extracción con etanol. En el caso de DDT y

compuestos relacionados se observó (Tang y col. 1999) que la biodisponibilidad a *E. foetida* está altamente relacionada con el compuesto que es extraído por una solución acuosa de tetrahidrofurano. En otra serie de trabajos similares, se correlacionó (Alexander y Alexander, 2000) la biodisponibilidad de HPA, estimada por las mutaciones generadas, con la extracción con *n*-butanol. La biodisponibilidad fue expresada como la relación entre la cantidad total de compuesto adicionado y la cantidad que provoca la mutación bacteriana. Considerando también el aspecto tóxico, Parkerton y col (2000) sugirieron cuantificar la biodisponibilidad de hidrocarburos mediante la partición de los compuestos hacia una fase de lípidos construida como un modelo.

Todos estos trabajos tienen en común el uso de compuestos modelo adicionados, que no necesariamente reflejan el comportamiento de los contaminantes de suelos intemperizados. Por tratarse de compuestos adicionados es probable que la absorción sea la principal asociación con las superficies sólidas, lo que justifica una rápida extracción de los compuestos con los solventes usados y que la transferencia de masa tenga un mínimo efecto en la biodegradación.

1.3.2. Estimación de la biodisponibilidad asociada a los fenómenos de transporte

Cuando se trabaja con sistemas donde los compuestos se pueden encontrar en la fase líquida o sorbidos en la fase sólida, la biodegradación de los compuestos puede depender de la capacidad de los microorganismos o de los procesos de transferencia (Alexander y Scow, 1989). Una de las primeras aproximaciones, en el estudio del efecto de la accesibilidad de los contaminantes sobre la biodegradación es el trabajo desarrollado por Harms y Bosma (1997). Las suposiciones principales son: (i) solamente los compuestos disueltos en la fase acuosa están

disponibles y (ii) el consumo puede explicarse por la cinética de Michaelis-Menten. Basándose en un sistema estacionario, igualaron la ecuación de transporte del compuesto hacia la célula con la ecuación de consumo. Esto permitió obtener una ecuación que representa el concepto del consumo de sustrato por microorganismos como una función de la concentración de un sustrato distante. A partir de esta ecuación se definió el factor J que es la relación entre la capacidad de biodegradación y la capacidad de transporte en el medio circundante:

$$J = \frac{Q_{\max}}{K} \quad (1.1)$$

Donde Q_{\max} es el flujo máximo del compuesto y K representa al coeficiente de transferencia de masa. En el trabajo desarrollado por estos investigadores se discute ampliamente la influencia de esos factores en la disponibilidad de contaminantes en el ambiente.

Posteriormente Bosma y col. (1997) aplicaron este concepto al consumo de sustratos que han difundido al interior de los microporos del suelo. De igual manera aplicaron la cinética de Michaelis-Menten y la ecuación de difusión del contaminante hacia los microorganismos. Esto permitió generar un concepto matemático de biodisponibilidad tomando en cuenta el efecto de la transferencia de masa y la actividad intrínseca de las células. Con estos elementos se definió el número de biodisponibilidad (B_n), como la relación entre la transferencia de masa y la afinidad microbiana específica:

$$B_n = \frac{k}{q_{\max} \text{ km}^{-1}} \quad (1.2)$$

Donde k es una constante de intercambio, referida como el factor de permeabilidad de las células; q_{\max} es la tasa máxima de consumo del compuesto y k_m es la concentración de contaminante en la superficie celular. Este número adimensional fue usado para analizar resultados de trabajos previos y permitió identificar a la transferencia de masa como el paso que limita la transformación de α -Hexaclorociclohexano. Si bien dio una predicción correcta este número adimensional fue derivado bajo suposición de estado estacionario, condición que no siempre se cumple en los cultivos y por tanto aplicarlo al estado transitorio sería cuestionable.

Para la biodegradación de HPA de una FLNA, considerando los fenómenos de disolución y transferencia de masa de la FNLA a la fase acuosa Ghoshal y col. (1996) desarrollaron un modelo matemático que describe el cambio de la concentración de HPA en la fase líquida como una función de la disolución y la biodegradación. Este modelo permitió establecer una relación entre el coeficiente de biodegradación y el coeficiente de transferencia de masa, que fue expresada como el número adimensional de Damköhler (Da):

$$Da = \frac{K_{\text{bio}}}{K_{\text{la}}} \quad (1.3)$$

Donde K_{bio} es la constante de biodegradación para una cinética de primer orden y K_{la} es el coeficiente de transporte convectivo entre la FNLA y la fase líquida. Si se comparan los componentes del Bn y Da , observamos que ambos relacionan la constante de biodegradación con el coeficiente de transporte aunque de manera inversa. Sin embargo, para Da el uso de términos más sencillos da como resultado un grupo adimensional más simple. El modelo de Ghoshal se aplicó al estudio de la degradación de naftaleno de “Coal tar”, la estimación del Da demostró que la transferencia de masa es el paso que limita la degradación. Posteriormente Ramaswami y Luthy (1997) desarrollaron un modelo de transporte de masa/biodegradación de varias etapas para explicar la degradación de HPA de “coal tar” en

un sistema de suelo en suspensión. Definieron varios números adimensionales entre los que se incluye el Da que también representa la relación entre la tasa máxima de liberación de soluto de la superficie de las partículas y la tasa máxima de consumo de soluto en la fase líquida:

$$Da = \frac{K_{bio}C_{(R)}}{K_{la}C_{(R)}} \quad (1.4)$$

Donde K_{bio} es la constante de biodegradación, K_{la} es el coeficiente de transporte entre la FNLA y la fase líquida y $C_{(R)}$ es la concentración de soluto. El modelo demostró que la biotransformación de los compuestos de FLNA es controlada por la transferencia de masa, según los valores encontrados para el grupo adimensional Da .

En resumen, la biodisponibilidad podría representar la relación de los efectos de la transferencia de masa y la biodegradación en cualquier modelo de estudio. Sin embargo, la transferencia de masa si puede estudiarse de manera independiente para establecer estrategias que en principio aceleren la transferencia de masa y que deben comprobarse posteriormente en presencia de los microorganismos.

1.4. Mejoramiento de la biodisponibilidad

Para mejorar la biodisponibilidad es necesario aumentar la movilidad y la transferencia de los contaminantes. Si bien el uso de reactores de lodos permite mejorar la transferencia de masa, cuando el suelo contaminado contiene arcillas la agitación no es suficiente para acelerar

la desorción (Geerdink y col. 1996) y se requiere adicionar compuestos químicos, como por ejemplo surfactantes (Boopathy y Manning, 1999) o solventes (Castaldi, 1993) que incrementan la tasa de desorción.

1.4.1. Aplicación de surfactantes

Los surfactantes pertenecen a un grupo heterogéneo de moléculas que tiene la propiedad de reducir la tensión superficial y la tensión interfacial de las soluciones acuosas y mezclas de hidrocarburos, modificando la solubilidad de los hidrocarburos en agua.

El efecto de los surfactantes sobre la biodisponibilidad se puede explicar (Volkering y col. 1995) a través de tres mecanismos: *(i)* dispersan la FLNA debido a que disminuyen la tensión interfacial entre la fase acuosa y la no acuosa, en consecuencia aumentan el área de contacto con los microorganismos; *(ii)* modifican la solubilidad del contaminante por la presencia de micelas que contienen altas concentraciones de hidrocarburos y *(iii)* facilitan el transporte de la fase sólida a la fase acuosa. El primer mecanismo sólo está involucrado cuando el hidrocarburo está en la fase líquida y no será discutido en este trabajo, los otros dos mecanismos se esquematizan en la Fig. 1.3, donde HC representa al hidrocarburo y Sf al surfactante (Edwards y col. 1994). Cuando los contaminantes están sorbidos en el suelo el transporte a la fase líquida (1) es facilitado por la disminución de la tensión superficial del agua en los poros, alterándose el coeficiente de distribución entre la fase sólida y la fase líquida. Los hidrocarburos son concentrados en la pseudofase micelar, evento que depende de la distribución del hidrocarburo disuelto entre la fase líquida y la pseudofase micelar. El surfactante puede interaccionar con la fase sólida y el contaminante (2) de manera que facilita el

transporte a la fase líquida. Sin embargo, las interacciones entre surfactante, contaminante y el suelo complican el esquema: los surfactantes pueden quedar sorbidos, así mismo los hidrocarburos pueden quedar atrapados en las micelas que se forman (Guha y Jafé, 1996).

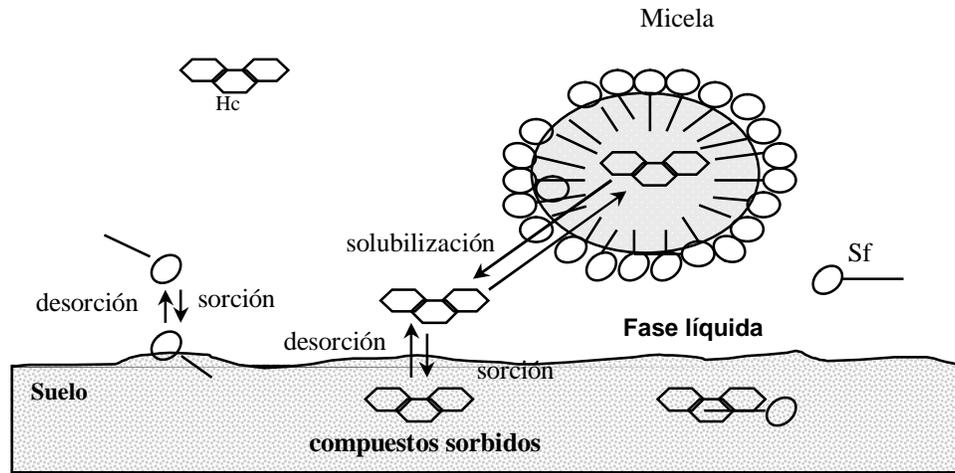


Fig 1.3. Diagrama esquemático de un sistema suelo/agua que contiene surfactantes no iónicos (Sf) e hidrocarburos (Hc)

Debido a esto, los resultados de la aplicación de surfactantes han generado amplias discusiones (Liu y col. 1995). Además algunos surfactantes son tóxicos a altas concentraciones e inhiben la degradación (Laha y Luthy, 1992) e incluso pueden favorecer la formación de espuma en exceso, que de hecho es un problema común en los reactores agitados (Glasser y col. 1994). A pesar de estos inconvenientes, el interés por aplicar surfactantes en el tratamiento de suelos contaminados ha permitido desarrollar novedosas propuestas como es el uso de lecitina de soya (Fava y Gioia, 2001), que es un surfactante fitogénico aplicado para el tratamiento de un suelo artificial contaminado con bifenilos policlorados en microcosmo de suelo en suspensión.

Si bien es posible superar algunos de los inconvenientes mencionados en el tratamiento de suelos con surfactantes. Los costos, su carácter poco específico, entre otros aspectos, promueven la búsqueda de otras alternativas para mejorar la biodisponibilidad y biodegradación de compuestos hidrófobos. En este sentido el uso de los solventes es una alternativa que ha sido explorada en diversas direcciones retomando conceptos de otros sistemas de reacción.

1.4.2. Aplicación de solventes

El uso de los solventes deriva básicamente de los trabajos para dispersión de FLNA y extracción química de contaminantes del suelo con solventes. La dispersión de la FLNA puede lograrse por la adición de solventes que llevan a los compuestos a la fase orgánica disuelta en la fase acuosa (Catherine y Luthy, 1993). Con compuestos hidrófobos puros se demostró (Efroymsen y Alexander, 1991) que la adición de hexametilnonano promueve la degradación de estos compuestos por medio de la adhesión de los microorganismos a la interfase solvente-agua. Resultados similares se obtuvieron en la biodegradación de pireno (Jiménez y Bartha, 1996) con aceite de parafina; en contra parte, el heptametilnonano provocó la inhibición de la actividad biológica. Estos resultados se explicaron por la formación de emulsiones que contienen a los hidrocarburos a las cuales se adhieren los microorganismos. Cuando se trata de mezclas de compuestos en una FLNA se puede también mejorar la biodegradación por los mecanismos antes mencionados (Birman y Alexander, 1996). Para una FLNA tóxica se ha propuesto como alternativa el uso de sistemas de tres fases: FLNA tóxica, agua y FLNA no tóxica. En este sistema los compuestos se “concentran” en la fase orgánica no tóxica y entran lentamente a la fase acuosa conforme se consumen por los microorganismos. Este tipo de

sistemas se ha usado para penta-clorofenol (Munro y Daugulis, 1997) y compuestos BTX (Collins y Daugulis, 1999).

Si los compuestos hidrófobos están en el suelo, como FLNA o sorbidos, el problema es también incrementar la solubilidad. Los solventes orgánicos afectan la lixiviación (Nkedi-Kizza y col. 1987) y sorción (Fu y Luthy, 1986) por que cambian la polaridad del ambiente suelo-agua alterando la distribución. Con métodos químicos de tratamiento de suelos contaminados se ha demostrado (Reiser-Roberts, 1997) que la extracción de compuestos aromáticos con acetona:agua 81% (v/v) fue altamente eficiente en pruebas piloto. Sin embargo, poco se ha explorado sobre el uso de solventes para mejorar la biodegradación de compuestos contaminantes sorbidos, aunque la extracción con solventes se ha empleado como un complemento a oxidaciones químicas (Nam y col, 2001). Castaldi (1993) sugirió que los solventes producidos (tolueno y compuestos fenólicos) en una fase anaerobia previa a la degradación podrían promover la degradación de los compuestos del suelo, sin embargo no reportó resultados sobre sus especulaciones. Los sistemas de tres fases también han sido aplicados en reactores de suelo en suspensión. Villemur y col. (2000) utilizaron aceite de silicón para mejorar la degradación de PAH, la adición de 15% de aceite (v/v) a una suspensión con 30% de suelo (p/v) incrementó la biodegradación.

Si se combina la extracción de contaminantes del suelo por solventes con la biodegradación, la principal restricción podría ser la toxicidad, algunos solventes suprimen o disminuyen el crecimiento y/o el metabolismo de los microorganismos. Una clasificación de los solventes en cuanto a su toxicidad se basa en el coeficiente K_{OW} , comúnmente expresado en forma logarítmica. Compuestos con un coeficiente menor a uno no suprimen la actividad

microbiana como se muestra en la Tabla 1.3, pero si el solvente tiene un log K_{OW} entre uno y cinco unidades se considera como altamente tóxico (Inoue y Horikoshi, 1989). Sin embargo, es difícil hacer una selección de un solvente basándose sólo en la toxicidad, los solventes no tóxicos son de tipo polar y por tanto muy poco podrían mejorar la solubilidad acuosa de los compuestos hidrófobos. Por otra parte, actualmente se sabe (Isken y col. 1999) que el efecto dosis respuesta de un solvente depende de su concentración en la membrana celular y no sólo de la estructura química del solvente. Esto implica que cualquier compuesto químico podría ejercer un efecto negativo en concentraciones elevadas, pero a la vez abre la posibilidad de que un microorganismo sea capaz de utilizar compuestos tóxicos o utilizar uno en presencia de otro compuesto tóxico como lo demostraron Robertson y Alexander (1996), con bacterias tolerantes a solventes tóxicos, como el tolueno, se logró consumir al fenantreno disuelto en tolueno.

Tabla 1.3. Toxicidad de diferentes en función de K_{OW}

Solvente	Log K_{OW}	Toxicidad
Dioxano	-1.10	No tóxico
Acetona	0.23	No tóxico
Benceno	2.00	Tóxico
Tolueno	2.40	Tóxico
Xileno	3.10	Tóxico
Decano	5.60	No tóxico
Tetradecano	7.60	No tóxico
Diociltalato	8.80	No tóxico

Fuente: Alexander, M., 1998

Como se indicó al iniciar esta sección la mejor alternativa para mejorar la transferencia de masa es el uso de los biorreactores de suelo en suspensión. Aunque en esta parte se han mencionado, es necesario describir de manera precisa este tipo de reactores y profundizar a detalle en cuanto sus características y aplicaciones.

1.5. Tratamiento de suelos contaminados en sistemas de suelo en suspensión.

El tratamiento en suelo en suspensión es una técnica con la que se trata el suelo o lodo contaminado en un reactor en donde ocurren la extracción y la biodegradación. La suspensión se forma por la adición de agua al suelo y el mezclado continuo permite mantener al suelo contaminado en suspensión. El mezclado permite romper los agregados de suelo favoreciendo la disolución de los contaminantes y reduce la resistencia a la transferencia de masa. En este sistema se propicia un mejor contacto entre los microorganismos, nutrientes, oxígeno y contaminantes, en consecuencia la tasa de biodegradación se incrementa. La presencia de sólidos en el reactor implica el uso de diseños especiales y la introducción de variables que no se contemplan en los biorreactores comunes.

1.5.1. Biorreactores de suelo en suspensión: descripción y variables de proceso

Los diseños de reactores de lodos incluyen tanque agitado, “airlift”, lecho fluidizado y tambor rotatorio. Los sistemas normalmente operan en cultivo por lotes o de manera semi-continua, aunque también se ha probado el uso de tanques en serie (Cassidy e Irvine, 1997). El suelo junto con los nutrientes, agua y microorganismos se mezclan y airean hasta alcanzar el

nivel de degradación satisfactorio. Al finalizar el tratamiento los sólidos deben separarse para regresarlos al sitio de origen o someterse a un tratamiento adicional; la fase líquida puede reutilizarse o enviarse a un sistema de tratamiento de agua.

Como los microorganismos consumen los compuestos de la fase líquida, la partición de contaminantes entre las fases y las tasas de transferencia de masa son extremadamente importantes en el diseño de los reactores de lodos. Además de estos factores se debe considerar (i) alimentación adecuada de oxígeno que es primordial para el tratamiento aerobio. El oxígeno se puede suministrar por difusores, aspersores de turbina o aireación superficial (Metcalf y Eddy, 1991). La selección de la instrumentación para aireación está determinada por el tipo de reactor y concentración de sólidos; (ii) mezclado de la suspensión para evitar la formación de gradientes de concentración o temperatura (Puskas y col. 1995). Un aspecto adicional es que el mezclado puede maximizar las tasas de desorción y minimiza el efecto tóxico de los compuestos sobre los microorganismos. Dado que la sedimentación es muy rápida se debe operar en régimen turbulento (Eweis y col. 1998); (iii) la concentración de sólidos en la suspensión depende del diseño de reactor y de la concentración de contaminantes. Típicamente el contenido de sólidos está entre 5 y 25%, si la concentración es superior la velocidad de degradación disminuye considerablemente (McMillen y Gray 1994); (iv) la concentración de contaminantes afecta directamente a la capacidad de biodegradación. Si el suelo contiene concentraciones elevadas de contaminantes (más de 165 000 ppm) un lavado previo puede mejorar la biodegradación (Tezak y col. 1994). Otras variables como el pH, temperatura y biomasa microbiana siguen básicamente los estándares establecidos para los bioprocesos convencionales.

Estos son algunos de los aspectos y trabajos desarrollados en sistemas de suelo en suspensión que permiten conocer las variables más importantes. El interés de este trabajo es básicamente conocer el sistema de tratamiento en fase de lodos y su operación. Aunque muy lejos del alcance de la tesis está la puesta en marcha de un reactor en campo, si se considera conveniente conocer como se han desarrollado estos sistemas con el fin de realizar comparaciones y presentar un panorama general del tema.

1.5.2. Aplicaciones en campo

Se conocen numerosos reportes de aplicaciones del tratamiento de suelo en suspensión a nivel laboratorio, pero sólo algunos reportes de trabajos en campo debido principalmente al costo del tratamiento mismo y los costos de traslado de suelo o construcción de la planta de tratamiento en el sitio. Montemagno e Irvine (1990) diseñaron un sistema para el tratamiento de 767 m³ suelo contaminado con 300 a 900 ppm de HTP procedente de una base de la Fuerza Aérea de los Angeles California. El sistema de tratamiento consistió de un seleccionador y equipo de lavado para separar partículas mayores a 1.27 cm; un tanque de 15 m³ para preparar la suspensión; un reactor de 105 m³ de capacidad, equipado con propelas para la agitación y aireación de la suspensión. Los reactores funcionaron con lotes de 4 m³ de suelo contaminado. El costo neto del tratamiento de los 767 m³ fue de \$238,750.00 USD.

Otro ejemplo, relativamente reciente, es el tratamiento realizado en Canton, Mississippi, “OHM Remediations Services Corporation” (1997) desarrolló la tecnología para el tratamiento de un subsuelo contaminado con HPA de la creosota usada para conservación de la madera. El sistema incluyó un tamizado de suelo, 4 biorreactores de 681 m³ de capacidad, equipados con

difusores y turbinas para aireación y un impulsor para el mezclado de la suspensión. El proceso funcionó por lotes de 123 -138 m³·de material. El tratamiento de 14 140 ton de suelo duró 3 años, los resultados que se obtuvieron fue una disminución de PAH de 8 545 a 634 mg/kg, es decir una eficiencia de tratamiento del 93%. El costo unitario del tratamiento se estimó en \$170 USD /ton de suelo. Algunos de los problemas de operación incluyen la formación de espuma en el reactor y la dificultad para alcanzar los estándares de concentración requeridos para compuestos específicos por las normas o las metas de tratamiento.

Estos dos ejemplos dan una idea de la complejidad del tratamiento en campo con reactores de suelo en suspensión. Si bien los tiempos de tratamiento pueden ser cortos comparados con otros sistemas, los requerimientos de mezclado y aireación lo convierten en un proceso altamente mecanizado y costoso. En ese sentido la investigación para el desarrollo de procesos comercializables se ha enfocado en el diseño de sistemas sencillos, para la biodegradación de los contaminantes del suelo.

1.5.3. Procesos patentados

La biorremediación de suelos en reactores con suelo en suspensión es poco ofertada por las empresas que ofrecen estos servicios. Probablemente esto explica que se hayan patentado pocos métodos para el tratamiento en suelo en suspensión y que el principal enfoque sea incrementar la biodegradación de los contaminantes a través de estrategias que no impliquen diseños costosos o de instrumentación complicada. Castaldi (1993) propuso un método para mejorar la biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos que consiste de un sistema de biorreactores en serie. El primer biorreactor opera en condiciones anaerobias

para favorecer la producción de emulsificantes y solventes; aunque la degradación puede estimularse con la adición de co-sustratos como por ejemplo el *p*-xileno. Los siguientes 3 o 4 reactores funcionan en condiciones aerobias y se incluye un reactor de tipo “Air lift”. El sistema fue probado con un suelo contaminado con petróleo crudo y lodos aceitosos, se encontró que en condiciones aerobias se favorece la degradación de los compuestos volátiles, pero la concentración de hidrocarburos halogenados en el gas de salida disminuye si se incluye al menos un reactor anaerobio.

Una propuesta diferente que contempla un mínimo de requerimientos es la de Fulton (1996), se trata de un sistema por lotes en un tanque rectangular que contiene una densa capa de suelo saturada con agua. El tratamiento consiste en el bombeo periódico de agua a alta presión que pasa sobre toda la superficie del suelo, la presión de la descarga de agua rompe los agregados de suelo y libera los hidrocarburos. Este sistema permite mantener un DQO a un nivel tal que los microorganismos puedan degradar los hidrocarburos liberados de la fase sólida. El procedimiento se probó con un suelo arcilloso que contenía 48 900 ppm de HTP, en 13 días hubo una disminución a 35 ppm. Se observó que al aumentar el nivel de HTP se incrementa el tiempo requerido para el tratamiento.

Pierce (1997) propuso mejorar la degradación aerobia de compuestos alifáticos y aromáticos por el uso de microorganismos que tienen la capacidad de degradar concentraciones de hidrocarburos si se encuentran en forma de gases, aerosol o fluidos. La degradación se realiza en suelo en suspensión adicionando nutrientes y controlando el pH. Se emplea un reactor convencional por lotes o cultivo continuo; el oxígeno puede suministrarse a partir de aire, oxígeno puro o peróxido. El método fue probado con naftaleno, después de 30 días de

incubación se demostró que los microorganismos pueden tolerar de 700 a 470 ppm y que ocurre la mineralización del compuesto.

Los tres procesos citados como ejemplo reiteran que el interés principal es incrementar la biodegradación. En pruebas de laboratorio la investigación se orienta a métodos muy sofisticados, por ejemplo: estabilizar gotas de solventes por surfactantes para dispersar compuestos poco solubles en agua. Srivastava y col. (2000). En tanto que las aplicaciones en campo y procesos patentados se basan en los conceptos generales para los procesos en biorreactores, tratando de minimizar la complejidad de los sistemas y los costos. Pero aún en los sistemas más sencillos se requiere de una caracterización, es decir, de la identificación de las variables más importantes para tratar de definir sus interacciones y explicar o predecir los eventos de desorción/biodegradación de contaminantes mediante modelos matemáticos.

1.6. Modelamiento del consumo de compuestos en el suelo

Comprender las cinéticas de biodegradación de los contaminantes en el suelo es muy importante para explicar los fenómenos e incluso predecir la persistencia de los contaminantes en el suelo. Sin embargo, la presencia de barreras difusionales en el suelo, una gran población microbiana y bajos niveles de fuente de carbono disponible, pueden dar como resultado cinéticas de biodegradación muy diferentes a las observadas en fase acuosa o en cultivos puros.

Para explicar la cinética de biodegradación de contaminantes en suelos se han propuesto varios modelos, empíricos o teóricos. El uso de modelos empíricos no es muy recomendado por que las variables carecen de significado físico y aunque pudieran explicar adecuadamente la

cinética e incluso hacer predicciones, la falta de significado físico de las variables limita la comprensión de los resultados y su aplicación. En cuanto a los modelos teóricos, se ha argumentado (Schmidt y col. 1985) que el consumo de contaminantes puede explicarse básicamente en función de su concentración y de la densidad microbiana. En ese sentido se distinguen dos casos: (i) poblaciones microbianas que crecen a expensas de un contaminante como fuente de carbono y energía (ii) poblaciones que no crecen al metabolizar los compuestos de interés.

Para el primer tipo de modelos, considerando el caso de un cultivo que crece con un compuesto soluble en agua y no tóxico, se recomienda el modelo de Monod para describir el crecimiento (Alexander y Scow, 1989); es decir:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} C_L}{k_s + C_L} \quad (1.5)$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento, C_L es la concentración de compuesto contaminante, k_s es la constante de afinidad del microorganismo por el compuesto que soporta el crecimiento.

Para poblaciones que están creciendo a expensas de un sustrato, el consumo de sustrato puede expresarse por medio de tres tipos de cinéticas que se definen en función de la concentración inicial de sustrato según se muestra en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Modelos cinéticos para el consumo de contaminantes cuando ocurre crecimiento

Cinética	Condición	Modelo
Logarítmica	$C_L \gg K_s$	$-\frac{dC_L}{dt} = \mu_{\max} X_o e^{\mu_{\max} t}$
Logística	$C_L \ll K_s$	$-\frac{dC_L}{dt} = \frac{V_{\max} X_{\max} C_L \mu_{\max}}{1 + (X_{\max} - X_o)e^{-\mu_{\max} t}} \Big/ X_o$
Monod con crecimiento	$C_L \sim K_s$	$-\frac{dC_L}{dt} = \frac{\mu_{\max} C_L X}{k_s + C_L}$

Para los modelos que se presentan en la Tabla 1.4, X_o representa la biomasa inicial, X la biomasa a cualquier tiempo y X_{\max} la biomasa máxima, V_{\max} la velocidad máxima de consumo de contaminante y t el tiempo, las demás variables se definen como se indicó anteriormente. Este tipo de modelos pueden utilizarse para explicar la cinética de consumo de contaminantes en el suelo, pero se deben incluir como parte de otro modelo más complejo que incluya al transporte de masa.

En concentraciones altas muchos compuestos contaminantes son tóxicos para los microorganismos que los usan como fuente de carbono, esta cinética puede ser representada por la modificación de Haldane a la ecuación de Monod:

$$-\frac{dC_L}{dt} = \frac{q_{\max} C_L}{k_m + C_L + \frac{C_L^2}{k_I}} \quad (1.6)$$

Donde q_{\max} es la velocidad máxima de consumo de contaminante y k_I es la constante de inhibición por el compuesto, las demás variables se definen igual que en la ec. (1.5). El modelo

de inhibición por sustrato indica que la μ incrementa en bajas concentraciones de compuesto hasta alcanzar el valor máximo, sin embargo cuando se alcanza una concentración de compuesto inhibitoria la velocidad específica decrece. Este modelo se ha empleado para describir la degradación de contaminantes como fenol, pentaclorofenol (Klecka y Maier, 1985) y tolueno (Mirpuri y col. 1997), que son considerados como tóxicos a los microorganismos en concentraciones altas.

Si la densidad microbiana inicial es relativamente alta comparada con la concentración de contaminante, el crecimiento de los microorganismos puede ser pequeño o bien nulo (Alexander y Scow, 1989), por tanto la cinética se asemeja más a una reacción enzimática porque el crecimiento no está involucrado. La tasa de consumo de contaminante puede expresarse por la ecuación de Michaelis-Menten:

$$\frac{-dC_L}{dt} = \frac{q_{\max} S}{k_m + S} \quad (1.7)$$

Donde k_m es la constante de Michaelis-Menten y las demás variables se definen como se indicó anteriormente. Para la ec. 1.7 también se pueden considerar tres casos para el consumo de los compuestos en función de las concentraciones iniciales de compuesto, los modelos matemáticos que se generan se muestran en la Tabla 1.5.

Tabla 1.5. Modelos de consumo de sustrato cuando no ocurre crecimiento

Cinética	Condición	Modelo
Orden cero	$C_L \gg K_m$	$-\frac{dS}{dt} = k_2$
Primer orden	$C_L \ll K_m$	$-\frac{dS}{dt} = k_1 C_L$
Monod sin crecimiento	$C_L \sim K_m$	$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_2 C_L}{k_s + C_L}$

Estos modelos pueden aplicarse en la biodegradación de contaminantes presentes en bajas concentraciones en el suelo originados por: disposición de desechos, aplicación de pesticidas o bien pequeñas fugas de tanque de almacenamiento, en cuyo caso sería un error aplicar el modelo de Monod (Scow y col. 1986).

Para describir la biodegradación de los contaminantes del suelo no es posible considerar que el proceso de biodegradación es independiente de la desorción ya que existe una clara interrelación, según se discutió en la sección 1.2. Esto lleva a considerar sistemas de ecuaciones donde se incluyan todos los fenómenos: Fu y col. (1996) desarrollaron un modelo para describir la transferencia de masa, desorción/adsorción, difusión, y degradación de fenol en cultivo de suelo en suspensión. Las ecuaciones que describen los fenómenos citados son las siguientes:

$$\frac{dq}{dt} = \frac{k_f A_p}{V_p \rho} (C_b - C_s)$$

a) Transferencia de masa: (1.8)

Donde q representa la concentración promedio de fenol en la partícula de suelo, k_f es el coeficiente transporte de masa de difusión externa, A_p es el área superficial externa de la

partícula de suelo, V_p es el volumen de partícula de suelo, ρ es la densidad del suelo, C_s es la concentración de contaminante en el suelo y C_b la concentración en la fase líquida.

b) Adsorción y desorción basándose en la isoterma de Freundlich: (1.9)

$$S = K_a C^{1/n} \quad S = K_d C^{1/n} \quad X_s = k_b X_w$$

Donde S es la concentración de fenol en el suelo, K_a la constante de adsorción, K_d la constante de desorción, C la concentración de contaminante en la fase líquida, X_s es la concentración celular en la fase sólida y K_b el coeficiente de partición para las células.

c) Transporte difusivo: (1.10)

$$\varepsilon \frac{\partial C}{\partial t} + (1 - \varepsilon) \rho \frac{\partial S}{\partial t} = \varepsilon D_p \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right)$$

Donde ε es la porosidad de la partícula de suelo, D_p es el coeficiente de difusión efectiva dentro de la partícula de suelo y r es la distancia radial desde el centro de la partícula.

d) Biodegradación del sustrato basándose en el modelo de Monod: (1.11)

$$\frac{dS}{dt} = \frac{(V - W / \rho) \mu_w \max X_w C}{V_y (K_w + C)} - \frac{W \mu_s \max X_s S}{V_y (k_s + S)}$$

El primer término del lado derecho representa el consumo de contaminante por los microorganismos suspendidos y el segundo término el consumo por los microorganismos inmovilizados. En la ecuación V es el volumen de solución en el reactor, W es el peso del suelo

en el reactor, X_w y X_s la concentración de células suspendidas en la fase líquida e inmovilizadas en el suelo, μ_w max y μ_s max la tasa específica de crecimiento de las células suspendidas e inmovilizadas respectivamente, K_w y K_s la constante de saturación de las células suspendidas e inmovilizadas, respectivamente. Posteriormente Tabak y col. (1997) retomaron el modelo para explicar biodegradación de contaminantes en diferentes sistemas de tratamiento de suelos contaminados.

A estos modelos que podrían considerarse como fundamentales por incluir los principales eventos que ocurren en la biodegradación de compuestos sorbidos en el suelo, se les pueden incluir diversas variables para hacer estudios muy específicos. Geerdink y col. (1996) desarrollaron un modelo para explicar la biodegradación de contaminantes no polares en el que se incluye el efecto de la materia orgánica y arcillas del suelo. En propuestas más recientes se ha considerado que los microorganismos tienen la capacidad de degradar compuestos solubles o sorbidos en el suelo, en este sentido Ik-Sung y col. (1999) incluyeron la agregación celular en la biodegradación de naftaleno en el suelo. Incluso se ha considerado (Zhao y Voice, 2000) el consumo de compuestos sorbidos y en fase acuosa de manera simultánea para tratar de predecir de manera más acertada la biodegradación.

Esta breve revisión del desarrollo de modelos para explicar la biodegradación de contaminantes en el suelo demuestra que actualmente hay un amplio interés en el tema. Sin embargo, el uso de modelos matemáticos para explicar la biodegradación de compuestos sorbidos cuando se usan aditivos para acelerar la desorción no ha sido examinado en detalle.

OBJETIVOS

2. Objetivos

De acuerdo a la información presentada en la revisión bibliográfica es poco lo que se ha estudiado sobre el efecto de los solventes en la biodegradación de hidrocarburos intemperizados en cultivo en suelo en suspensión. Así para el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo General

Mejorar la transferencia de masa de hidrocarburos intemperizados, presentes en un suelo contaminado, a la fase líquida incrementando la velocidad de desorción de los hidrocarburos mediante la adición de un solvente.

Objetivos particulares

- 1) Estudiar el efecto de solventes, de diferente polaridad, en la solubilidad y desorción del suelo de los hidrocarburos intemperizados.
- 2) Determinar la biodegradación de hidrocarburos en un cultivo de suelo en suspensión a nivel microcosmos utilizando solventes de diferente polaridad.
- 3) En un cultivo de suelo en suspensión estudiar el efecto de la concentración del solvente seleccionado sobre la desorción/degradación simultánea
- 4) Desarrollar y validar un modelo matemático que explique la desorción y el consumo de los hidrocarburos en la fase líquida.

HIPÓTESIS

3.Hipótesis

Considerando que sólo los hidrocarburos solubles en la fase líquida son disponibles a los microorganismos y que el transporte de los hidrocarburos de los poros del suelo a la fase líquida ocurre en dos etapas: *(i)* la difusión intrapartícula que generalmente es el proceso más lento y *ii)* el transporte convectivo de los hidrocarburos de la superficie sólida a la fase líquida. Dado la anterior se puede plantear la siguiente hipótesis para mejorar el proceso global de biodegradación: la transferencia de los hidrocarburos del suelo a la fase líquida puede acelerarse si el paso limitante, es decir la difusión intrapartícula, es minimizada mediante la adición de un solvente.

MATERIALES Y METODOS

4. Materiales y métodos

4.1. Reactivos

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron reactivos de grado analítico, marca Baker. Los solventes fueron grado reactivo, marca Baker a excepción del Tetracloruro de carbono (TCC) que fue grado espectrofotométrico de Merck. Para el fraccionamiento se empleó Silica gel malla 60-200 y sulfato de sodio anhidro de J.T. Baker.

4.2. Medio de cultivo

La composición del medio de cultivo utilizado, denominado "MCB", fue: NaNO_3 , 3 g/l; KH_2PO_4 , 1 g/l; KCl , 0.5 g/l, $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25g/l y solución mineral 2ml/l. La composición de la solución mineral en % (p/v) fue la siguiente: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.015; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.161 y $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.008. El pH del medio se ajustó a 6.5.

4.3. Caracterización del suelo

El suelo se obtuvo de un sitio próximo a una refinería en operación, situada en Minatitlán, Veracruz. Este sitio ha estado contaminado por casi 100 años con desechos de la refinería. El clima de la zona es de tipo ecuatorial con una temperatura que oscila entre los 23 y 30°C. Las lluvias más abundantes se registran entre Julio y Septiembre periodo en el cual el sitio puede inundarse. Las muestras se tomaron a una profundidad no mayor a 0.50 m. Se secaron a temperatura ambiente y se conservaron en botes. Los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) se cuantificaron y fraccionaron según se detalla en las secciones 4.5.3. y 4.5.4.,

respectivamente. Las propiedades físico-químicas del suelo se analizaron en el Departamento de Suelos del Laboratorio Central Universitario de la Universidad Autónoma de Chapingo.

4.4. Consorcio microbiano

4.4.1. Obtención y conservación

El consorcio microbiano se obtuvo a partir de la rizósfera de una planta nativa (*Cyperus laxus* Lam), que crecía en suelo contaminado del sitio de muestreo. El consorcio microbiano se desarrolló en el medio MCB en donde la fuente de carbono fue un extracto de hidrocarburos obtenido del suelo contaminado (exento de asfaltenos) a una concentración de 6 000 mg/l. Se tomó parte de la suspensión microbiana para conservar el consorcio en glicerol al 30 % a – 20°C para su uso posterior.

4.4.2. Propagación del consorcio

El inóculo fue producido adicionando 10% (v/v) del cultivo en conservación al medio MCB que contenía 6 000 mg/l de extracto de hidrocarburos como fuente de carbono. Se hizo un cultivo seriado iniciando con frascos de 25 ml que contenían 5 ml de medio, después de cinco días de cultivo se pasó todo el cultivo a matraces Erlen Meyer de 250 ml que contenían 50 ml de medio. En todos los cultivos los frascos se incubaron en agitación a 150 rpm y 30°C.

4.4.3. Cuenta microbiana

La cuenta de células viables se realizó por dilución en serie y subsiguiente plaqueo en cajas de Petri con agar de soya tripticaseína (AST Bioxon®) por triplicado. Para preparar las

diluciones se emplearon 3 ml de suspensión microbiana y se diluyó en 27 ml de solución salina al 0.95 % (p/v). Las cajas se inocularon con 0.1 ml de suspensión microbiana que se distribuyó sobre la superficie de agar con una varilla de vidrio en forma de "L". Las cajas de Petri se incubaron a 30°C durante 72 h. Se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) en la caja de dilución que tuviera entre 25 y 100 UFC; se reportaron como UFC/ml calculadas de acuerdo a la siguiente formula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{\text{No. de colonias}}{0.1 \text{ ml de suspensión}} (\text{Factor de dilución})$$

4.5. Técnicas analíticas

4.5.1. Extracción de hidrocarburos

En el caso de los estudios de desorción con tolueno, los hidrocarburos se separaron de la fase acuosa mediante una extracción líquido-líquido con TCC, en una proporción de 3:1 (v/v) con respecto al volumen de medio de cultivo. Las muestras de extracción se dejaron reposar durante 2 h para separar las fases. La fase orgánica se filtró a través de un embudo, empacado con algodón y sulfato de sodio anhidro en el fondo, para eliminar la humedad. Se realizaron extracciones sucesivas de hidrocarburos de la fase acuosa hasta que la fase orgánica ya no mostró coloración café cristalina. Los extractos se aforaron a 10 ml y los hidrocarburos se cuantificaron como se indica en la sección 4.5.3.

Los hidrocarburos residuales de las cinéticas de degradación, con tolueno y los diferentes solventes ensayados, se extrajeron del suelo por Soxhlet con una mezcla hexano: acetona (1:1 v/v) durante 24 horas. La mezcla de solventes de extracción se evaporó en un

rotavapor a 70°C a vacío y el extracto se dejó reposar por 24 h para eliminar el solvente residual. Los hidrocarburos se cuantificaron por gravimetría en el caso de los ensayos con diferentes solventes y por espectrometría en infrarrojo (sección 4.5.3) en las muestras de degradación de los tratamientos con tolueno.

4.5.2. Solubilidad de hidrocarburos

Los ensayos de solubilidad con diferentes solventes se realizaron colocando 10 ml de solvente en tubos de vidrio con diferentes cantidades de extracto de hidrocarburos. Se agitaron durante un minuto en “vortex”, se dejaron reposar por 10 min: Como criterio de solubilidad límite se definió que si después del reposo quedaba un poco de hidrocarburos depositados sobre la pared del tubo se había alcanzado dicho límite. Los solventes ensayados fueron, polares: acetona, metanol y butanol; no polares: tolueno, hexano y benceno, cuyas propiedades físicoquímicas se muestran en el anexo 9.1.

4.5.3. Cuantificación de hidrocarburos

En el caso de los tratamientos con tolueno (degradación y desorción) los hidrocarburos se cuantificaron como HTP por espectrometría infrarroja (IR) con un espectrómetro Perkin Elmer 200 FT-IR. La absorción se determinó entre 3 300 y 2 500 cm^{-1} usando como estándar un extracto de hidrocarburos del suelo contaminado disuelto en TCC. Para la preparación de muestras de la curva estándar se pesaron diferentes cantidades de extracto de hidrocarburos hasta ajustar concentraciones entre 10 000 y 50 000 mg de hidrocarburos por litro de TCC. Se generó una curva estándar de absorción en función de la concentración de HTP.

La concentración de hidrocarburos expresada con base en un kilogramo de suelo seco original, se calculó como sigue:

$$\text{HTP} = \left(\frac{\text{mg HTP}}{\text{kg suelo}} \right) \left(\frac{\text{mg HTP}}{\text{litro de TCC}} \right) \left(\frac{\text{volumen de aforo con TCC}}{0.009 \text{ kg suelo}} \right)$$

4.5.4. Fraccionamiento de hidrocarburos

El extracto de hidrocarburos se fraccionó en compuestos alifáticos, aromáticos, compuestos polares y asfaltenos por cromatografía en columna (Wang y col. 1994). Los asfaltenos se separaron del extracto por precipitación, disolviendo 1 g de extracto en 20 ml de *n*-pentano caliente y se filtró al vacío. El *n*-pentano de la muestra se evaporó a temperatura ambiente en la campana de extracción. Para la separación de las fracciones restantes se emplearon columnas de vidrio empacadas con silica gel (malla 60-200) activada a 105°C por 24 h. El gel se formó por la adición sucesiva de 30 ml de hexano. Tanto en la parte inferior como superior de la columna se colocaron tapones de algodón y sólo en la parte superior sulfato de sodio anhidro para eliminar el exceso de humedad. Para el fraccionamiento se colocó 0.1 g de extracto exento de asfaltenos y se eluyó sucesivamente con hexano para la separación de alifáticos. Se consideró que todos los alifáticos de la muestra se habían separado cuando se observó el corrimiento de sólo una mancha amarilla fluorescente en el gel. Los aromáticos se eluyeron con benceno, en este caso el criterio para dar por terminada la separación de aromáticos fue que el solvente recuperado fuera casi incoloro. Finalmente los compuestos polares se extrajeron del gel con acetona: metanol 1:1 (v/v). Las fracciones se cuantificaron por

gravimetría después de evaporar el solvente a temperatura ambiente en la campana de extracción. El contenido de cada fracción se refirió al total de extracto contenido en un gramo de suelo seco original.

4.5.5. Cuantificación de tolueno

El tolueno en la fase gas se determinó por cromatografía de gases con un cromatógrafo SRI 8610-El equipado con un detector de ionización de flama y columna capilar de metil-silicon. Las condiciones de operación fueron: gas acarreador helio a un flujo de 6.4 ml/min; temperatura del inyector y columna 117 °C y la del detector de 115°C.

4.5.6. Cuantificación de CO₂ en frascos serológicos

El CO₂ producido por la degradación de hidrocarburos en los frascos serológicos se cuantificó con un cromatógrafo Gow Mac serie 580 equipado con un detector de conductividad térmica y columna concéntrica CTR-1, 5% de chromosorb POV-101. Las condiciones de operación fueron: gas acarreador helio a un flujo de 40 ml/min. Temperatura del detector e inyector 80°C, temperatura de la columna 50°C y corriente de 150 mA

4.6. Desorción de hidrocarburos

4.6.1. Desorción con diferentes solventes

Los ensayos de desorción con solventes se realizaron por triplicado por la técnica de matraz agitado (Schwab y col. 1999). Se emplearon matraces Erlen Meyer de 125 ml bafleados, que contenían 9 g de suelo contaminado seco y tamizado (malla 8-10) y 50 ml del solvente. Se

dejaron en agitación a 150 rpm por 24 h a 30° C. El suelo se separó de la fase orgánica por filtración al vacío. Para recuperar los hidrocarburos extraídos, el solvente se evaporó a temperatura ambiente y los hidrocarburos se cuantificaron como HTP por gravimetría.

4.6.2. Desorción en presencia de tolueno

Las pruebas de desorción se realizaron por duplicado en frascos serológicos de 165 ml cerrados herméticamente con septos de teflón. Los frascos contenían 30 ml de medio mineral, 9 g de suelo contaminado seco y tamizado (malla 8-10). Se adicionaron 14 000, 86 000, 144 000 y 231 000 mg de tolueno/ kg suelo y 0.1 % de azida de sodio, para inhibir el crecimiento microbiano. Los frascos se incubaron a 30°C y 150 rpm. La cinética de desorción se siguió durante 24 horas. Al terminar el periodo de incubación la fase acuosa (que incluye a los hidrocarburos desorbidos y el tolueno) se separó por filtración al vacío, el suelo se lavó con agua para arrastrar a los hidrocarburos desorbidos. Los HTP se extrajeron de la fase acuosa como se describe en la sección 4.5.1.

4.6.3. Distribución de tolueno en el sistema

Estos ensayos se realizaron por duplicado en frascos serológicos de 165 ml cerrados herméticamente con septos de teflón. Los frascos contenían 30 ml de medio mineral, 9 g de suelo contaminado seco y tamizado (malla 8-10). Se adicionaron 231 000, 86 000 y 14 000, mg de tolueno/ kg suelo base seca, incluyendo para este último un control abiótico adicionado con 1% (p/p) de HgCl_2 para inhibir el crecimiento microbiano. Los frascos se incubaron a 30°C y 150 rpm. La medición de tolueno en la fase gaseosa se realizó por cromatografía de gases

según se describe en la sección 4.5.5. Los datos se reportan como mg de tolueno/ unidad experimental (UE).

4.7. Cinéticas de biodegradación de hidrocarburos

4.7.1. Biodegradación de hidrocarburos en microcosmos con diferentes solventes

Los ensayos se realizaron en frascos serológicos de 165 ml cerrados herméticamente con válvulas de teflón Mininert®. Los frascos contenían 9 g de suelo contaminado seco y tamizado (malla 8-10), 30 ml de medio mineral y 10% de inóculo (v/v). Para los ensayos con diferentes solventes se adicionó un volumen de solvente que permitiera tener la misma cantidad de los hidrocarburos desorbidos que en el caso de tolueno en 24 h, es decir 0.089 g HTP por unidad experimental. Los solventes ensayados fueron, polares: acetona, metanol y butanol; no polares: tolueno, hexano y benceno. Los frascos se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 30 días. Al terminar la incubación, la fase acuosa se separó del suelo mediante centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min. El suelo se dejó secar a temperatura ambiente y los hidrocarburos se extrajeron del suelo según se describe en la sección 4.5.1.

4.7.2. Biodegradación de hidrocarburos en microcosmos con tolueno

Las pruebas de biodegradación con diferentes concentraciones de tolueno se corrieron con unidades experimentales como las descritas en la sección 4.7.1. Se adicionaron 14 000, 86 000, 144 000 y 231 000 ppm de tolueno. Las unidades experimentales se incubaron a 30°C y 150 rpm durante 30 días. Al terminar la incubación el contenido de los frascos se vació en cajas de Petri y se dejó evaporar a temperatura ambiente el contenido del frasco, es decir, el solvente

residual y el medio mineral. De esta manera se cuantificaron todos los hidrocarburos residuales liberado a la fase acuosa y los depositados en el suelo por efecto de la adición de tolueno. Los hidrocarburos se extrajeron del suelo según se describe en la sección 4.5.1.

CARACTERIZACION DEL SUELO Y CONTAMINANTES

5. Caracterización del suelo y contaminantes

Algunas de las propiedades del suelo que afectan los procesos de sorción/desorción de los hidrocarburos son el contenido de carbono orgánico, capacidad de intercambio catiónico y porosidad (Chang y Alexander, 2002). Por tanto se debe determinar el tipo de suelo y dichas propiedades para establecer las posibles interacciones que ocurren con los hidrocarburos.

5.1 Propiedades físico-químicas del suelo

En la Tabla 5.1 se muestra el análisis de textura del suelo contaminado, se encontró que se trata de un suelo de tipo arenoso-arcilloso. La mayor proporción fue de arena, componente inerte que no presenta interacción con los hidrocarburos (Kim, 1994). La arcilla que es el componente más activo se encontró en una baja proporción, pero puede ser responsable de la adsorción de hidrocarburos junto con la materia orgánica, fenómeno que se ha observado (Hasset y Wagne, 1989) cuando el contenido de carbono orgánico está entre 3 y 5%. En el presente trabajo el contenido de carbono orgánico se estimó en 1.92%, considerando que la materia orgánica se constituye por un 55% de carbono (Nelson y Sommers, 1987), por lo que el efecto de la materia orgánica en la sorción no es despreciable.

Tabla 5.1. Propiedades físicoquímicas del suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo

CEC ^A	PH	% Arena	% Limo	% Arcilla	% Materia orgánica
0.30	3.88	53.84	33.12	13.04	3.90

^A Capacidad de intercambio catiónico, en milioms/ml.

5.2. Características de los contaminantes

El suelo contiene una concentración de HTP de 292 000 mg/kg de suelo, de los cuales un 31% son compuestos alifáticos, 22% poliaromáticos, 14% polares y el 33% restante corresponde a asfaltenos. Esta proporción poco convencional de alifáticos y asfaltenos se cree (Gallegos y col. 2000) puede estar correlacionada a la distribución natural de la vegetación presente en el sitio de muestreo.

En resumen se trata de un suelo altamente contaminado en el que la sorción de los hidrocarburos a la arcilla y materia orgánica debe tener un efecto importante en la disponibilidad de los hidrocarburos en fase líquida. Así para incrementar la tasa de desorción de los hidrocarburos se probó la adición de diferentes solventes.

DESORCION Y BIODEGRADACION CON DIFERENTES SOLVENTES

6. Desorción y biodegradación con diferentes solventes

Los estudios de desorción/biodegradación se dividieron en dos partes, en esta sección se presentan los resultados obtenidos con solventes de diferente polaridad en los ensayos de solubilidad, desorción y desorción/biodegradación simultánea.

6.1 Efecto de los solventes en la desorción de hidrocarburos

Se seleccionaron tres solventes de tipo polar y tres de tipo no polar con el objetivo de determinar el efecto sobre la desorción de hidrocarburos en cultivo de suelo en suspensión al nivel de microcosmos y seleccionar un solvente.

6.1.1. Desorción y solubilidad selectiva de los hidrocarburos

El objetivo de esta sección fue determinar la solubilidad de los hidrocarburos, presentes en el suelo de estudio, en los diferentes solventes empleados y conocer así el efecto del tipo de solvente sobre la extracción. Los ensayos de solubilidad se realizaron según se describe en la sección 4.5.2. empleando un extracto de hidrocarburos obtenido del suelo contaminado. Los resultados se muestran en la Tabla 6.1, los solventes se ordenaron en función de su polaridad, medida por el momento dipolar cuyos datos fueron tomados de la literatura. Es importante mencionar que con benceno y tolueno la desorción de hidrocarburos fue mayor a la concentración inicial de HTP, 292 000 mg/kg de suelo. Con los demás solventes se extrajo entre 22 y el 68% de los HTP iniciales.

La solubilidad del extracto y la desorción selectiva de los hidrocarburos mostraron la misma tendencia respecto a la polaridad de los solventes. Para los de tipo no polar estos

parámetros se relacionaron de manera directamente proporcional al aumento de polaridad. En el caso de los solventes polares, fueron inversamente proporcionales al incremento de la polaridad. Se identificó un punto central con tolueno, que fue el mejor solvente tanto para la solubilidad como para la desorción, resultados que son estadísticamente diferentes de los obtenidos con benceno, según se muestra en el anexo 11.2.

Tabla 6.1 Solubilidad del extracto de hidrocarburos y desorción de hidrocarburos del suelo en presencia de diferentes solventes.

	Momento dipolar a 25° C (D) ^A	Constante dieléctrica a 25° C ^A	Solubilidad (g/g solvente)	Desorción (mg/kg suelo)
Hexano	0.08	1.38	0.379	158 ± 14
Benceno	0.14	2.15	2.733	317 ± 15
Tolueno	0.31	2.38	4.615	391 ± 9
Butanol	1.75	17.51	0.913	201 ± 16
Acetona	2.69	20.7	0.418	140 ± 4
Metanol	2.87	32.7	0.112	66 ± 6

Los resultados de solubilidad representan la media de dos datos experimentales y los de desorción la media de tres unidades experimentales diferentes. ^A La descripción detallada de las propiedades fisicoquímicas de los solventes se muestran en el anexo 11.2.

Al aumentar o disminuir la polaridad con respecto al tolueno disminuyeron la solubilidad y la desorción. Se ha demostrado (Ladda y Lee, 2001) que la polaridad del solvente afecta la solubilidad del tetracloroetileno y es con los más polares con los que se ha tenido la más baja solubilidad. Esto sugirió que el tolueno tiene una polaridad similar a la de los HTP. De acuerdo al valor de su constante dieléctrica el tolueno es ligeramente polar, los HTP que son una mezcla de compuestos de diferente polaridad en conjunto probablemente se comporten como un compuesto ligeramente polar.

Con metanol se obtuvo la menor solubilidad y desorción de hidrocarburos, esto se explica por que el solvente posee la mayor constante dieléctrica por lo que resultaría adecuado para solubilizar compuestos iónicos, pero puede ser poco afín a los hidrocarburos. En un ensayo (Hassett y Wagne, 1989) para estudiar el efecto de la polaridad en la sorción y movilidad de compuestos se encontró que un solvente afín a un compuesto incrementó la solubilidad y disminuyó la sorción; a la inversa un solvente poco afín a un compuesto incrementó la sorción y migración hacia la fase sólida a sitios de polaridad similar.

La tendencia análoga que mostraron la solubilidad y desorción se puede explicar por la selectividad de los solventes por los hidrocarburos, si estos son muy solubles entonces esta gran selectividad facilita la separación de los hidrocarburos de la superficie del suelo y probablemente se trata de una adsorción física, ya que pueden ser extraídos con los solventes (Kelsey y col. 1997). En otros trabajos se demostró (Cornelissen y col. 1998) que para compuestos clorados la desorción de arcillas minerales tiene una entalpía de 50 a 70 kJ/mol, valor que es bajo con respecto a los valores típicos de la adsorción química próximos a 200 kJ/mol (Atkinson, 1986), es decir, los contaminantes sorbidos al suelo tienen enlaces físicos.

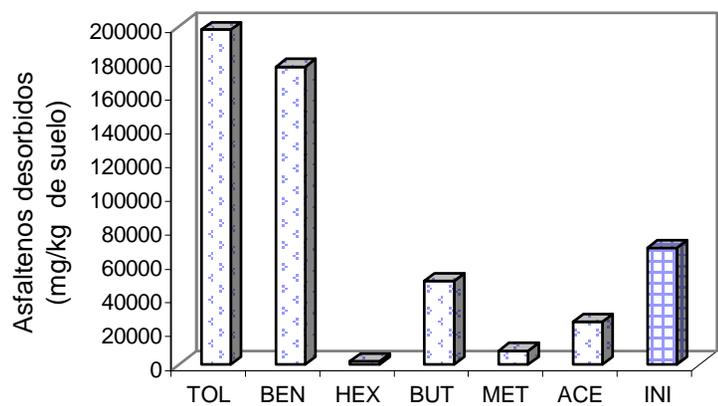
Los resultados demostraron que no existe relación entre la polaridad y la desorción de hidrocarburos, pero si entre la solubilidad y desorción. Sin embargo, estos resultados no se pueden generalizar para el efecto de la polaridad sobre la composición de los extractos de hidrocarburos obtenidos en la desorción.

6.1.2. Composición de los extractos de desorción

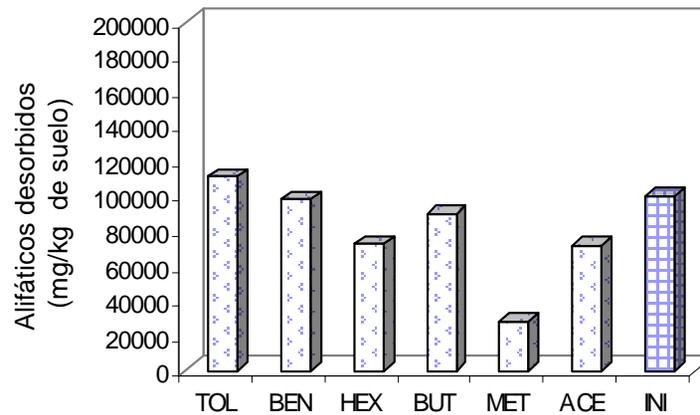
Los extractos de desorción se fraccionaron para determinar si existía una selectividad de los solventes por alguna fracción en particular. La composición del extracto obtenido después de la desorción con los diferentes solventes en 24 h se muestra en la Fig. 6.1 y los resultados del ANOVA y pruebas de comparación de medias se muestran en el anexo 11.2. En el caso de los asfaltenos (6.1-A) que es la fracción más pesada de los HTP, se observó que el tipo de solvente sí tuvo efecto en la extracción. La mayor concentración, 198 000 mg /kg de suelo, se obtuvo con tolueno que es significativamente diferente del resto y mayor a la concentración inicial debido a las propiedades del tolueno. Se ha demostrado (Feniesten y col. 1998) que el tolueno es un solvente apropiado para los asfaltenos, ya que el núcleo de una molécula de asfaltenos está cubierta por unidades alifático/nafténicas. Esto podría favorecer el consumo de asfaltenos pues algunos investigadores señalan que su resistencia a la biodegradación es debida a su complejidad estructural e insolubilidad en agua. La menor desorción se obtuvo con hexano y con metanol, con este último solvente los resultados podrían explicarse en función de la constante dieléctrica, es decir es adecuado para solubilizar compuestos iónicos pero poco afín a los hidrocarburos.

En el caso de los compuestos alifáticos (6.1-B) sólo hubo diferencias significativas entre el metanol y los demás solventes. Con metanol se obtuvieron 28 062 mg de HTP /kg de suelo contra los 89 100 mg/kg de suelo obtenidos en promedio con los demás solventes probados, cuya concentración no es significativamente diferente de la inicial. Para los compuestos aromáticos (6.1-C) los resultados fueron similares a los obtenidos con los asfaltenos, la mayor desorción se obtuvo con tolueno, 53 000 mg/kg de suelo, que fue significativamente diferente

de la obtenida en promedio, 27 375 mg/kg de suelo con el resto de los solventes y también mayor a la concentración inicial. Para los compuestos polares, (Fig. 6.1-D) se distinguieron tres grupos: el metanol y benceno con la menor concentración, 15 974 mg/kg de suelo en promedio; benceno tolueno y acetona corresponden al grupo intermedio con una concentración de 21 090 mg/kg de suelo y el valor más alto en promedio se obtuvo

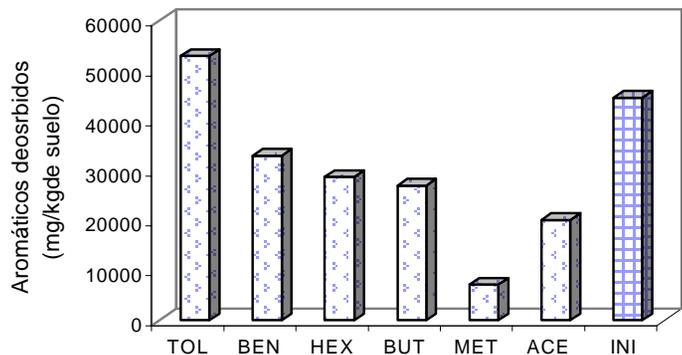


A

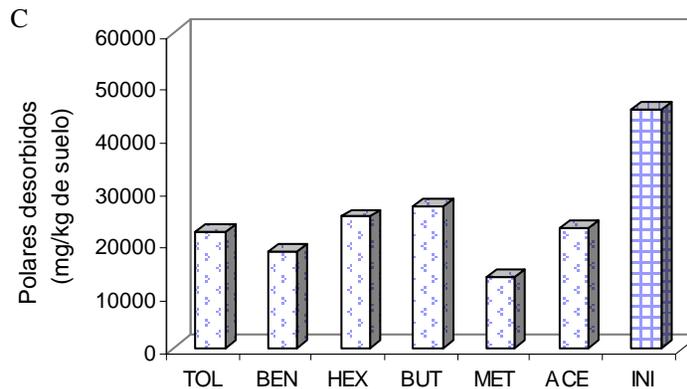


B

Fig. 6.1 Concentración de las diferentes fracciones en los extractos de hidrocarburos obtenidos con los diferentes solventes en el tratamiento de sorción en un



C



D

sistema de suelo en suspensión. En el panel A se muestran los asfaltenos obtenidos con los diferentes solventes, en el B los compuestos alifáticos, en el C los aromáticos y en el D los compuestos polares extraídos. Los datos representan la media de tres unidades experimentales diferentes.

con hexano y butanol que fue 25 950 mg/kg de suelo. En los tres casos la concentración fue menor a la inicial.

La desorción de hidrocarburos del suelo no está relacionada con la polaridad del solvente, de igual manera que la composición de los hidrocarburos presentes en los extractos de desorción, no se correlacionaron con la polaridad del solvente. La mayor desorción de HTP se obtuvo con tolueno, extracto que también tuvo la más alta proporción de asfaltenos, aromáticos y alifáticos.

6.2. Efecto de los solventes en la biodegradación de hidrocarburos

En esta segunda etapa se estudió el efecto de los solventes sobre la desorción/biodegradación simultánea. Estos ensayos también se realizaron en cultivo de suelo en suspensión al nivel de microcosmos.

6.2.1. Desorción y biodegradación de hidrocarburos

El objetivo de estos experimentos fue determinar el efecto de la polaridad de los solventes sobre la desorción/biodegradación simultánea de HTP en un cultivo de suelo en suspensión al nivel de microcosmos. La concentración de solvente se ajustó basándose en la cantidad de hidrocarburos desorbidos con tolueno en 24 h, por que fue el solvente que permitió la mayor desorción. Se incluyó un control sin solvente, pero inoculado, para saber si efectivamente los solventes tienen un efecto en la desorción/biodegradación.

La concentración de los solventes adicionados se muestran en la Tabla 6.2, también se indica el consumo de hidrocarburos después de 30 días de cultivo. Las concentraciones de

solvente empleadas son diferentes por que se calcularon basándose en los datos de solubilidad de hidrocarburos, a fin de que se tuviera la misma desorción de hidrocarburos en todos los tratamientos. El mayor consumo se obtuvo con tolueno, 44 400 mg/kg de suelo, que fue significativamente diferente de los resultados obtenidos con los otros solventes, según lo demuestran los análisis estadísticos presentados en el anexo 11.3. Entre hexano, acetona, butanol y el control, el consumo de hidrocarburos no fue significativamente diferente, 33 400 mg/kg de suelo en promedio. Finalmente el menor consumo se obtuvo con metanol y benceno.

Tabla 6.2. Efecto de la adición de diferentes solventes en la desorción/biodegradación en cultivos en suspensión de suelos en microcosmos.

	Solvente adicionado		Hidrocarburos consumidos (mg/kg de suelo)
	g / kg suelo	g / g HTP	
Hexano	30.77	0.116	25 100 ± 12
Benceno	15.44	0.058	11 000 ± 4
Tolueno	14.33	0.054	44 400 ± 1
Butanol	23.77	0.089	30 400 ± 1
Acetona	35.00	0.132	36 500 ± 2
Metanol	73.11	0.275	3 700 ± 1
Control	----	---	28 600 ± 2

El consumo de hidrocarburos representa el promedio de tres unidades experimentales.

Se conocen varios reportes sobre el uso de solventes “suaves” para la extracción de los hidrocarburos biodisponibles, por ser compuestos solubles en agua se cree que incrementan la solubilidad de los hidrocarburos. El butanol fue reportado (Alexander y Alexander, 2000) como

adecuado para la extracción de HPA adicionados al suelo y para predecir su biodisponibilidad para *E. foetida* (Liste y Alexander, 2002). Sin embargo, la biodisponibilidad depende del tipo de suelo, tiempo de intemperización y del compuesto (Tang y col, 2002). En el presente trabajo, el tolueno produjo mejores resultados esto podría explicarse básicamente por dos causas (i) el comportamiento de los hidrocarburos intemperizados dista mucho de los compuestos de reciente adición (Carmichael y col. 1997), (ii) los hidrocarburos disponibles extraídos con solventes “suaves” pudieran ser compuestos fáciles de remover porque son mezclas muy sencillas, son de reciente adición al suelo y no están adsorbidos. Por tanto en los ensayos de extracción con solventes “suaves” se menosprecian las limitaciones en transferencia de masa para la desorción y solubilidad.

Para el benceno se obtuvo la respuesta esperada, la menor degradación, por que es el compuesto más tóxico para los microorganismos (Huertas y col. 1998). En el caso del metanol la baja degradación obtenida puede atribuirse a la mínima desorción de hidrocarburos lograda y a que se uso una alta concentración de solvente que podría tener un efecto inhibitorio.

De acuerdo a los resultados que se alcanzaron, un solvente con alta capacidad para solubilizar y desorber hidrocarburos, como es el tolueno, favorece la biodegradación por que incrementan la accesibilidad de hidrocarburos para los microorganismos. En la sección anterior se encontró que el extracto de desorción obtenido con tolueno presentaba la mayor proporción de asfaltenos y aromáticos, entonces surge la pregunta si la biodegradación de estas fracciones mejora cuando se adiciona tolueno.

6.2.2. Composición de los extractos de hidrocarburo de degradación

Los extractos de hidrocarburos del tratamiento de desorción/biodegradación se fraccionaron para determinar si el tipo de solvente afectaba el consumo de algunos de los grupos de hidrocarburos. Los resultados se muestran en la Fig. 6.2. En el caso de los asfaltenos, 6.2-A, la menor concentración de asfaltenos residuales se obtuvo con tolueno, 62 300 mg/kg de suelo. Es difícil determinar si se mineralizaron, aunque se ha reportado cometabolismo en presencia de *n*-alcanos C₁₂ a C₁₈ (Leahy y Colwell, 1990) o bien sólo ocurrió la apertura de las moléculas de asfaltenos (Fenistein y col. 1998). Con los otros solventes no hubo cambios significativos con respecto al control y en promedio la concentración fue 84 000 mg/kg de suelo.

En el caso de los compuestos alifáticos, Fig. 6.2-B, no se observan cambios significativos con respecto al valor inicial con los diferentes solventes probados e incluso para el control sin solvente. Para los compuestos aromáticos, Fig. 6.2-C, el mayor consumo ocurrió en presencia de tolueno, por que con este solvente se registró el menor valor de aromáticos residuales, 23 000 mg/kg de suelo; cabe recordar que extrajo tres veces más HPA que el resto de los solventes (sección 6.1.2). Entre los demás solventes no hubo diferencias significativas, aunque si ocurrió un ligero decremento con respecto al control. Debido a su estructura química la transferencia de masa a la fase acuosa y la disolución de HPA probablemente son limitantes para la biodegradación, ya que al incrementar el peso molecular disminuye la solubilidad e incrementa la capacidad de adsorción en el suelo (Ewies y col. 1998). Aunque la presencia de compuestos aromáticos de bajo peso molecular como el naftaleno o tolueno (Alvarez y Vogel, 1991) induce la degradación de HPA, se requieren tiempos muy prolongados para llegar a la mineralización completa.

La concentración final de los compuestos polares se muestra en la Fig. 6.2-D, observamos que sólo en el control hubo un incremento de 10 000 mg/kg de suelo con respecto al valor inicial, ya que la oxidación de alifáticos produce cetonas o ácidos carboxílicos (Riis y col. 1996). Con los solventes probados no hubo un cambio significativo con respecto al valor inicial. Quizá por que hubo una partición de los productos de

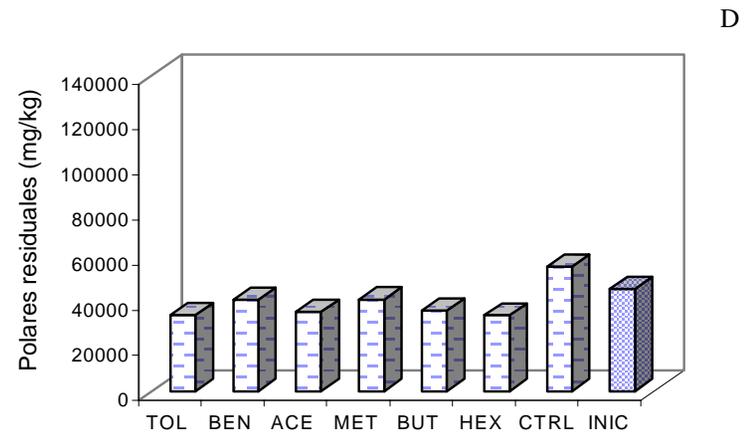
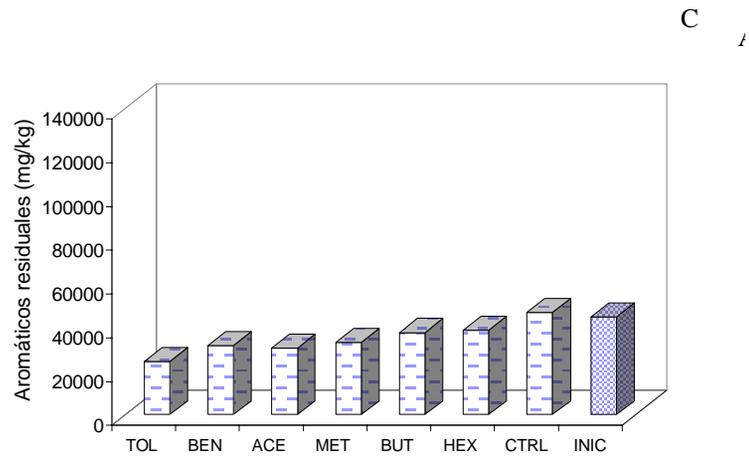
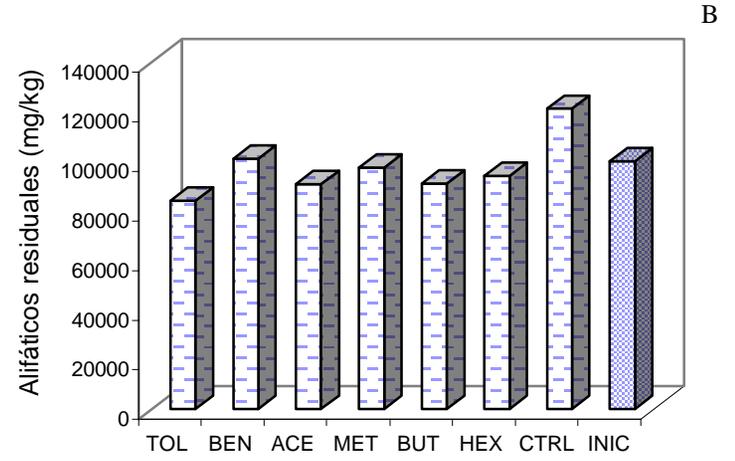
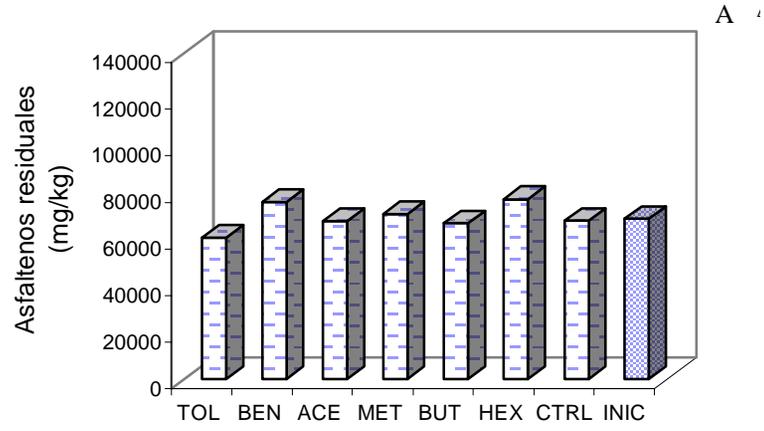


Fig. 6.2. Composición de los extractos de hidrocarburos del tratamiento de desorción/biodegradación en cultivo de suelo en suspensión en microcosmos. Los datos representan la media de dos unidades experimentales.

degradación hacia el suelo mayor a la de los compuestos originales, dificultando la extracción por hexano:acetona.

El consumo de hidrocarburos no da información sobre el destino final de los hidrocarburos que disminuyeron, es decir, podrían disminuir por que los compuestos producidos en la biotransformación tengan una solubilidad distinta a la de los compuestos de los que procedieron o por que la afinidad al suelo sea mayor. Así, para poder determinar si se oxidaron completamente a continuación se analiza la mineralización a través de la producción de CO₂.

6.2.3. Mineralización de hidrocarburos

Para determinar si los hidrocarburos fueron transformados o mineralizados se siguió la producción de CO₂ durante los 30 días de tratamiento. Las cinéticas para los diferentes solventes se muestran en la Fig. 6.3. Se distinguen tres grupos: (i) con una producción de CO₂ mayor a la del control, casos del tolueno y la adición de acetona, (ii) con una producción de CO₂ parecida a la del control, casos del hexano y butanol y (iii) con una producción menor al control, casos metanol y benceno. Este agrupamiento de la producción de CO₂ se presentó de igual manera en la biodegradación (ver Tabla 6.2.), lo que indica que la biodegradación está relacionada con la mineralización en los tratamientos aplicados en este trabajo.

En ninguno de los tratamientos se alcanzó el estado estacionario, en presencia de tolueno se observó una fase de adaptación de aproximadamente 7 días y a partir de este punto la tasa de producción fue constante, al igual que sucedió con la acetona. Aunque hexano, control y metanol comparten esta tendencia la tasa de producción de CO₂ fue menor.

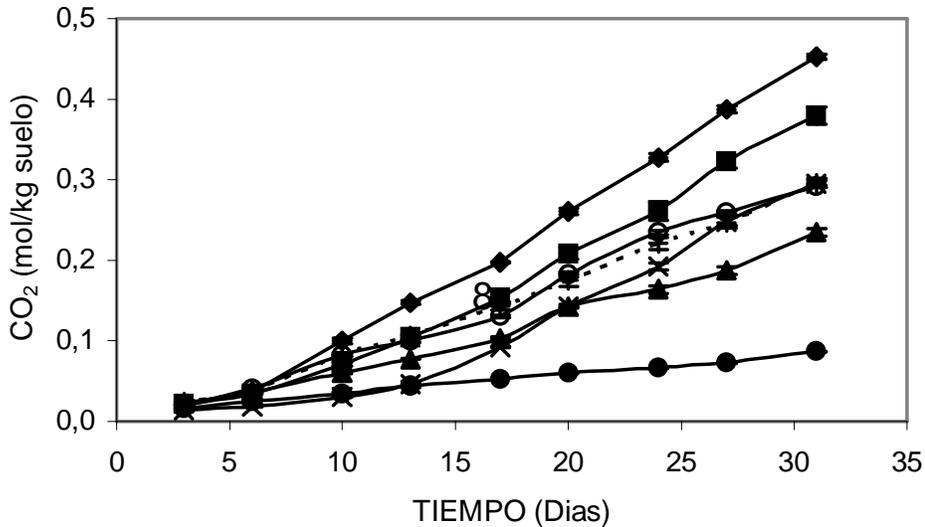


Fig 6.3 Cinética de producción de CO₂ en presencia de hexano 30.77 g/kg de suelo (μ), benceno 15.44 g/kg(λ), tolueno 14.33 g/kg (ν), butanol 23.77g/kg (6), acetona 35.0 g/kg(v), metanol 73.11 g/kg (σ) y el control sin solvente (9), en un sistema de suelo en suspensión. Los datos representan la media de tres unidades experimentales, la desviación estándar estuvo en un rango de 0.19 a 19.25%.

El butanol mostró una fase de adaptación más prolongada, aproximadamente 10 días, mostrando entonces la misma tasa que tolueno y acetona. Para el benceno, que es el compuesto más tóxico para los microorganismos (Huertas y col. 1998) el cambio en la velocidad de producción de CO₂ fue mínimo durante los 30 días de tratamiento.

La tasa de producción de CO₂ que se muestra en la Tabla 6.3, tuvo el valor máximo 16 mmol/kg suelo día, en presencia de tolueno. A pesar de que el tolueno se ha clasificado como un solvente tóxico en función de su log K_{ow} (Sikkema y col. 1995), actualmente se sabe que el

efecto dosis respuesta de un solvente depende de su concentración en la membrana y no sólo de su estructura química (Isken y col. 1999).

Tabla 6.3. Tasa de producción de CO₂ en presencia de diferentes solventes en un cultivo de suelo en suspensión en microcosmos

	q CO ₂ (mmol/kg suelo d)
Hexano	10 ± 0.1
Benceno	2 ± 0.1
Tolueno	16 ± 0.1
Butanol	11 ± 0.2
Acetona	14 ± 0.5
Metanol	8 ± 0.2
Control	10 ± 0.2

En segundo lugar se ubicó la tasa de producción de CO₂ del tratamiento con acetona, 14 mmol/kg suelo día, que fue mayor a la obtenida con butanol, control y hexano, 10.33 mmol/kg suelo día en promedio. Para acetona y butanol estos resultados son congruentes con su carácter no tóxico evaluado por medio del log K_{ow} que es menor a uno (Sikkema y col. 1995). En sistemas de dos fases solvente-agua, se cree que el uso de solventes está limitado por la toxicidad y se prefiere el uso de compuestos inocuos (Salter y Kell, 1995). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que es difícil generalizar sobre el efecto tóxico de los solventes por que hay diversos factores que están implicados: (i) tolerancia de los microorganismos a los solventes (Roberston y Alexander, 1996), (ii) sorción del solvente en el

suelo que aminora el efecto tóxico (Huertas y col. 1998) y (iii) degradación microbiana del solvente.

Aunque los resultados de biodegradación mostraron un comportamiento similar a la producción de CO_2 , esa información no permite conocer la proporción de HTP consumidos que fueron mineralizados. Para tener una aproximación de la mineralización de HTP se hizo una comparación entre el CO_2 experimental y el CO_2 que se produciría por la oxidación completa de los HTP consumidos en cada tratamiento. En la Tabla 6.4 se muestran los datos experimentales y teóricos de la producción de CO_2 . Se observa que para el control el CO_2 experimental es aproximadamente una cuarta parte del CO_2 teórico correspondiente. Con hexano y butanol el CO_2 teórico es aproximadamente seis veces el CO_2 experimental perteneciente, esto indica que en estos casos se estuvo muy lejos de alcanzar la mineralización.

Con tolueno, que es clasificado como un compuesto tóxico, el CO_2 producido fue mayor que en el control, lo cual indicó que no hubo un efecto inhibitorio sobre la respiración, por que probablemente la absorción de tolueno en el suelo protegió a los microorganismos (Huertas y col, 2000). El tolueno favoreció la mineralización por que el CO_2 teórico fue cuatro veces el experimental, es decir la mineralización de HTP fue mayor que con los otros solventes. Si comparamos con respecto al control, en ambos casos el CO_2 experimental fue un 26% del teórico, lo que podría indicar que con la concentración de tolueno ensayada no se presentó un efecto tóxico en la respiración y se mantuvieron la capacidad de mineralización y degradación que el consorcio tiene en ausencia de solventes.

Tabla 6.4. Comparación de la producción de CO₂ experimental y teórica para la biodegradación de HTP en cultivo de suelo en suspensión al nivel de microcosmos

	CO ₂ exp ^A (mmol/kg suelo)	CO ₂ HTP ^B (mmol/kg suelo)	CO ₂ solvente ^C (mmol/kg suelo)	CO ₂ teórico ^D (mmol/kg suelo)
Hexano	298 ± 1.1	1003	1074	2077
Benceno	86 ± 0.5	439	592	1031
Tolueno	450 ± 3.4	1176	546	1722
Butanol	298 ± 4.0	1215	643	1858
Acetona	388 ± 10.9	1459	902	2361
Metanol	238 ± 4.9	147	1143	1290
Control	298 ± 5.2	1131	----	1131

^A Producido a los 30 días de cultivo

^B Corresponde a la oxidación completa de los hidrocarburos consumidos considerando un Y_{CO₂/HTP} igual a 0.6 g CO₂/g HTP (Löser y col, 1999)

^C Corresponde a la oxidación completa del solvente considerando un Y_{CO₂/solvente} igual a 0.6 g CO₂/g solvente(Johnson, 1967)

^D El valor teórico corresponde a la suma de la columna B y C.

En el caso de metanol, tratamiento con la mayor adición de solvente, es probable que el metabolismo se haya orientado al consumo de metanol sin llegar a la mineralización. Por que el CO₂ estimado para la oxidación teórica de los HTP es menor al CO₂ estimado para la oxidación de HTP e incluso es menor al que se obtendría para la oxidación teórica.

En síntesis no existe una relación entre la polaridad y la biodegradación de los hidrocarburos, pero los mejores resultados de degradación de HTP se obtuvieron con el tolueno de igual manera que sucedió con los compuestos aromáticos, pero el metabolismo se orienta a la transformación principalmente. El consumo de compuestos alifáticos no se favoreció por la adición de solventes, por el contrario en presencia de metanol el consumo

fue menor al control. En tanto que el tolueno fue el mejor solvente para la desorción y biodegradación fue elegido para los estudios posteriores.

6.2.4. Consumo de oxígeno en presencia de diferentes solventes

El consumo de oxígeno fue determinado para correlacionar con la producción de CO_2 . La cinética de consumo se muestra en la Fig. 6.4. se distinguen tres grupos: (i) con un consumo mayor al del control, casos del tolueno, acetona y hexano, (ii) con un consumo similar al del control, caso del butanol y (iii) con un consumo menor al del control, casos metanol y benceno. Este agrupamiento fue también observado en la producción de CO_2 (sección anterior). En ninguno de los tratamientos se alcanzo el estado estacionario, pero con benceno el consumo tuvo un cambio mínimo a partir de los 10 días de cultivo.

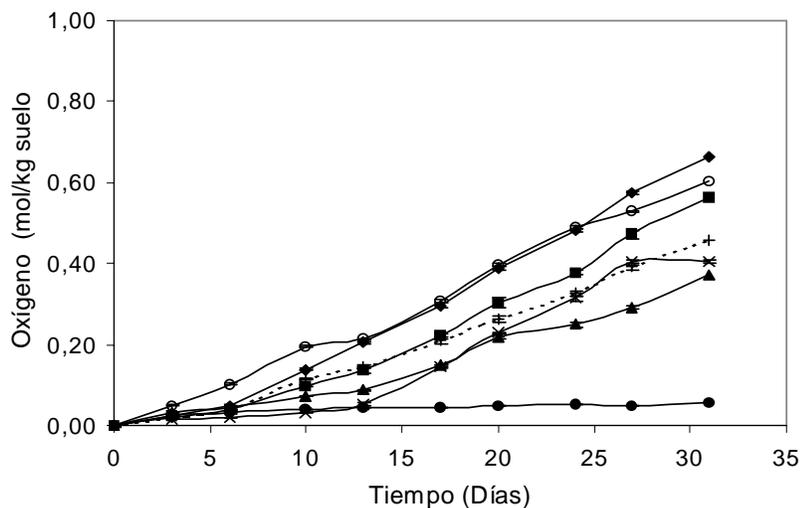


Fig 6.4 Cinética de consumo de O_2 en presencia de hexano 30.77 g/kg de suelo (μ), benceno 15.44 g/kg(λ), tolueno 14.33 g/kg (ν), butanol 23.77g/kg (ϵ), acetona 35.0 g/kg(σ), metanol 73.11 g/kg (ϑ) y el

control sin solvente (9), en un sistema de suelo en suspensión. Los datos representan la media de tres unidades experimentales, la desviación estándar estuvo en un rango de 0.11 a 19.70%.

La agrupación descrita también fue observada en la producción de CO₂, pero en el tratamiento con hexano el CO₂ producido fue similar al control y en este caso se consumió una mayor cantidad de oxígeno, los que podría indicar una cierta alteración del metabolismo.

La relación entre el oxígeno consumido y los HTP degradados se muestra en la Tabla 6.5, que varió entre 0.207 y 0.961 g de oxígeno/g C consumido en los 30 días de cultivo. Se observa un valor atípico, para el comportamiento general mostrado, en el caso de metanol y tolueno con un valor de 4.033 y 1.057 g de oxígeno/g de C consumido, respectivamente. Para la degradación de fenantreno en fase sólida Loser y col (1999) determinaron una relación igual a 0.138 g O₂/g carbono consumido para condiciones en las que no hubo limitación de oxígeno. Sin embargo, no se dispone de más información para afirmar que en este trabajo hubo limitación de oxígeno o estuvo en concentración suficiente. Aunque cabe aclarar que en los microcosmos la concentración de oxígeno fue siempre mayor al 50% de la saturación de aire.

Tabla 6.5. Comparación del consumo de oxígeno para la degradación de HTP en presencia de diferentes solventes

	$\frac{\text{g O}_2 \text{ consumido}}{\text{g C consumido}}$
Hexano	0.961
Benceno	0.207
Tolueno	1.057
Butanol	0.531
Acetona	0.615

6.3. Efecto del tolueno en la desorción de hidrocarburos

Para explicar el efecto del tolueno en los ensayos de desorción/biodegradación simultánea de hidrocarburos se planteó estudiar de manera independiente a la desorción isotérmica de hidrocarburos, en presencia de un amplio intervalo de concentraciones de tolueno, para conocer el comportamiento de la desorción en ausencia de los microorganismos degradadores de hidrocarburos.

6.3.1. Desorción de hidrocarburos en presencia de tolueno

La motivación de estos experimentos fue conocer el efecto del tolueno en la desorción de hidrocarburos, se trabajó en condiciones abióticas para evitar que un posible consumo de hidrocarburos o tolueno por los microorganismos presentes en el suelo alteraran los resultados. Las cinéticas de desorción de hidrocarburos se ajustaron al modelo empírico siguiente:

$$C_L = C_1 \left(1 - e^{-K_2 t}\right) \quad (6.1)$$

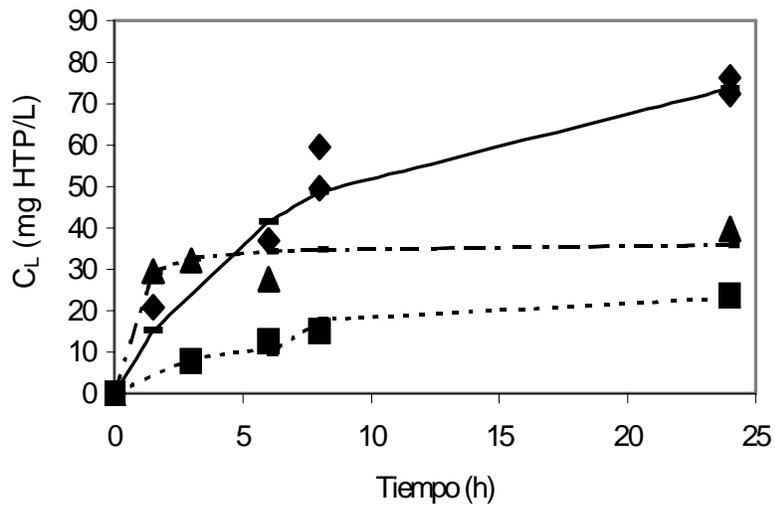
Donde C_L representa la concentración de HTP en la fase líquida en mg/l de suspensión, C_1 es la concentración máxima de hidrocarburos que puede alcanzarse en cada tratamiento, expresada en mg/l, de suspensión, K_2 es el tiempo al cual se alcanza la mitad de la C_L máxima y t es el tiempo de tratamiento en horas. Las constantes del modelo se estimaron minimizando

la suma de los cuadrados de los errores entre los valores experimentales y los estimados de C_L , usando Microsoft Excel Solver®. Los valores estimados para las constantes C_1 y K_2 se muestran en la Tabla 6.6. en la que se incluye el coeficiente de regresión. Como se puede observar el modelo usado explica al menos un 70% de los datos, en el caso del control sin solvente en los demás tratamientos el ajuste fue mejor.

Tabla 6.6 Valores estimados para las constantes C_1 y K_2 del modelo de desorción de hidrocarburos en presencia de tolueno

Tolueno (mg/kg de suelo)	C_1 (mg HTP/L)	K_2 (h)	R^2
0	33.32	9.78	0.71
14 000	36.32	0.35	0.84
86 000	99.06	8.28	0.46
144 000	546.25	15.63	0.93
231 000	4515.52	13.68	0.81

En la Fig. 6.5 se muestra la concentración de hidrocarburos en la fase líquida (C_L) para las diferentes concentraciones iniciales de tolueno ensayadas, la Fig. 6.5-A corresponde a concentraciones menores a 84 000 mg/kg de suelo y la Fig. 6.5-B a concentraciones superiores a 115 000 mg/kg de suelo iniciales de tolueno. Se puede observar que la desorción de hidrocarburos, según se ha reportado (Pignatello y Xing, 1996), ocurre en dos etapas independientemente de la concentración inicial de tolueno adicionada. En promedio la primera etapa de desorción rápida se prolonga hasta 8 h. La siguiente etapa, casi estacionaria tiende al equilibrio lentamente. Durante las 24 h en que se siguió la desorción en ningún caso se alcanzó el equilibrio. Se cree (Young y Weber, 1995) que la etapa de desorción lenta está controlada por la difusión de hidrocarburos en la materia orgánica y en las superficies



minerales. Estas fracciones podrían ser las responsables de la sorción de los HTP en el suelo que se utilizó en este trabajo.

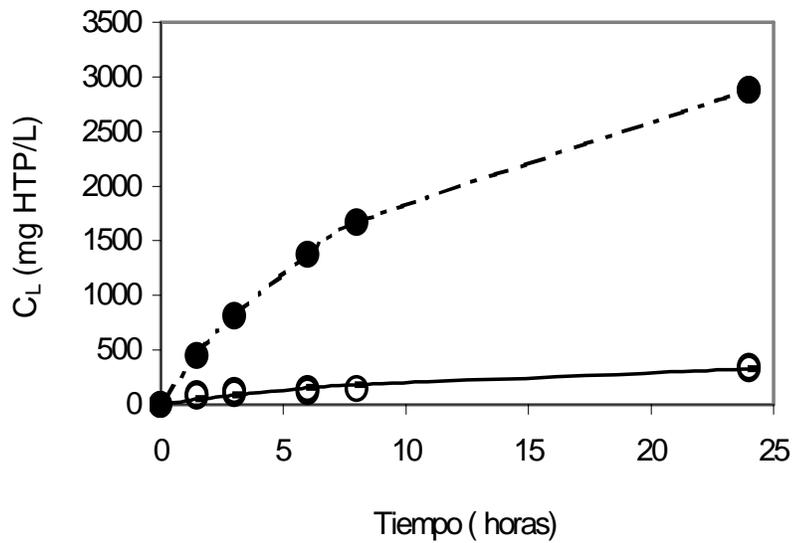


Fig. 6.5. Cinéticas de desorción de hidrocarburos en presencia de tolueno en cultivo de suelo en suspensión en microcosmos. Los datos corresponden a la media de duplicados. La variación entre los duplicados estuvo entre 2.1 y 18.5%. Concentración inicial de tolueno adicionada (mg/kg de suelo): (σ)14000, (υ)86 000, (ο)144 000, (λ)231 000 y (ν) control. Las líneas corresponden al ajuste del modelo empírico ec. 6.1.

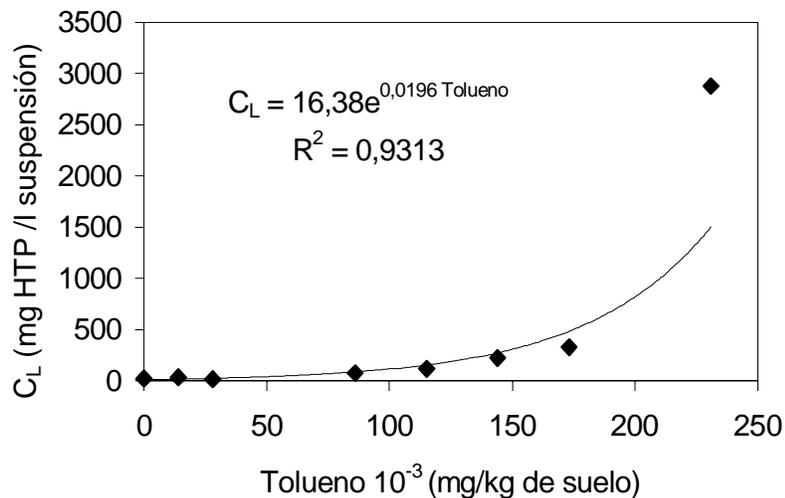
En el caso de HPA que contaminan un suelo intemperizado se demostró (Carmichael y col. 1997) que en 30 días se desorbió menos del 0.5% de los compuestos iniciales, esto es en la desorción rápida se libera una cantidad importante de compuestos. Si se toma como base estos resultados se puede suponer que no se registrarían cambios importantes en la concentración de HTP en la fase líquida en un tiempo mayor a 24 h y es justificable haber seguido la desorción durante este tiempo.

Los datos experimentales sólo proporcionan información puntual sobre C_L para las concentraciones de tolueno probadas, si se ajusta un modelo con esas variables se puede predecir C_L a diferentes concentraciones iniciales de tolueno. En la Fig. 6.6 se observa que C_L muestra una tendencia exponencial. Con respecto al tolueno adicionado en concentraciones bajas, el cambio fue mínimo pero a partir de 170 000 mg/kg de suelo, C_L se elevó drásticamente. Basándose en el modelo, si la concentración de tolueno es cero se estima una C_L de 16 mg/l de suspensión. El significado físico de este valor, se refiere a la cantidad de hidrocarburo que se disuelve en agua, saturándola en ausencia de tolueno. Este valor es del mismo orden de magnitud que la solubilidad de naftaleno en agua (32 mg/l) o la de compuestos alifáticos de bajo peso molecular como heptano (2.9 mg/l) (Alexander, 1999).

La similitud entre la solubilidad estimada para los HTP y los compuestos mencionados dan una mayor validez a las determinaciones realizadas y al modelo propuesto. Con este

sencillo modelo se puede predecir la concentración de HTP a bajas concentraciones de tolueno donde la cuantificación sería complicada debido a la sensibilidad de las técnicas analíticas que se requieren y que es precisamente la zona donde se tiene el mejor ajuste. Incluso el modelo podría permitir estimar los rendimientos de extracción (mg HTP/mg tolueno adicionado) para determinar la eficiencia de tolueno usándolo como un agente de extracción de HTP. Sin embargo para comparar con otros sistemas de tratamiento es preferible el uso de las tasas de desorción, que pueden estimarse a partir de los resultados anteriores.

Fig. 6.6. Variación de la concentración de hidrocarburos desorbidos a la fase líquida (C_L en 24 h con



respecto a la concentración inicial de tolueno en cultivo de suelo en suspensión.

6.3.2. Efecto del tolueno en la tasa de desorción

La tasa de desorción de hidrocarburos (q_{DH}) se estimó en todos los tratamientos como la velocidad inicial promedio obtenida entre las cero y ocho horas en las cinéticas de desorción. En la Fig. 6.7 se muestra la q_{DH} con respecto a la concentración de tolueno, que presenta un perfil similar a C_L en función de la concentración de tolueno. En la Fig. 6.6 se distinguen tres

intervalos: el primero con menos de 86 000 mg/L de suspensión día donde la q_{DH} cambia de 169 a 555 mg HTP/L de suspensión día. A partir de este punto, en el segundo intervalo, sólo incrementa ligeramente q_{DH} y en el último alrededor de 173 000 mg/kg de suelo de tolueno, la q_{DH} aumenta significativamente. La q_{DH} para 231 000 mg/kg de suelo se omitió porque tiene un valor muy alto que sale de la escala de la gráfica.

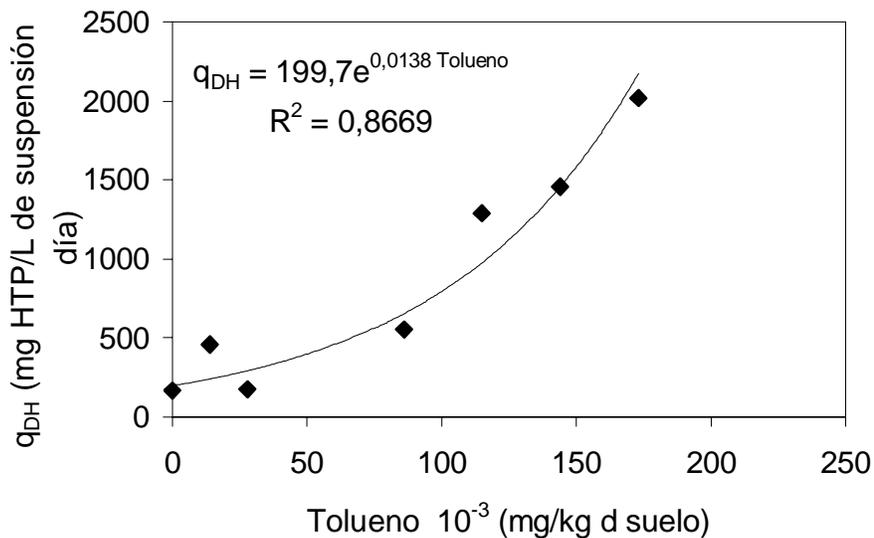


Fig. 6.7. Efecto de la adición de tolueno en la velocidad de desorción inicial q_{DH} en cultivo de suelo en suspensión

Los tres intervalos observados en los experimentos de q_{DH} pueden explicarse de acuerdo a lo siguiente: el tolueno es un excelente solvente para asfaltenos y aromáticos según se demostró en las pruebas de extracción con solventes (véase sección 6.1.2.). Al liberarse estos compuestos permanecen sobre el suelo debido a su carácter hidrófobo. En concentraciones de

tolueno cercanas a 86 000 mg/kg de suelo se presenta una fase orgánica dispersa en gotas o FLNA y entonces la partición de hidrocarburos se orienta preferentemente hacia el suelo. En concentraciones superiores a 173 000 mg/kg de suelo, cuando una FLNA está presente, la partición de hidrocarburos tiende a la fase orgánica (Jonge y col. 1997) incrementando la desorción de hidrocarburos. El incremento de la concentración de hidrocarburos en la fase líquida, con concentraciones de tolueno elevadas, sugiere que la difusión en los poros del suelo es de escasa importancia cuando se adiciona tolueno.

Para compuestos aromáticos de suelos intemperizados se reportó (Carmichael y col. 1997) una tasa de desorción menor, en un orden de magnitud, a la obtenida en este trabajo para el control sin solvente. Sin embargo en esos ensayos las concentraciones de contaminantes eran de 200 mg/kg de suelo, muy por debajo de la concentración del suelo que se empleo en este trabajo.

Debido a la alta solubilidad de los HTP en tolueno (0.6g/ml) una vez extraídos se supone que se comportan como una mezcla estable y homogénea en la que no es fácil distinguir al solvente adicionado. Salvo en el caso de los asfaltenos, donde podría ocurrir un cambio en la estructura molecular, no se espera que por la presencia de tolueno ocurran cambios en las moléculas de las diferentes fracciones de hidrocarburos.

Basándose en los resultados anteriores, se puede suponer como sucede la distribución del tolueno en la fase líquida y el suelo a través de un balance de materia que permita estimar la distribución del tolueno en las fases del sistema.

6.3.3. Distribución de tolueno en las fases del sistema de estudio

El tolueno tiende a distribuirse entre todas las fases presentes en el microcosmos: fase sólida (suelo), fase líquida y fase gaseosa. Esta distribución depende de los coeficientes de partición y el contenido de materia orgánica del suelo. Con el fin de conocer como es la partición hacia el suelo se midió el tolueno en la fase gas durante 30 días para tres concentraciones 231 000, 86 000 y 14 000 mg/kg de suelo incluyendo para esta última un control abiótico utilizando HgCl_2 al 1% (p/p) para impedir la actividad microbiana.

Cuando la adición de tolueno fue de 14 000 mg/kg de suelo, en 6 h ya no se detectó tolueno en la fase gaseosa, según se muestra en la Fig. 6.8, de igual manera sucedió en el control abiótico posiblemente debido a una rápida sorción inicial de tolueno (Arocha y col. 1996). En concentraciones mayores no se observa un decremento del tolueno en la fase gaseosa durante los 30 días que se midió el tolueno en la fase gaseosa. Una alta concentración de tolueno posiblemente saturó el suelo y la fase líquida quedando un exceso en la fase gaseosa que se determinó como constante durante el tiempo.

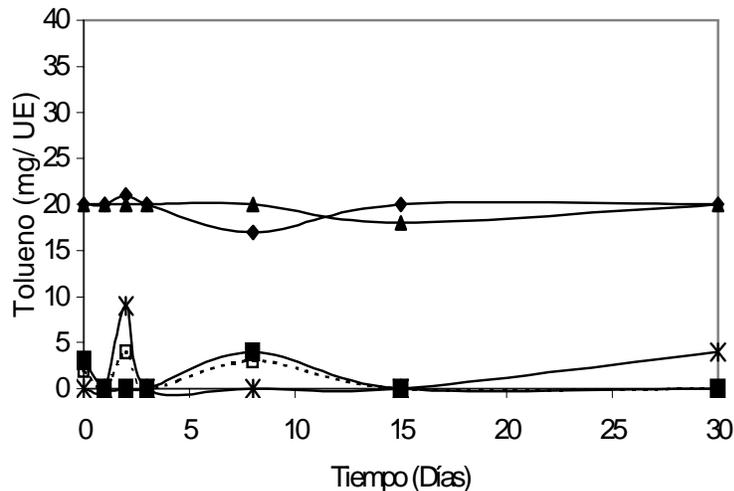


Fig. 6.8 Evolución de tolueno en la fase gaseosa de los suelo) fueron: 14 000 (v), 86 000 (e), 144 000 (v) y 231 000 (e), se incluyó un control microcosmos con suelo y medio mineral. Las concentraciones iniciales de tolueno (mg/kg de abiótico para 14 000 ()).

La distribución de tolueno se puede ajustar a un balance de masa para tolueno en cada unidad experimental:

$$M_{tol} = M_{tol_{suelo}} + M_{tol_{agua}} + M_{tol_{aire}} \quad (6.2)$$

Donde M_{tol} es la masa inicial de tolueno adicionada en g/kg de suelo y los subíndices suelo, agua y aire indican la masa distribuida a cada fase, para el caso de 14 000 mg/kg de suelo de tolueno la masa de tolueno adicionada fue:

$$M_{tol} = \frac{14\,000\text{ mg}}{\text{kg suelo}} (0.009\text{ kg suelo})$$

$$M_{tol} = 126\text{ mg tolueno}$$

Por tanto la ec. (6.2) puede expresarse como:

$$126\text{ mg} = C_S V_S + C_L V_L + C_G V_G \quad (6.3)$$

donde C es la concentración de tolueno en la fase indicada por el subíndice correspondiente y V el volumen de la fase en el microcosmos etiquetado como: S para el suelo, L para la fase líquida y G para la fase gaseosa. Las concentraciones de tolueno tanto en la fase líquida como gaseosa corresponden a la solubilidad: 540 mg/l agua y 115 mg/l aire. Se adicionaron concentraciones

elevadas que saturan las fases del sistema, por tanto la incógnita para el balance es la concentración en el suelo, sustituyendo en la ec. (6.3):

$$126 \text{ mg} = C_S(9 \text{ g suelo}) + \frac{540 \text{ mg}}{1 \text{ fase líquida}} (0.036 \text{ l fase líquida}) + \frac{115 \text{ mg}}{1 \text{ fase gaseosa}} (0.131 \text{ l fase gaseosa}) \quad (6.4)$$

Cuando la ec. (6.4) se resuelve para C_S se obtiene un valor de 10.2 mg/g suelo. Este valor representa que en el sistema, un 73 % del tolueno adicionado quedó sorbido en el suelo, en tanto que en la fase líquida y gaseosa queda un 16 y 11 % respectivamente. Se ha reportado que en la sorción rápida de tolueno, un 90% de solvente queda en el suelo (Robinson y col. 1990). Por tanto las suposiciones para el balance son congruentes con los resultados previamente reportados.

Los resultados obtenidos en esta sección experimental demostraron que el tolueno afecta la q_{DH} de tal manera que permite definir tres zonas de diferente velocidad y a la vez genera tres condiciones de distribución de tolueno: en concentraciones menores a 14 000 mg/kg de suelo, la q_{DH} es mínima y un 90% del tolueno queda sorbido en el suelo. En concentraciones superiores a 144 000 mg/kg de suelo la q_{DH} muestra un incremento exponencial y gran parte del tolueno queda disperso junto con los HTP como una FLNA. Dado que la presencia de los microorganismos afecta la tasa de desorción se propuso estudiar de manera simultánea a la desorción y a la biodegradación tomando como referencia los resultados obtenidos en los ensayos desorción abióticos.

**DESORCION/BIODEGRADACION SIMULTANEA EN PRESENCIA DE
TOLUENO**

7. Desorción/biodegradación simultánea de hidrocarburos en presencia de tolueno

En esta sección se presentan los resultados correspondientes a los estudios de desorción/biodegradación en presencia de tolueno que se realizaron en microcosmos. Primeramente se presentan los resultados de biodegradación, para después compararse con los datos de mineralización, y finalmente el modelamiento del consumo de hidrocarburo en la fase líquida.

7.1. Efecto del tolueno en la desorción/biodegradación simultánea

En esta sección se estudió el efecto de la concentración de tolueno en ensayos de desorción/biodegradación simultánea en microcosmos. Para tratar de minimizar el efecto de la tasa de desorción de hidrocarburos (Carmichael y col, 1997) sobre el consumo en la fase líquida, se estudió un amplio intervalo de concentraciones de tolueno que permitieran un exceso de hidrocarburos libres en la fase líquida.

7.1.1. Desorción/biodegradación simultánea

El objetivo de esta sección experimental fue determinar el efecto del tolueno en la desorción/biodegradación simultánea en cultivo en suspensión de suelo al nivel de microcosmos. En la Fig. 7.1 se muestran los hidrocarburos residuales en el suelo durante los 30 días de tratamiento. La concentración de tolueno reportada podría incluir al tolueno sorbido en el suelo, que no es diferenciable de los hidrocarburos y que por tanto se puede asumir son una mezcla homogénea. Se observa que concentraciones de tolueno superiores a 14 000 mg/kg de suelo mostraron un efecto inhibitorio en la transformación de HTP, la degradación fue menor a

la obtenida en el control sin solvente. En el caso de 14 000 mg/kg de suelo de tolueno se observa un efecto positivo, la degradación de HTP fue del 40%, tres veces superior al control y los hidrocarburos disminuyeron de 292 000 a 171 000 mg/kg de suelo en los 30 días de cultivo.

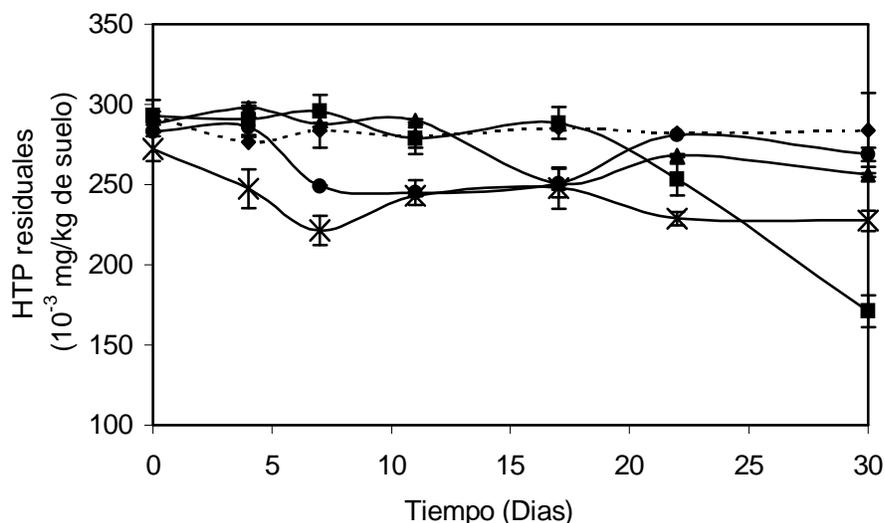


Fig. 7.1. Hidrocarburos residuales en el suelo en presencia de tolueno 14 000 (v), 86 000 (δ), 144 000 (ψ) y 231 000 mg/kg de suelo, se incluye la concentración inicial de HTP (λ) y un control abiótico sin solvente (σ). El cultivo se efectuó en suspensión de suelo al nivel de microcosmos. Los datos representan la media de dos observaciones experimentales.

Cuando la adición de tolueno fue de 14 000 mg/kg de suelo se presentó una larga fase de adaptación de aproximadamente 15 días, a partir de este punto ocurrió un decremento considerable en la concentración de HTP residuales en el suelo. Este largo periodo de adaptación podría deberse a la aclimatación de los microorganismos a la concentración de tolueno en el cultivo. Cuando la concentración inicial de tolueno es superior a 14 000 mg/kg de suelo la disminución de la actividad microbiana podría ser causada por la disminución de la

población microbiana, la cual requiere un cierto tiempo para recuperarse aunque la densidad microbiana será menor a la inicial (Huertas y col. 2000). Se debe considerar también que los requerimientos energéticos para adaptación al tolueno hacen disminuir la actividad de degradación (Isken y col, 1999).

A partir de las cinéticas de degradación de HTP se evaluó la tasa de consumo de hidrocarburos (q_{HTP}) que se muestra en la Fig. 7.2, en función de la concentración inicial de tolueno. Se puede observar que la q_{HTP} máxima se presentó con 14 000 mg/kg de suelo, que está localizada en la zona de desorción lenta (véase sección 6.3.2.) Al incrementar la concentración de tolueno la q_{HTP} disminuye drásticamente. Los valores más bajos se ubican en la zona de alta velocidad de desorción donde el exceso de la presencia de las especies de HTP-tolueno pudieron producir un efecto inhibitorio en la actividad degradativa del consorcio microbiano.

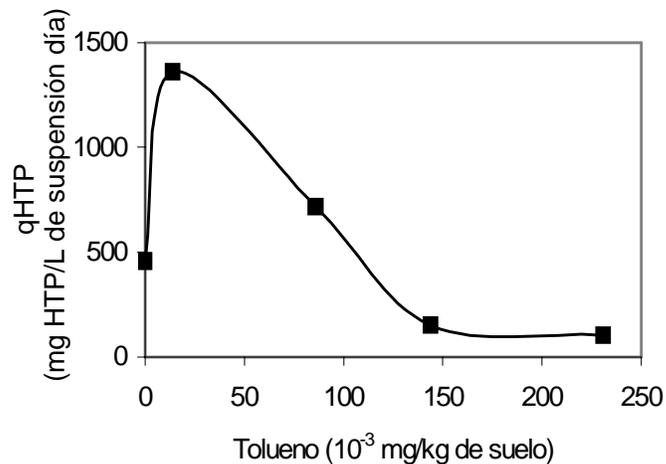


Fig. 7.2. Velocidad de consumo de HTP (q_{HTP}) de un cultivo de suelo en suspensión en función de la concentración inicial de tolueno. Los datos representan la media de dos datos.

En ausencia de solvente la q_{DH} (ver Fig. 6.6) fue casi tres veces menor que la q_{HTP} también en ausencia de solvente, esto sugiere que la población microbiana fue capaz de usar los compuestos tan pronto como fueron liberados y que la velocidad de desorción fue el paso limitante (Gray y col, 2000). Cuando la adición de tolueno fue de 14 000 mg/kg de suelo q_{HTP} se triplicó con respecto a la determinada en el control sin solvente y fue tres veces la q_{DH} determinada en ausencia de microorganismos, lo que reiteró la alta capacidad de degradación del consorcio y el consumo de hidrocarburos en las gotas de HTP-tolueno formadas. En una mezcla de sustratos la presencia de un compuesto puede ejercer efectos positivos (inducción enzimática) o negativos (inhibición o toxicidad). Conviene aclarar que la toxicidad se refiere a los cambios estructurales o funcionales en un sistema o parte específica de un organismo; en tanto que la inhibición se refiere al decremento en la velocidad de una reacción catalizada enzimáticamente. En el caso de tolueno en bajas concentraciones puede estimular la degradación de otros compuestos aromáticos (Álvarez y Vogel, 1991), como sucede aparentemente con 14 000 mg/kg de suelo. Aunque también se ha reportado que concentraciones elevadas de tolueno, de 25 a 40 mg/l de medio, inhibe la degradación de benceno y fenol (Reardon y col. 2000). En la membrana celular el tolueno provoca perforaciones, colapsando el potencial de membrana (Sikkema y col. 1995), lo que podrían al mismo tiempo alterar la permeabilidad o los mecanismos de transporte. Estas dos respuestas de los microorganismos a elevadas concentraciones de tolueno explican por que el consumo de HTP disminuye cuando se adicionan más de 86 000 mg/kg de suelo.

La degradación de HTP es una función que se ve alterada por el tolueno, pero la respiración de los microorganismos también podría modificarse, debido a esto se midió el CO₂ producido en los tratamientos con tolueno.

7.1.2 Mineralización de hidrocarburos

A la par de la degradación se siguió la producción de CO₂ con el fin de poder determinar el efecto del tolueno sobre la respiración de los microorganismos. La cinética de producción de CO₂ se muestra en la Fig. 7.3-A para el control sin solvente y cuando se adicionaron 14 000 mg/kg de suelo. Se observa que la adición de tolueno produjo una fase de adaptación de aproximadamente 15 días, al igual que en la cinética de consumo de hidrocarburos (ver Fig. 7.1). En el control sin solvente esta fase de aclimatación no es tan marcada. En ausencia de tolueno la producción de CO₂ fue de 0.5 mol/kg de suelo que fueron atribuidas al consumo de materia orgánica y en menor proporción al consumo de hidrocarburos. En presencia de 14 000 mg/kg de suelo de tolueno la producción fue de 1.9 mol/kg de suelo, es decir hubo un incremento proporcional del CO₂ producido con respecto al hidrocarburo consumido, esto sugirió que ocurrió la mineralización y no sólo la transformación.

Para las concentraciones superiores a 86 000 mg/kg de suelo en la Fig. 7.3-B se muestra la producción de CO₂. En estos casos no se observa una fase de adaptación pero el bióxido de carbono producido fue menor al control lo que sugiere un efecto inhibitorio sobre la respiración.

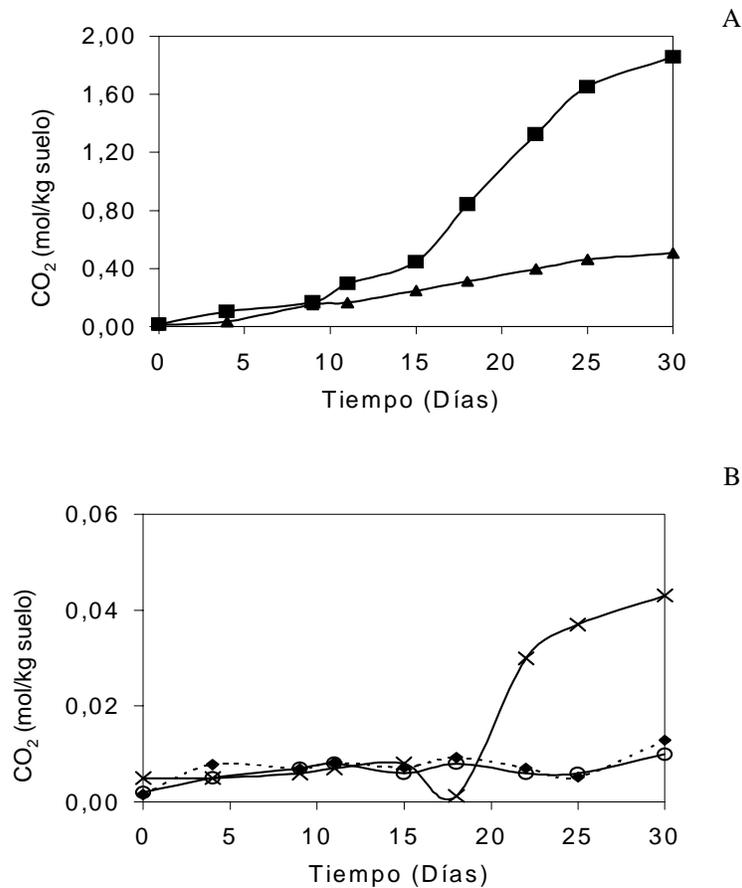


Fig. 7.3 Cinética de producción de CO₂ en presencia de tolueno: 14 000 (v), 86 000 (6), 144 000 (v) y 231 000 mg/kg de suelo (λ) y un control sin solvente (σ). El cultivo se efectuó en suspensión de suelo al nivel de microcosmos. Los datos representan la media de dos unidades experimentales diferentes. Para los duplicados la variación estuvo entre 0.1 y 2.2%.

La velocidad de producción de CO₂ (q_{CO_2}) fue estimada a partir de las cinéticas de producción de CO₂, como la pendiente de un ajuste lineal de los datos experimentales. En la Fig. 7.4 se observa que la q_{CO_2} presentó el mismo perfil que q_{HTP} en función de la concentración inicial de tolueno adicionado, aunque con 86 000 mg/kg de suelo la q_{CO_2} quedó en el punto medio de la pendiente de decremento en tanto la q_{HTP} tomó una posición más arriba en la pendiente de la curva que le corresponde (ver Fig. 7.2). El máximo valor registrado

sugirió que el tratamiento con 14 000 mg/kg de suelo de tolueno es el mejor porque en estas condiciones se mineralizó la mayor cantidad de hidrocarburos.

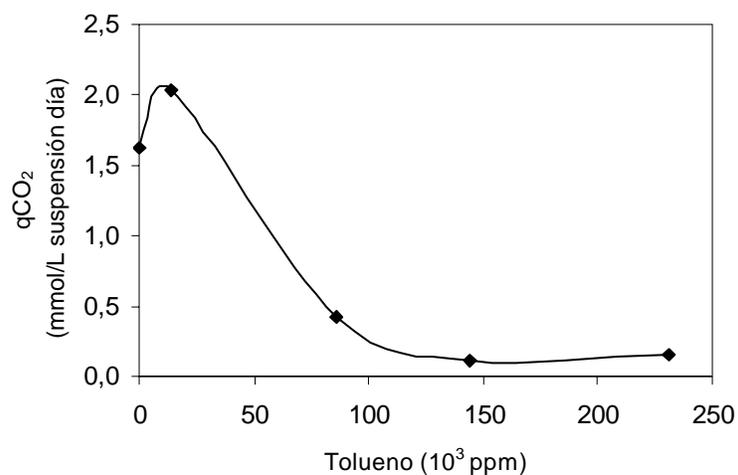


Fig. 7.4 Velocidad de producción de CO_2 (q_{CO_2}) durante la degradación de hidrocarburos en función de la concentración inicial de tolueno, en un cultivo en suspensión de suelo en microcosmos.

Los rendimientos de CO_2 con respecto al sustrato ($Y_{CO_2/HTP}$) se muestran en la Tabla 7.1, para el sistema de estudio el sustrato se refiere tanto a los HTP y como al tolueno presentes en la fase líquida como una mezcla homogénea. Los valores de $Y_{CO_2/HTP}$ estimados para el control y el tratamiento con 14 000 mg/kg de suelo de tolueno fueron similares a los reportados (Johnson, 1967) para diferentes hidrocarburos alifáticos. En los otros tratamientos el rendimiento posiblemente disminuyó debido a un incremento en los requerimientos energéticos para la adaptación y remoción de tolueno de la célula (Isken y col. 1999). Con 14 000 mg/kg de suelo no se modificó el rendimiento porque el tolueno promueve la desorción en tanto que la capacidad de degradación no se altera. El incremento en la producción de CO_2 fue proporcional al consumo de HTP cuando se adicionaron 14 000 mg/kg de suelo de tolueno.

Tabla 7.1 Rendimiento de CO₂ (Y_{CO₂/HTP}) en presencia de tolueno en un cultivo en suspensión de suelo.

Tolueno (mg/kg de suelo)	Control	14 000	86 000	144 000	231 000
Y _{CO₂/HTP} (g/g)	0.61±0.7	0.66±0.16	0.04±0.008	0.06±0.015	0.04±0.011

El rendimiento fue estimado a partir de las cinéticas de producción de CO₂ y de consumo de HTP en 30 días. Los valores son la media de dos mediciones.

Los rendimientos obtenidos con la adición de 14 000 mg/kg de suelo sugirieron que las células disponen de sustrato en cantidad suficiente en la fase líquida para alcanzar los rendimientos que se logran en cultivo líquido sin limitaciones difusionales y que esta concentración de tolueno no afecta a la actividad respiratoria ni a la de degradación. Para sustentar esta suposición se estimó el consumo de hidrocarburos en la fase líquida.

7.1.3. Consumo de oxígeno

El consumo de oxígeno fue determinado para correlacionarlo con la producción de CO₂ y determinar si la adición de tolueno afecta el consumo de oxígeno. La cinética de consumo de oxígeno se muestra en la Fig. 7.5. En el caso del control y con la adición de 14 000 mg de tolueno/de kg de suelo, ver Fig. 7.5-A el oxígeno consumido fue un orden de magnitud mayor a los demás tratamientos con tolueno, ver Fig. 7.5-B. En ninguno de los tratamientos se alcanzo la fase estacionaria, pero cuando se adicionaron 221 000 mg de tolueno/kg de suelo el consumo de oxígeno se mantuvo en el nivel más bajo.

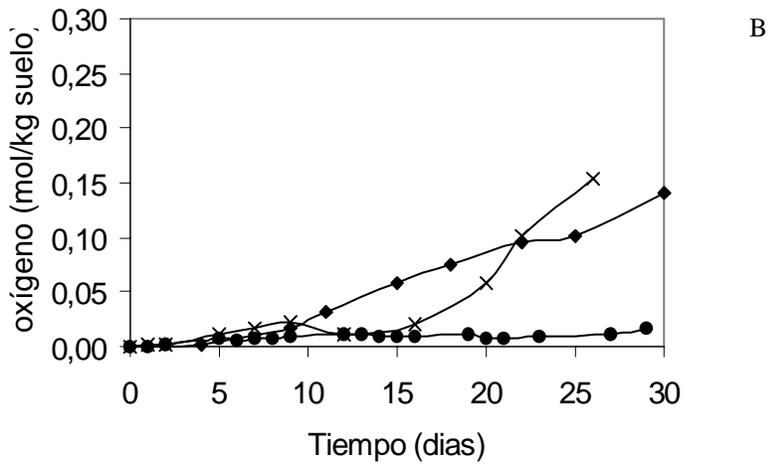
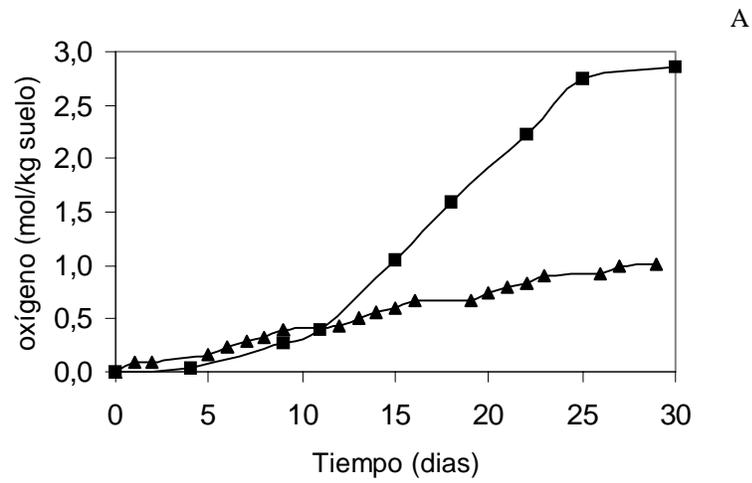


Fig. 7.5 Cinética de consumo de O_2 en presencia de tolueno: 14 000 (v), 86 000 (6), 144 000 (v) y 231 000 mg/kg de suelo (λ) y un control sin solvente (σ). El cultivo se efectuó en suspensión de suelo al nivel de microcosmos. Los datos representan la media de dos unidades experimentales diferentes. Para los duplicados la variación estuvo entre 0.15 y 14.7%.

Está misma repuesta se observó en la producción de CO_2 , incluso las cinéticas muestran una tendencia similar, por lo que se podría suponer que gran parte del oxígeno consumido fue utilizado para la oxidación de los hidrocarburos.

La velocidad de producción de O_2 (qO_2) fue estimada a partir de las cinéticas de consumo como la pendiente de un ajuste lineal de los datos experimentales con el objetivo de determinar si la adición de tolueno afecta el consumo de oxígeno. En la Fig. 7.6 se observa qO_2 muestra el mismo perfil que la qCO_2 , pero la tasa de consumo de oxígeno es mayor en el caso del control, prácticamente el doble, y la cuando se adicionaron 14 000 mg de tolueno/kg de la qO_2 fue cinco veces la qCO_2 determinada. En los demás tratamientos tanto el consumo de oxígeno como la producción de qCO_2 es del mismo orden.

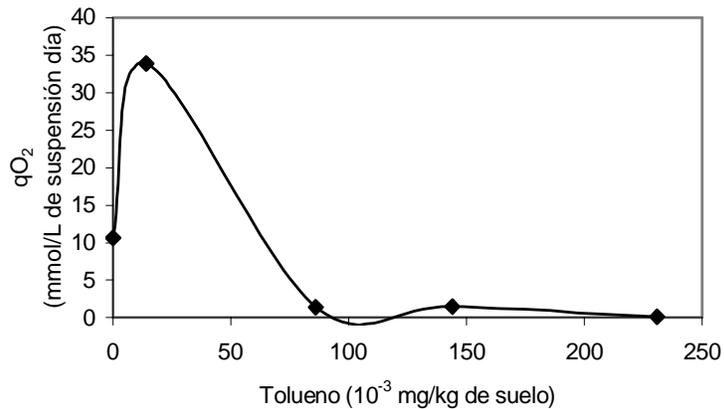


Fig. 7.6. Velocidad de consumo de oxígeno (qO_2) durante la degradación de hidrocarburos en función de la concentración inicial en un cultivo en suspensión de suelo en microcosmos.

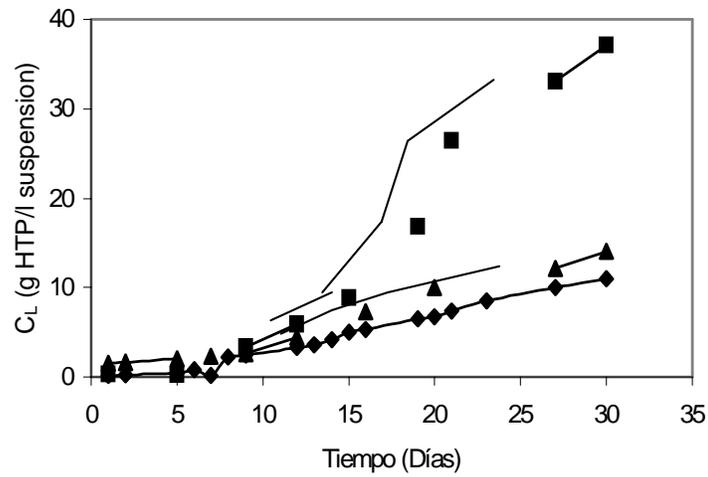
Estas diferencias observadas entre la qCO_2 y la qO_2 quizá puedan atribuirse al efecto de los HTP-tolueno que al estar en elevadas concentraciones en la fase líquida alteran las actividad microbiana.

7.1.4 Estimación del consumo de hidrocarburos en fase líquida

El consumo de hidrocarburos en la fase líquida se estimó con base en los resultados de la producción de CO_2 y los $Y_{\text{CO}_2/\text{HTP}}$ que se mostraron en la Tabla 7.1., los resultados se muestran en la Fig. 7.7. Se observa que la concentración de hidrocarburos en la fase líquida (C_L), en presencia de los microorganismos es mayor a la obtenida en los ensayos de desorción (véase Fig. 6.4.). Esto es factible por que al consumirse los hidrocarburos de la fase líquida se incrementa el gradiente de concentración entre el suelo y la fase líquida (Harms y Zehnder, 1995) permitiendo la utilización de hidrocarburos a tasas mayores que la de desorción abiótica (Tang y col. 1999). Cuando las concentraciones de tolueno fueron mayores a 144 000 mg/kg, de suelo se obtuvo el efecto contrario, la C_L es menor a la de desorción determinada para a la misma concentración de tolueno, es decir, quedó un exceso de hidrocarburos en la fase líquida.

Los resultados obtenidos sugieren que la mezcla HTP-tolueno tiene un efecto inhibitorio sobre la transformación de hidrocarburos y respiración microbiana. Para el intervalo de concentraciones de tolueno probado la mayor degradación se obtuvo con la adición de 14 000 mg/kg de suelo, consumiéndose $49\% \pm 8.05$ de los HTP en los 30 días de tratamiento, consumo que fue mayor al obtenido en el control sin solvente, 14.20 ± 3.63 . El patrón de consumo de hidrocarburos de la fase líquida sugirió que una vez consumidos los hidrocarburos se favorece el transporte desde el suelo, de manera que se consume una cantidad mayor a la liberada en condiciones abióticas.

A



B

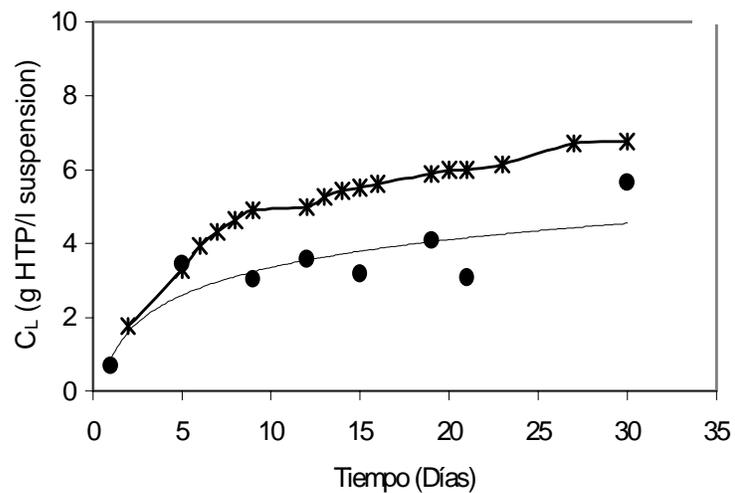


Fig. 7.7. Hidrocarburos consumidos en fase líquida (C_L) en cultivo en suspensión de suelo en presencia de tolueno (mg/kg de suelo): 14 000 (ν), 86 000 (σ), 144 000 (λ) y 231 000 (δ) y el control sin solvente (ν). La C_L se estimó a partir de las cinéticas de producción de CO_2 y el $Y_{\text{CO}_2/\text{HTP}}$.

La biodegradación no pueden explicarse de manera independiente de la desorción, según los resultados discutidos anteriormente. En el sistema utilizado, el consumo de hidrocarburos depende de la capacidad de biodegradación de los microorganismos y de la concentración del sustrato en la fase líquida. Esta concentración es determinada por la sorción, desorción y limitaciones en la transferencia de masa. El sistema resultante es muy complejo y es difícil, experimentalmente, distinguir los fenómenos que ocurren, por ejemplo: i) consumo de HTP y tolueno, ii) inhibición de la respiración e inhibición de la actividad de degradación o iii) transferencia de masa convectiva y limitaciones de la transferencia de masa difusiva. Debido a que estos fenómenos ocurren de manera simultánea y dependen del tiempo, se propuso un modelo para estudiarlos bajo un efecto mezclado. El modelo matemático propuesto permite estudiar de manera secuencial los fenómenos que suceden, separándose en términos independientes la desorción y la biodegradación-inhibición.

7.2. Modelamiento matemático

De acuerdo a los resultados de la sección 6.3.1. la desorción puede estar controlada por la adición de tolueno cuando no hay microorganismos. Sin embargo, en presencia de microorganismos se logran tasas de consumo mayores a las de la desorción abiótica (sección 7.1.1.). Por tanto no es fácil establecer condiciones en las cuales la desorción no es el paso que limita, ya que en altas concentraciones de tolueno se presenta un efecto inhibitorio y en bajas concentraciones el incremento de q_{HD} podría ser insuficiente. Dada la complejidad de los procesos para explicar la biodegradación de HTP en la fase líquida se planteó un modelo que

contempla la desorción/biodegradación simultánea de hidrocarburos. Este modelo permitió estimar los parámetros cinéticos k_m y k_i en presencia de tolueno. También se incluye un número adimensional que permite identificar el paso que limita la biodegradación (transferencia de masa o biodegradación) en cultivo de suelo en suspensión.

Primeramente se muestran las bases teóricas o suposiciones que sustentan el modelo, posteriormente el desarrollo del mismo y finalmente la predicción del consumo de hidrocarburos en la fase líquida.

7.2.1. Bases teóricas del modelo

Se supone que la fracción de hidrocarburos en la fase líquida es la única biodisponible para los microorganismos en la suspensión de suelo. Dicha fracción constituye una fase homogénea de HTP-tolueno. En consecuencia de sus propiedades hidrófobas, una gran proporción queda depositada sobre la superficie del suelo. La concentración de hidrocarburos en la superficie puede estimarse basándose en el coeficiente de partición respectivo, para después, establecer un balance que permita conocer el coeficiente de transferencia de masa de la interfase a la fase líquida. Para explicar el fenómeno se propone un modelo que se basa en las siguientes suposiciones:

- 1) El modelo se aplica a escala macroscópica, es decir, se toma como base de estudio un gramo de suelo.
- 2) Las partículas de suelo se suponen esféricas y homogéneas.

- 3) La difusión en los poros del suelo es de escasa importancia cuando se adiciona tolueno, según se discutió en la sección 6.3.3.
- 4) La concentración de hidrocarburos depositados en la superficie del suelo es directamente proporcional a la concentración de tolueno adicionada. Esta concentración puede estimarse con el coeficiente de partición.
- 5) El transporte de la superficie del suelo hacia la fase líquida está controlado por el coeficiente de transferencia k_L .
- 6) Los microorganismos consumen los hidrocarburos sólo en la fase líquida (Ghoshal y col. 1996), donde hidrocarburos se refiere a los HTP y al tolueno que no son diferenciables en la mezcla homogénea.
- 7) La cinética de biodegradación de hidrocarburos está descrita por la modificación de la ecuación de Michaelis Menten propuesta por Haldane, que caracteriza el consumo de compuestos potencialmente tóxicos a altas concentraciones (Alexander y Scow, 1989).

El balance de masa en estado transitorio que describe el cambio en la concentración de hidrocarburos en la fase líquida es:

$$\frac{\partial C_L}{\partial t} = -D_{eff} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C_L}{\partial r} \right) + k_L (C^* - C_L) - \frac{q_{CO_2}}{Y_{CO_2/HTP}} \frac{C_L}{k_m + C_L + \frac{C_L^2}{k_i}} \quad (7.1.)$$

Donde el primer término del lado derecho describe la difusión intrapartícula y el segundo término la entrada de hidrocarburos por transporte convectivo a la fase líquida. El último se refiere al consumo de hidrocarburos en la fase líquida. D_{eff} representa el transporte difusivo del centro de la partícula de suelo a la periferia, r es el radio de la partícula de suelo, k_L es el

coeficiente convectivo de transferencia de masa de la superficie del suelo a la fase líquida, C^* es la concentración de hidrocarburos depositados en la superficie del suelo y C_L la concentración de hidrocarburos en la fase líquida. k_m es la constante de Michaelis-Menten y k_i es la constante de inhibición. La biodegradación está expresada en términos de la producción de CO_2 porque las técnicas analíticas permiten mayor precisión en la medición de estos datos.

De acuerdo a la tercera suposición y a los resultados discutidos en 6.3.2., en presencia de tolueno, la difusión intrapartícula es despreciable, de manera que la ecuación (7.1) se simplifica obteniéndose:

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L (C^* - C_L) - \frac{qCO_2}{Y_{CO_2/HTP}} \frac{C_L}{k_m + C_L + \frac{C_L^2}{k_i}} \quad (7.2)$$

La concentración de hidrocarburos en la interfase C^* , fue relacionada con la concentración de tolueno adicionado, de acuerdo a la cuarta suposición, está dada por:

$$C^* = k_p C_T \quad (7.3)$$

Donde k_p es el coeficiente de partición de hidrocarburos en tolueno y C_T es la concentración inicial de tolueno adicionada. El coeficiente de partición fue estimado a partir de los datos de solubilidad de hidrocarburos, presentados en la sección 6.1.1. El coeficiente convectivo k_L fue estimado con la ec. (7.2) sin el término de inhibición, usando las curvas de desorción (sección 6.3.1.), descritas antes por:

$$C_L = \frac{C_1 t}{k_2 + t} \quad (7.4)$$

La ecuación (7.2) puede escribirse de manera adimensional si se define:

$$C = \frac{C_L}{C^*}, k = \frac{k_m}{C^*}, k_H = \frac{k_i}{C^*}, t' = \frac{t}{t_{\max}} \text{ y } k_T = k_L t_{\max}.$$

Donde C es la concentración de adimensional de hidrocarburos, k y k_H las constantes adimensionales de afinidad e inhibición respectivamente y t' es el tiempo adimensional.

Incluyendo estos términos en la ec. (7.2) ésta se escribe como:

$$\frac{1}{k_T} \frac{Dc}{dt'} = (1 - C) - Da \frac{C}{k + C + \frac{C^2}{k_H}} \quad (7.5)$$

Esta ecuación define al número adimensional de Damkhöler como:

$$Da = \frac{q_{CO_2}}{k_L C^* Y_{CO_2}/TPH} \quad (7.6)$$

El Da se define como la relación entre la máxima biodegradación y la máxima transferencia convectiva de masa entre la superficie del suelo y la fase líquida. El valor del Da indica control por transferencia de masa para valores mayores a la unidad y control por la reacción biológica para valores menores a la unidad (Ghoshal y col. 1996).

Basándose en las ecuaciones descritas se estimaron las constantes del modelo retomando parte de la información generada en los microcosmos.

CONCLUSIONES

8. Conclusiones

1. El tolueno se seleccionó entre otros solventes porque promueve la mayor desorción de HTP del suelo intemperizado, produciendo el extracto de hidrocarburos con la más alta proporción de asfaltenos y aromáticos.
2. La adición de tolueno en la desorción/biodegradación simultánea promovió el consumo de compuestos poliaromáticos, pero no hubo efecto sobre el consumo de compuestos alifáticos.
3. El consumo de compuestos alifáticos aparentemente no estuvo relacionado con la adición de los solventes, en todos los tratamientos se obtuvo la misma respuesta que en el control sin solvente.
4. Para el intervalo de concentraciones de tolueno probadas, la mayor degradación ocurrió con 14 000 mg/kg de suelo base seca, consumiéndose un 47% de HTP en los 30 días de tratamiento. Sin embargo, la transformación fue predominante.
5. El modelo de inhibición por sustrato acoplado a un sencillo mecanismo de desorción en estado transitorio permitió explicar el consumo de hidrocarburos en la fase líquida. Con dicho modelo se estimó una k_m y k_i igual a 57 y 490 mg HTP/l respectivamente, y el grupo adimensional de Damköhler. Este último da información sobre la relación entre la transferencia de masa de los hidrocarburos y el consumo de hidrocarburos en la fase líquida.
6. El escalamiento del proceso aunque es técnicamente factible, en el aspecto económico sería muy costoso por los requerimientos de energía y tratamientos adicionales requeridos para el suelo y fase líquida residual.

RECOMENDACIONES

9. Recomendaciones

Algunos de los aspectos que durante el trabajo de tesis no se cubrieron, por estar fuera de nuestros objetivos, pero que podrían ayudar a complementar la información generada en este trabajo son: (i) determinar el efecto del tolueno en el consumo de HTP, es decir, determinar si el tolueno es fuente de carbono o si promueve un cometabolismo. (ii) explicar el mecanismo de consumo de HTP en la fase líquida, esto es, si los microorganismos producen surfactantes o se adhieren a las gotas de HTP-tolueno para consumir los hidrocarburos. (iii) desarrollo de un modelo que permitan determinar si el consumo de HTP ocurre en fase sólida y en fase líquida. (iv) identificación de los metabolitos producidos cuando se adiciona tolueno y caracterización de la toxicidad de los compuestos residuales al tratamiento. (v) cinéticas de sorción/desorción del tolueno adicionado y relación con la desorción de los HTP. (vi) desarrollo de un modelo que explique el consumo de hidrocarburos en función de la sorción/desorción de tolueno y sorción/desorción de hidrocarburos. (vii) escalamiento del tratamiento de desorción/biodegradación simultánea a un reactor de laboratorio.

Por otra parte, se demostró que la adición de tolueno provoca una rápida y “abundante” liberación de hidrocarburos, dependiendo de la concentración de solvente adicionado. Esta cualidad podría servir para un tratamiento químico-biológico: (i) lavado del suelo con tolueno para extraer los hidrocarburos. (ii) tratamiento biológico de los compuestos residuales (composteo o fitorremediación) para minimizar la concentración de contaminantes y (iii)

recuperación del solvente de extracción y propuestas para reutilización o disposición de los hidrocarburos extraídos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

10. Referencias Bibliográficas

Al-Bashir, B.; Hawari, J.; Samson, R. y Leduc, R. Behavior of nitrogen-substituted naphthalenes in flooded soil-part II. Effect of bioavailability of biodegradation kinetics. *Water Res.* **1994**, *28*:1827-1833.

Alexander M. Biodegradation and bioremediation. Academic Press, USA, **1999**, pp. 128-129, 137.

Alexander M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*:4259-4264.

Alexander, M. y Scow, K. Kinetics of biodegradation in soil. En *reactions and movement of organic chemicals in soils*. Sawhney and Brown Eds.; Soil Science Society of America Inc. Wisconsin, USA, **1989**, pp. 243-269.

Alexander, R. y Alexander, M. Bioavailability of genotoxic compounds in soil. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*:1859-1593.

Altamirano, M. Determinación de la Estructura molecular de asfaltenos de crudo maya. *Boletín del Instituto Mexicano del Petróleo*, **1986**, *15*:32-45.

Alvarez, P. y Vogel, T. Substrate interactions of benzene, toluene, and *para*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *37*: 2981-2985.

Arocha, M.; Jackman, A. y McCoy, B. Adsorption kinetics of toluene on soil agglomerates: soil as a biporous sorbent. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*:1500-1507.

Atkinson, P. Fisicoquímica. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A. USA, 1986. pp. 902-903.

Birman, I. y Alexander, M. Optimizing biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *45*: 267-272.

Blackburn, J. y Hafker W. The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *TIBTECH.* 1993, *11*: 328 –333.

Boopathy, R. y Manning, J. Surfactant-enhanced bioremediation of soil contaminated with 2,4,6-trinitrotoluene in soil slurry reactors. *Water Environ. Res.* **1999**, *71*: 119-124

Bosma, T.; Middeldorp, P.; Schraa, G. y Zehnder, A. Mass transfers limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*: 248-252.

Carmichael, L.M.; Christman, R.F. y Pfaender, F.K. Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*: 126-132.

Cassidy, D. e Irvine R. Biological treatment of soil contaminated with diesel fuel using periodically operated slurry and solid phase reactors. *Wat. Sci. Tech.* **1997**, *35*:185–192.

Castaldi, F.J. Bio-slurry reaction system and process for hazardous waste treatment. USA Patent. **1993**, 5,232,596.

Catherine, A.P. y Luthy, R. Coal tars dissolution in water-miscible solvents: experimental evaluation. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*: 2831-2843.

Cerniglia, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation*, **1992**, *3*:351-368.

Collins, L. y Daugulis, A. Simultaneous biodegradation of benzene, toluene and *para*-xylene in a two-phase partitioning bioreactor: concept demonstration and practical application. *Biotechnol. Prog.* **1999**, *15*:74-80.

Cornelissen, G.; Van-Noort, P. Y Govers, H. Mechanisms of slow desorption of organic compounds from sediments: a study using model sorbents. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*:3124-3131.

Cresser, M.; Killham, K. y Edwards, T. Soil chemistry and its applications. Cambridge Environmental Chemistry Series. Cambridge University Press. **1993**, pp. 58.

Chang, N. y Alexander, M. Effects of soil properties on bioavailability and extraction of phenanthrene and antrazine sequestered in soil. *Chemosphere*, **2002**, 48:109-115.

Chung, N. y Alexander, M. Differences in sequestration and bioavailability of organic compounds aged in dissimilar soil. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32:855-860.

Diallo, M.; Cagin, T.; Faulon, J. y Goddard W. Thermodynamic properties of asphaltenes: a predictive approach based on computer assisted structure elucidation and atomistic simulations. En *Petroleum Science Series*, Yen T. y Chilingirian G., Eds.; Elsevier Science. Amsterdam, **2000**. pp. 103-127.

Dragun J. The soil chemistry of hazardous materials. Amherst Scientific Publishers. Massachusetts, **1998**, pp. 385-480.

Edwards, D.; Adeel, Z. y Luthy R. Distribution of nonionic surfactant and phenanthrene in a sediment/aqueous system. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28:1550-1560.

Efroymsen, R. y Alexander, M. Biodegradation by an *Athrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, 57:1441-1447.

Eweis, J.; Ergas, S.; Chang, D. y Schroeder E. Bioremediation principles. Mc-Graw Hill **1998**. pp. 57,129.

Fava, F. y Gioia, D. Soya lecithin effects on the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in an artificial contaminated soil. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 72:177-187.

Fenistein, D.; Barré, L.; Broseta, D.; Espinat, D.; Livet, A.; Roux, J. y Scarsella, M. Viscosimetric and neutron scattering study of asphaltene aggregates in mixed toluene/heptane solvents. *Langmuir*. **1998**, 14:1013-1020.

Fu, Ch.; Pfanstiel, S.; Gao, Ch.; Yan, X. y Govind, R. Studies on contaminant biodegradation in slurry, wafer, and compacted tube reactors. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30:743-750.

Fu, J. y Luthy, R. Effect of organic solvent on sorption of aromatic solutes onto soils. *J. Environ. Eng.* **1986**, *112*:346-366.

Fulton, A. Wand inductor for remediation of contaminated soil. **1996**. United State Patent. Patent number 5,545,801.

Gallegos, M.; Gómez, S.; González, C.; Montes de Oca, G.; Yañez, T.; Zermeño, E. y Gutiérrez-Rojas. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Water Sci. Technol.* **2000**, *42*: 377-384.

Geerdink, M.; Van Loosdrecht, M. y Luyben, K. Model for microbial degradation of nonpolar organic contaminants in soil slurry reactor. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*: 779-786.

Glasser, J.; Platt, J.; Dasini, M.; McCauley, P. y Krishnan, E. Evaluation on bench-scale slurry phase bioreactors for treatment of contaminated soils. *Proceedings of the 8 th Annual meeting of the air and waste management association*, Ohio. **1994**, p 24-37.

Ghoshal, S.; Ramaswami, A. y Luthy, R. Biodegradation of naphthalene from coal tar and heptamethylnonane in mixed batch systems. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*: 1282-1291.

Gray, M.; Dudas, M. y Pickard, M. Protocols to enhance biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil. *Biorem. J.* **2000**, *4*:249-257.

Guha, S. y Jaffé, P. Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *25*:485-489.

Hasset, J. y Wagne, L. The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. En *reactions and movement of organic chemicals in soils*. Sawhney and Brown Eds.; Soil Science Society of America Inc. Wisconsin, USA, **1989**, pp. 40-41.

1989),

Harms, H. y Bosma, T. Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1997**, *18*:97-105.

Harms, H. y Zhender, A. Bioavailability of sorbed 3-chlorodibenzofuran. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*:27-33.

Huertas M.; Duque E.; Marqués, S. y Ramos J. Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock. *Environ. Sci Technol.* **1998**, *64*:38-42.

Huertas M.; Duque E.; Molina L.; Mosqueda G.; Godoy P.; Christensen B.; Molin S. y Ramos, J. Tolerance to sudden organic solvents shock by soil bacteria and characterization of *Pseudomonas putida* strains isolated from polluted sites. *Environ. Sci Technol.* **2000**, *34*:3395-3400.

Huesemann M. y Moore K. Compositional Changes During Landfarming of weathered Michigan Crude Oil-contaminated soil. *J. Soil Contamination* **1993**, *2*: 245-264

Ik-Sung, A.; Ghiorse, W.; Leonard, W. y Shuler, M. Independent prediction of naphthalene transport and biodegradation in soil with a mathematical model. *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *65*:65-75.

Inoue, A. y Horikoshi, K. A *Pseudomonas* thrives in high concentration of toluene. *Nature.* **1989**, *338*:264-266.

Isken, S.; Derks, A.; Wolffs, P. y Bont, J. Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*: 2631-2635.

Jiménez, I. y Bartha, R. Solvent-augmented mineralization of pyrene by a *Mycobacterium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *31*:2311-2316.

Johnson, M. Growth of microbial cells on hydrocarbons. *Science.* **1967**, *155*:1515-1520.

Jonge, H.; Freijer, J.; Verstraten, J. y Westerveld, J. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*: 771-775.

Kelsey J.; Kottler B. y Alexander M. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*:214-217.

Kim H. Tan. Environmental soil science. Marcel Dekker Inc. USA. **1994**, pp.20-22,51-52,97 y 116.

Klecka, G. y Maier, W. Kinetics of microbial growth on pentachlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *49*:46-53.

Ladda, T.; y Lee, C. Cosolvent effects of alcohols on the Henry's law constant and aqueous solubility of tetrachloroethylene (PCE). *Chemosphere*, **2001**, *44*:1137-1143.

Laha, S. y Luthy, R.G. Effects of nonionic surfactants on the mineralization of phenanthrene in soil-water systems. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *11*: 1367-1380

Leahy, J. y Cowell, R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **1990**, *54*:305-315.

Lewis R. Site demonstration of slurry-phase biodegradation of PAH contaminated soil. *Air and Waste.* **1993**, *43*:503-508.

Liste, H. y Alexander, M. Butanol extraction to predict bioavailability of PAHs in soil. *Chemosphere*, **2002**, *46*:1011-1017.

Liu, Z.; Jacobson, A. y Luthy, R. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant system. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*:145-151.

Loser, C.; Hoffmann, P. y Zehndorf, A: Bioavailability of hydrocarbon during microbial remediation of a sandy soil. *Appl. Microbiol. Technol.* **1999**, *51*:105-111.

McMillen, S. y Gray, N. Biotreatment of exploration and production wastes. International "Health Safety and Environmental in Oil and Gas production" Society of Petroleum Engineers. Conference Proceedings. SPE 27135. **1994**, 373-381.

Metcalf, R. y Eddy, P. Wastewater engineering, McGraw-Hill, New York, **1991**, p. 78.

Mirpuri R.; Jones W. y Bryes J. Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, 53:535-546.

Montemagno, C. e Irvine, R. Biological remediation of contaminated soils at Los Angeles Air Force Base: facility design and engineering cost estimate. Environmental Assessment and information sciences division. Argonne National Laboratory. August **1990**

Moo-Yung M.; Shimuzu, T. y Whitworth, D. Hydrocarbons fermentation using *Candida lipolytica*. I: basic growth parameters for bath continuous culture condition. *Biotechnol. Bioeng.* **1971**, 13:7741-760.

Munro, D. y Daugulis, A. The use of an organic solvent and integrated fermentation for improved xenobiotic degradation. *Res. Environ. Biotechnol.* **1997**, 1:207-225.

Nam, K.; Chung, N. y Alexander, M. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32:3785-3789.

Nam, P.; Kapila, S.; Liu, Q.; Tumiatti, W.; Porciani, A. y Flanigan, V. Solvent extraction and tandem dechlorination for decontamination of soil. *Chemosphere*, **2001**, 43:485-491.

Nelson, D. y Sommers, L. Total carbon organic and organic matter. En *Methods of soil analysis. Part 2, Chemical and microbial properties*. Page, A.; Miller, R. y Keeny D. Eds. American Society of Agronomy, USA, **1987**, pp. 539.

Nkedi-kizza, P. Rao, P. y Hornsby A. Influence of organic cosolvents on leaching of hydrophobic organic chemicals trough soils. *Environ. Sci. Technol.* **1987**, 21:1107-1111.

OHM Remediation services Corp. Remediation case studies: bioremediation and vitrification vol. 5. Prepared by Member Agencies of the Federal Remediation Technologies Roundtable. July **1997**.

Parkerton, T.; Ston, M. y Letinski, D. Assessing the aquatic toxicity of complex hydrocarbon mixtures using solid phase microextraction. *Toxicol. Lett.* **2000**, 112-113:273-282.

Pierce G. System and method for biodegradation of compounds. USA Patent. **1997**, 5,688,685.

Pignatello, J. y Xang, B. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*:1-11.

Puskas, K.; Alwadi, N. y Abdullah, F. Remediation of oil-contaminated sandy soil in a slurry reactor. *Environ. Inter.* 1995, *31*: 413-420.

Ramaswami, A. y Luthy R. Mass transfer and bioavailability of PAH compounds in coal tar NAPL-Slurry systems 1. Model development. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*:2260-2267.

Reardon, K.; Mosteller, D. y Rogers B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*:385-400.

Riis, V.; Miethe, D. y Moder, M. Analytical characterization of the persistent residues after microbial degradation of mineral oils. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1996**, *356*:378- 384.

Riiser-Roberts, Remediation of petroleum contaminates soils. Lewis Publishers, Washington. **1997**, pp. 150.

Rijnaarts, H.M.; Bachmann, A.; Jumelet, J.C. y Zehnder, A.J. Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of α -hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. *Environ. Sci. Technol.* **1990**, *24*:1349-1354

Robertson, B. y Alexander, M. Mitigating toxicity to permit bioremediation of constituents of nonaqueous-phase liquids. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*:2066-2070.

Robinson, K.G.; Farmer, W.S. y Novak, J.T. Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. *Water Res.* **1990**, *24*: 345-350.

Salter, G. y Kell, D. Solvent selection for whole cell biotransformation in organic media. *Crit. Rev. Biotechnol.* **1995**, *15*:139-177.

Schawab, A.; Su, J.; Wetzel, S.; Pekarek, S. y Banks, M. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*:1940-1945.

Schmidt, S. Simkins, S. y Alexander, M. Models for the kinetic of biodegradation of organic compounds not supporting growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **1985**, *50*:323-331.

Sikkema, J.; Bont, M. y Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **1995**, *59*:201-222.

Srivastava, P.; Har, O.; Buchholz, R. y Worden. M. Enhancement of mass transfer using colloidal liquid aliphorns: measurement of mass transfer coefficients in liquid-liquid extraction. *Biotech. Bioeng.* **2000**, *70*:525-532.

Tabak, H.; Govind, R.; Fu, Ch.; Yan, X.; Gao, C. y Pfanstiel, S. Development of bioavailability and biokinetics determination methods for organic pollutants in soil to enhance in-situ and on-site bioremediation. *Biotechnol. Prog.* **1997**, *13*: 43-52.

Tang, J.; Liste, H. y Alexander, M. Chemical assays of bioavailability to earthworms of polycyclic hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, **2002**, *48*:35-42.

Tang, J.; Robertson, B. y Alexander, M. Chemical-extraction methods to estimate bioavailability of DDT, DDE, and DDD in soil. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*:4346-4351.

Tezak, J.; Miller, J.; Lawrence A.; Keffer, R. y Weightman, R. Bioremediation evaluation of surface soils contaminated with organic compounds. Society of Petroleum Engineers. Conference Proceedings. SPE 029195, **1994**, 345-353

Tissot, B. y Welte, D. El petróleo y su formación. CONACYT, **1982**, pp.380-411.

Villemur, R.; Déziel, E.; Benachenhou, A.; Marcoux, J.; Gauthier, E.; Lépine, F.; Beaudet, R. y Comeau, Y. Two liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*:966-972.

Volkering, F.; Breure, A.; Sterkenburg, A. y Van Andel, J. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *36*:548-552.

Weber, J.; Wedd, S. Y Best, J. Displacement of diquat from clays and its photo-toxicity. *J. Agric. Food Chem.* **1969**,*17*:1075-1076.

Zhao, X. y Voice, T. Assessment of bioavailability using a multicolumn system. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*:1506-1512.

ANEXOS

11. Anexos

11.1 Propiedades fisicoquímicas de los solventes

En las siguientes tablas se muestran algunas propiedades de los solventes usados

	Hexano C ₆ H ₁₄	Benceno C ₆ H ₆	Tolueno C ₇ H ₈
Peso molecular	86.18	78.11	92.14
Punto de ebullición (°C)	68.7	80.1	110.62
Presión de vapor (Torr a 20°C)	124	0.13	28.5
Densidad (g/ml a 25°C)	0.6594	0.8790	0.8669
Constante dieléctrica a 25°C	1.88	2.15	2.38
Momento dipolar (D a 25°C)	0.08	0.14	0.31
Índice de polaridad	0.1	3.1	2.4
Solubilidad en agua (% a 25°C)	0.014	0.018	0.052
Solubilidad de agua en (% a 25°C)	0.010	0.01	0.033
Log K _{ow}	3.50	2.13	2.48

	Butanol C ₄ H ₁₀ O	Acetona C ₃ H ₆ O	Metanol CH ₄ O
Peso molecular	74.12	58.08	32.04
Punto de ebullición (°C)	117.5	56.29	64.7
Presión de vapor (Torr a 20°C)	4.4	184.5	97
Densidad (g/ml a 25°C)	0.8097	0.7900	0.7913
Constante dieléctrica a 25°C	17.51	20.7	32.7
Momento dipolar (D a 25°C)	1.75	2.69	2.87
Índice de polaridad	3.9	5.1	5.1
Solubilidad en agua (% a 25°C)	7.81	Miscible en todas proporciones	Miscible en todas proporciones
Solubilidad de agua en (% a 25°C)	20.07 %	Miscible en todas proporciones	Miscible en todas proporciones
Log K _{ow}	0.88	0.23	-0.76

11.2 Análisis estadísticos de los ensayos de desorción

En el presente anexo se incluyen todos los análisis de varianza y comparación de medias mencionadas en los resultados.

Efecto del tipo de solvente sobre la desorción de HTP (mg/kg de suelo) en microcosmos

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: HTP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	218192,944	5	43638,589	324,183	0,000
Intercept	806026,722	1	806026,722	5987,817	0,000
SOL	218192,944	5	43638,589	324,183	0,000
Error	1615,333	12	134,611		
Total	1025835,000	18			
Corrected Total	219808,278	17			

a R Squared = ,993 (Adjusted R Squared = ,990)

Homogeneous Subsets
HTP: Tukey HSD

SOL	N	Subset				
		1	2	3	4	5
METANOL	3	66,666				
ACETONA	3		140,333			
HEXANO	3		158,000			
BUTANOL	3			201,333		
BENCENO	3				317,666	
TOLUENO	3					391,666
Sig.		1,000	,465	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 134,611.a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

b Alpha = ,05.

Comparación del contenido de compuestos alifáticos (mg/kg de suelo) en los ensayos de desorción

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: ALIF

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	12299,750	5	2459,950	59,877	0,000
Intercept	81180,750	1	81180,750	1976,002	0,000
SOLV	12299,750	5	2459,950	59,877	0,000
Error	246,500	6	41,083		
Total	93727,000	12			
Corrected Total	12546,250	11			

a R Squared = ,980 (Adjusted R Squared = ,964)

Homogeneous Subsets
ALIF: Tukey HSD

SOLV	N	Subset			
		1	2	3	4
METANOL	2	28,062			
ACETONA	2		71,500		
HEXANO	2		72,000		
BUTANOL	2		90,000	90,000	
BENCENO	2			98,000	
TOLUENO	2				114,000
Sig.		1,000	0,166	0,802	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 41,083.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b Alpha = ,05.

Comparación del contenido de compuestos aromáticos (mg/kg de suelo) de las pruebas de desorción

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: ARO

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6915,000	5	1383,000	23,914	0,001
Intercept	14700,000	1	14700,000	254,179	0,000
SOLV	6915,000	5	1383,000	23,914	0,001
Error	347,000	6	57,833		
Total	21962,000	12			
Corrected Total	7262,000	11			

a R Squared = ,952 (Adjusted R Squared = ,912)

ARO
Tukey HSD

SOLV	N	1	2	3
METANOL	2	7,500		
ACETONA	2	20,000	20,000	
BUTANOL	2	27,000	27,000	
HEXANO	2	29,000	29,000	
BENCENO	2		33,500	
TOLUENO	2			53,000
Sig.		0,178	0,132	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 57,833.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b Alpha = ,05.

Comparación del contenido de compuestos polares (mg/kg de suelo) en los ensayos de desorción con diferentes solventes

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: POL

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	236,000	5	47,200	25,745	0,001
Intercept	5547,000	1	5547,000	3025,636	0,000
SOLV	236,000	5	47,200	25,745	0,001
Error	11,000	6	1,833		
Total	5794,000	12			
Corrected Total	247,000	11			

a R Squared = ,955 (Adjusted R Squared = ,918)

POL
Tukey HSD

SOLV	N	Subset		
		1	2	3
METANOL	2	13,500		
BENCENO	2	18,500	18,500	
TOLUENO	2		22,000	22,000
ACETONA	2		23,000	23,000
HEXANO	2			25,000
BUTANOL	2			25,950
Sig.		0,068	0,102	0,068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 1,833.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b Alpha = ,05.

Comparación de la concentración de asfaltenos (mg/kg suelo) de las muestras de desorción en presencia de diferentes solventes

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: ASF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	104893,417	5	20978,683	1265,046	0,000
Intercept	93104,083	1	93104,083	5614,317	0,000
SOLV	104893,417	5	20978,683	1265,046	0,000
Error	99,500	6	16,583		
Total	198097,000	12			
Corrected Total	104992,917	11			

a R Squared = ,999 (Adjusted R Squared = ,998)

ASF
Tukey HSD

SOLV	N	Subset				
		1	2	3	4	5
HEXANO	2	2,500				
METANOL	2	9,000				
ACETONA	2		28,000			
BUTANOL	2			55,000		
BENCENO	2				195,500	
TOLUENO	2					198,000
Sig.		,628	1,000	1,000	1,000	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 16,583.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b Alpha = ,05.

11.3. Análisis estadísticos de los ensayos de desorción/biodegradación simultánea

En esta sección se incluyen los análisis de Varianza y comparación de medias de los ensayos de desorción/degradación.

Efecto del tipo de solvente sobre la desorción/biodegradación de HTP (mg/kg de suelo) en microcosmos

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: HTP

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3081,558	6	513,593	17,612	0,000
Intercept	12130,883	1	12130,883	415,982	0,000
SOL	3081,558	6	513,593	17,612	0,000
Error	349,945	12	29,162		
Total	16973,743	19			
Corrected Total	3431,502	18			

a R Squared = ,898 (Adjusted R Squared = ,847)

HTP
Tukey B

SOL	Subset		
	1	2	3
METANOL	3,7250		
BENCENO	11,033		
HEXANO		25,133	
CONTROL		28,600	
BUTANOL		30,433	30,433
ACETONA		36,466	36,466
TOLUENO			44,466

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 29,162.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,625.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = ,05.

Datos de alifáticos residuales (mg/Kg de suelo) en los tratamientos de desorción/biodegradación en presencia de diferentes solventes.

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: ALIF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1,691E-03	7	2,416E-04	8,421	0,004
Intercept	0,152	1	0,152	5311,685	0,000
TR	1,691E-03	7	2,416E-04	8,421	0,004
Error	2,296E-04	8	2,869E-05		
Total	0,154	16			
Corrected Total	1,921E-03	15			

a R Squared = ,881 (Adjusted R Squared = ,776)

ALIF
Tukey HSD

	N	Subset 1	2
TOLUENO	2	84,650	
ACETONA	2	90,800	
BUTANOL	2	91,150	
HEXANO	2	94,150	
METANOL	2	97,500	
INICIAL	2	100,250	100,250
BENCENO	2	101,050	101,050
CONTROL	2		121,250
Sig.		0,157	0,052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 2,869E-05.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b Alpha = ,05.

Datos de aromáticos residuales (mg/Kg e suelo) de los ensayos de desorción/biodegradación en presencia de diferentes solventes.

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: ARO

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	8,245E-04	7	1,178E-04	5,920	0,011
Intercept	2,049E-02	1	2,049E-02	1029,626	0,000
TR	8,245E-04	7	1,178E-04	5,920	0,011
Error	1,592E-04	8	1,990E-05		
Total	2,147E-02	16			
Corrected Total	9,837E-04	15			

a R Squared = ,838 (Adjusted R Squared = ,697)

ARO
Tukey HSD

	N	Subset	
		1	2
TOLUENO	2	23,450	
ACETONA	2	30,550	30,550
BENCENO	2	31,550	31,550
METANOL	2	33,150	33,150
BUTANOL	2	37,600	37,600
HEXANO	2	38,700	38,700
INICIAL	2		44,615
CONTROL	2		46,650
Sig.		0,099	0,078

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 1,990E-05.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b Alpha = ,05.

Datos de polares residuales (mg/Kg de suelo) de los ensayos de desorción/biodegradación en presencia de diferentes solventes.

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: POL

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7,737E-04	7	1,105E-04	6,959	0,007
Intercept	2,542E-02	1	2,542E-02	1600,901	0,000
TR	7,737E-04	7	1,105E-04	6,959	0,007
Error	1,270E-04	8	1,588E-05		
Total	2,633E-02	16			
Corrected Total	9,007E-04	15			

a R Squared = ,859 (Adjusted R Squared = ,736)

POL
Tukey HSD

	N	Subset 1	Subset 2
TOLUENO	2	32 900	
HEXANO	2	34 700	
ACETONA	2	35 400	
BUTANOL	2	35 900	
BENCENO	2	38 200	
METANOL	2	40 700	40 700
INICIAL	2	45 850	45 850
CONTROL	2		55 250
Sig.		0,123	0,074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 1,588E-05.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b Alpha = ,05.

Datos de asfaltenos residuales (mg/kg de suelo) de los ensayos de desorción/biodegradación en presencia de diferentes solventes

Tests of Between-Subjects Effects
Dependent Variable: ASF

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3,298E-04	7	4,711E-05	6,052	0,011
Intercept	7,855E-02	1	7,855E-02	10091,250	0,000
TR	3,298E-04	7	4,711E-05	6,052	0,011
Error	6,228E-05	8	7,784E-06		
Total	7,895E-02	16			
Corrected Total	3,920E-04	15			

a R Squared = ,841 (Adjusted R Squared = ,702)

ASF
Tukey HSD

	N	Subset 1	Subset 2
TOLUENO	2	62 300	
BUTANOL	2	68 050	68 050
ACETONA	2	68 100	68 100
CONTROL	2	68 150	68 150
INICIAL	2	69 300	69 300
METANOL	2	71 050	71 050
BENCENO	2		76 200
HEXANO	2		77 400
Sig.		0,143	0,108

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = 7,784E-06.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2,000.

b Alpha = ,05.

GLOSARIO

12. Glosario

HTP = Hidrocarburos totales del petróleo

HPA = Hidrocarburos poliaromáticos

FLNA = Fase líquida no acuosa

C_S = Compuesto sorbido

C_L = Compuesto en solución

BTX = Benceno, tolueno, xileno

K_{OW} = Coeficiente de partición octanol/agua

q_{HD} = Velocidad de desorción de HTP (mg/L suspensión día)

q_{HTP} = Velocidad de degradación de HTP (mg/L suspensión día)

q_{CO_2} = Velocidad de producción de CO_2 (mol/ L suspensión día)

q_{O_2} = Velocidad de consumo de CO_2 (mol/ L suspensión día)

$Y_{CO_2/HTP}$ = Rendimiento de CO_2 con respecto al HTP consumido (g_{CO_2}/g_{HTP})

Para las variables usadas en el modelo matemático:

C_L = Concentración de hidrocarburo en la fase líquida (mg HTP/L)

C_S = Concentración de hidrocarburo en la interfase (mg HTP/L)

k_L = Coeficiente convectivo de transferencia de masa (1/día)

K_m = Constante de Michaelis-Menten (mg HTP/L)

K_i = Constante de inhibición (mg HTP/L)

D_{eff} = Coeficiente de transporte difusivo

r = Radio de la partícula de suelo

k_p = Coeficiente de partición de hidrocarburos en tolueno (g HTP/g tolueno)

C_T = Concentración de tolueno adicionada (mg HTP/ kg de suelo)

Da = Grupo adimensional de Damkhöler

Producto derivado del trabajo derivado de la formación doctoral

García-Rivero, M.; Saucedo, C.G.; Flores H.S.; y Gutiérrez- Rojas M. Mass Transfer and Hydrocarbon Biodegradation of Aged Soil in Slurry Phase. *Biotechnology Progress*, 2002, 18:728-733.

Mayola García-Rivero. Effect of toluene in the biodegradation of hydrocarbon in aged soils. Poster Presentation. In the First International Conference of Petroleum Biotechnology: State of the art and perspectives. Instituto Mexicano del Petróleo, México D.F. Febrero 21-23, 2000.

Mass Transfer and Hydrocarbon Biodegradation of Aged Soil in Slurry Phase

M. García-Rivero, G. Saucedo-Castañeda, S. Flores De Hoyos,[†] and M. Gutiérrez-Rojas*

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco no. 186, Col. Vicentina, México 09340 D.F., México

Addition of toluene into slurry phase laboratory microcosm is proposed in order to increase desorption rate of hydrocarbons and as an alternative to improve bioavailability of hydrocarbon in aged soils. Our studies showed that toluene has a positive effect on desorption of total petroleum hydrocarbons (TPH). Addition of 14 000 mg toluene/kg of soil, in highly polluted soil, increased the consumption rate of hydrocarbons three times in comparison to control without solvent. In 30 days the initial TPH concentration in soil, 292 000 mg/kg, diminished 45%. Although toluene was able to dissolve complex organic compounds such as asphaltene fraction, it probably yielded a highly toxic toluene–hydrocarbons phase. The inhibitory effect of toluene–TPH was also studied. A substrate inhibition model was used: the k_m and k_i constants were 57 and 490 mg TPH/L liquid phase, respectively. Experimental data were well described when the proposed model included sequential desorption and biodegradation phenomena. Damköhler number evaluation showed that rate of mass transfer was the limiting step in overall biodegradation in nonsolvent control. When high concentration of toluene was added, then bioreaction was the limiting step, but inhibitory effect should be considered. However, toluene addition at low concentrations facilitates the biodegradation of aromatic compounds.

Introduction

The bioavailability of polluted soil compounds is strongly affected by a number of poorly understood phenomena. Among them the sorption of organic compounds onto mineral and organic matter surfaces, and micropores. When hydrocarbons remain in soil for some time, there is a time-dependent decline in bioavailability. This slow process, called aging, produces a decrement in the biodegradation rate or a complete resistance of molecules to microbial degradation. Trying to explain the desorption–biodegradation process by means of spiked compounds may mislead the analysis, since these do not behave as aging compounds do (1).

Since desorption is the limiting step in the hydrocarbon biodegradation (1), it is necessary to improve mass transfer. This can be done by means of slurry bioreactors. However, when the soil is rich in clay, stirring is not always enough to overcome intrinsic transport barriers. The clay fraction exhibits an extremely low transport rate for nonpolar contaminant (2). In this case, surfactants (3) or solvents (4) are used to increase the rate of desorption. However, some surfactants in laboratory experiments have not shown a positive result. This is due to the fact that at high concentrations they are toxic, which inhibits biodegradation (5). Furthermore, an excess of foam complicates the treatment in a bioreactor.

The application of solvents has been basically devoted to increasing the solubilization of hydrophobic compound

(6) but also for improving the biodegradation of pollutants in a nonaqueous phase liquid (NAPL) (7). The use of solvents to improve hydrocarbon biodegradation in a slurry reactor has not been widely explored. In a recent work (8), silicon oil was considered as solvent to improve biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in slurry system.

In this work is proposed the use of toluene to accelerate desorption. Even though toluene has been considered as highly toxic, today it is also known (9) that the dose–response effect of a solvent depends on its cell membrane concentration and not only on solvent chemical structure. An important characteristic of toluene is that it is an excellent solvent of polar and asphaltene compounds (10), which up to now have been considered as hardly biodegradable molecules.

It is generally observed that bioavailability is inversely related to the contaminant sorption in soil. Therefore, degradation rates are dependent on mass transfer rates of compound from the solid or soil-bound phase to the liquid phase (11). Kinetics of biotransformation of organic compounds can be explained by means of the mathematical concept of bioavailability. There are two approaches that have been applied: (i) bioavailability dimensionless group (12), which is the ratio of the mass transfer coefficient to the microbial specific affinity, which was applied to identified mass transfer limitation in the biotransformation of sorbed α -hexachlorocyclohexane; and (ii) Damköhler dimensionless group (13), which is the ratio of the biokinetic coefficient to the mass transfer rate coefficient between NAPL and liquid phase, which

* To whom correspondence should be addressed. Ph: 5804-6505. Fax 5804-6407. E-mail mgr@xanum.uam.mx.

[†] Instituto Mexicano del Petróleo Eje Central Lázaro Cárdenas 152, México 07730 D.F., México.

has been applied to determine mass transfer control in the biodegradation of naphthalene in coal tar.

Our hypothesis is that the Damköhler number could be used in the characterization of bioavailability of hydrocarbon pollutants in aged soil. The aim of this work was to improve the mass transfer rate between soil surface and liquid phase of hydrocarbons in aged soils by increasing hydrocarbon desorption rate thanks to toluene addition.

Desorption–Biodegradation Model. The hydrocarbon fraction in the liquid phase is supposed to be the one bioavailable in the slurry. Such fraction constitutes a stable and homogeneous phase of toluene and hydrocarbon itself. As a result of their hydrophobic properties, a great amount of this organic phase remains deposited over the soil surface. Hydrocarbon concentration on the soil surface can be estimated on the basis of a partition coefficient. A mass balance can be written to allow estimation of the convective mass transfer coefficient from the soil surface to the liquid phase. To explain this phenomenon a model based on the following assumptions is proposed:

(1) The model is considered to be suitable at a macroscopic level; 1 g of soil is taken as study base.

(2) In this model, the soil particle is assumed to be spherical and homogeneous. Since we experimentally observed that toluene additions resulted in a rapid TPH release to the liquid phase, we considered that intraparticle diffusion resistance should be negligible when toluene is added.

(3) The hydrocarbon deposited on the soil surface is directly related to the concentration of toluene added and can be experimentally estimated by the respective partition coefficient (see eq 3 below).

(4) The mass transport from the soil surface to the liquid phase is governed by the convective mass transfer coefficient.

(5) It is considered that hydrocarbon consumption occurs only in the liquid phase (13).

(6) The kinetic of hydrocarbon biodegradation can be written by the Haldane modification of the Michaelis–Menten model that characterizes the consumption of potentially toxic organic nutrient at high concentration (14).

The mass balance that describes the change in liquid-phase hydrocarbon concentration is

$$\frac{\partial C_L}{\partial t} = -D_{\text{eff}} \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) + k_L (C^* - C_L) - \frac{q\text{CO}_2}{Y_{\text{CO}_2/\text{TPH}}} \frac{C_L}{k_m + C_L + \frac{C_L^2}{k_i}} \quad (1)$$

where the first term on the right hand represents the intraparticle diffusive transport of hydrocarbon from the center of the solid to the periphery, and the second term represents the rate of hydrocarbons input to the liquid phase due to convective transport. The last one is the removal rate of bulk liquid phase due to biodegradation. D_{eff} represents the effective diffusion coefficient, k_L is the convective mass transfer coefficient from the soil surface to the liquid phase, C^* is the hydrocarbon saturated concentration deposited on the soil surface, and C_L is the hydrocarbon concentration in the bulk liquid phase. k_m is the Michaelis–Menten constant, and k_i is the respective inhibition constant in the Haldane approach. Since biodegradation rate is expressed in terms of CO_2 evolu-

tion, substrate consumption in the equation was evaluated from the CO_2 evolution rate ($q\text{CO}_2$). In this sense an experimental relationship between TPH and CO_2 was used.

According to the second assumption, if toluene is present eq 1 is simplified to

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L (C^* - C_L) - \frac{q\text{CO}_2}{Y_{\text{CO}_2/\text{TPH}}} \frac{C_L}{k_m + C_L + \frac{C_L^2}{k_i}} \quad (2)$$

Convective transport and biodegradation terms were independently evaluated. The first term on the right hand, desorption, was evaluated on studies under abiotic conditions, and the second term by performing desorption and biodegradation studies.

The hydrocarbon concentration on the soil surface, C^* , was directly related to the concentration of toluene added, according to the third supposition, and is given by

$$C^* = k_p C_T \quad (3)$$

where k_p is the partition coefficient of hydrocarbon in toluene, and C_T is the concentration of toluene added. The k_L coefficient can be estimated by eq 2 without the second term of biodegradation, using experimental desorption curves, described by

$$C_L = \frac{C_1 t}{k_2 + t} \quad (4)$$

where C_1 is the maximum desorbed hydrocarbon concentration to a certain toluene concentration, and k_2 is the time to which desorbed hydrocarbon halves the maximum reached desorbed concentration.

We can write eq 2 in dimensionless terms with

$$C = \frac{C_L}{C^*}, \quad k = \frac{k_m}{C^*}, \quad k_H = \frac{k_i}{C^*}, \quad t' = \frac{t}{t_{\text{max}}}, \quad k_T = k_L t_{\text{max}}$$

where C is a dimensionless hydrocarbon concentration, k and k_H are dimensionless affinity and inhibition constants, respectively, and t' is a dimensionless time. Including terms in eq 2 it can be written as

$$\frac{1}{k_T} \frac{dC}{dt'} = (1 - C) - Da \frac{C}{k + C + \frac{C^2}{k_H}} \quad (5)$$

Equation 5 defines the dimensionless Damköhler (Da) group as

$$Da = \frac{q\text{CO}_2}{k_L C^* Y_{\text{CO}_2/\text{TPH}}} \quad (6)$$

Da is defined as the ratio of the rate of maximum degradation to maximum convective mass transfer between soil surface and liquid phase and indicates mass transfer control for values greater than unity and bioreaction control for values less than unity.

Materials and Methods

Soil Sampling. The soil was obtained from a site next to a refinery in operation, located in the southeastern tropical region of Mexico. The site has been contaminated

for more than 40 years. During this time the hydrocarbons in the soil have been subjected to sorption-desorption as well as microbial metabolism. The soil samples were taken from a depth not greater than 50 cm. Before being treated, the soil was air-dried and passed through 8–10 mesh. The soil samples were kept in closed bottles at room temperature.

Microorganisms. The microbial consortium used was isolated from the rhizosphere of a native plant (*Cyperus laxus* Lam) that naturally grew in the contaminated site (15). Isolated population was subcultured in liquid medium with 6 000 mg/L of soil hydrocarbon extract without asphaltene as the only carbon source. Microorganisms were stored at -20°C in glycerol. The consortium was grown while shaking at 150 rpm at 30°C for 5 days in the same medium as the one used when incubating.

Culture Media. The medium consisted of (g/L): NaNO_3 , 3.0; KH_2PO_4 , 1.0; KCl, 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25; and 2 mL of mineral solution. The pH of the medium was adjusted to 6.5. The mineral solution consisted of (% w/v): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.015; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.161; and $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.008.

Abiotic Hydrocarbons Desorption Experiments. Desorption abiotic assays were performed in 165-mL serological bottles assembled with Teflon-lined caps. The bottles contained 9 g of dried soil, 30 mL of mineral medium, 0.1% (p/v) of sodium azide (to inhibit microbial growth), and 14 000, 86 000, 144 000, or 230 000 mg of toluene per kg of soil. They were incubated at 30°C on a rotatory shaker at 150 rpm. A 24 h desorption kinetic was used to determine the initial (0–6 h) hydrocarbon desorption rate (HDR) by fitting data to eq 4. HDR was expressed as mg TPH desorbed/day kg soil.

Biodegradation Experiments. To study degradation rate four initial toluene concentrations were selected: 14 000, 86 000, 144 000, and 230 000 mg/kg of soil. The assays were performed in 165-mL serological bottles assembled with Teflon Mininert valves. The bottles contained 9 g of dried soil, 30 mL of mineral medium, and 10% (v/v) precultured microorganisms. Duplicated bottles were incubated at 30°C in a rotatory shaker at 150 rpm. The CO_2 evolution was followed by gas chromatography with a gas chromatograph (Gow-Mac series 580) with a thermal conductivity detector. During the experiment, residual TPH was determined (results not shown) and concentrations at start and end of assays were used to evaluate degradation after 30 days run.

Hydrocarbon Analysis. For desorption samples the solid phase was discarded by filtration and the hydrocarbons in the liquid phase were extracted with a separation funnel with carbon tetrachloride. To eliminate residual toluene, biodegradation samples were air-dried in Petri dishes at room temperature for 24 h. The total remaining hydrocarbons were extracted by Soxhlet extraction with hexane/acetone (1:1 v/v). The solvent mixture was removed by means of a vacuum rotatory evaporator at 45°C , and the extract was air-dried for 24 h to eliminate residual solvent.

Both remaining and desorbed hydrocarbons were determined as TPH by means of a Perkin Elmer 200 FT-IR spectrophotometer. The absorption was determined in the range of 3 300 and $2\,500\text{ cm}^{-1}$, using carbon tetrachloride (CTC) as a solvent. TPH concentration was determined by means of standard curve of mg of TPH/L of CTC vs absorption.

Hydrocarbon Fractionating. Hydrocarbon extract was fractionated into saturates, aromatics, and polar compounds in a silica gel (60–200 mesh) column. Separation was accomplished by successive elution with

n-hexane (saturates), benzene (aromatics), and acetone/methanol 1:1 (polar compounds). The asphaltene fraction was previously removed with *n*-pentane.

Biodegradation Model. The TPH deposited on the soil surface as a result of toluene addition was estimated by considering that toluene is distributed in the liquid phase (540 mg/L) and through the headspace (115 mg/L). The 90% residual solvent was quickly absorbed (16), and it is the toluene fraction that is in contact with hydrocarbons. The partition coefficient k_p in eq 3 was experimentally determined from hydrocarbon dissolution assays, and 0.65 g TPH/g toluene was obtained. From the desorption curves C_1 and k_2 constants were estimated with eq 4 by minimizing the sum of squares of errors between the calculated and the measured C_L values with Microsoft Excel Solver, which uses nonlinear optimization code (GRG2). k_L was estimated with eq 2, including only the term of transport and by deriving eq 4, using the method described above.

The kinetic parameters k_m and k_i were estimated by integrating eq 5; the following conditions were set for solving equations:

$$\text{if } t' = \frac{1}{t_{\max}}, \quad \text{then } C = \frac{C_{\text{eq}}}{C^*}$$

where C_{eq} is hydrocarbon liquid-phase concentration at 24 h. For $C_L < C^*$:

$$\text{if } t' = \frac{t}{t_{\max}}, \quad \text{then } C = \frac{C_L}{C^*}$$

For 14 000 ppm of toluene we considered a model without inhibition and then k_m and Da were estimated by minimizing the sum of squares of errors between the calculated and the measured C_L values with method described above. For toluene concentrations greater than 14 000 ppm, the k_i and Da were estimated by the procedure described above using k_m previously estimated.

Results

Characterization of Soil and Pollutants. The texture analyses indicated that soil contained (by weight) 53.84% sand, 33.12% silt, and 13.04% clay. The organic matter content was 3.90%, and the pH was 3.88. Initial TPH concentration of the samples was 292 000 mg/kg of dry soil, where 31% was saturated compounds, 22% was aromatic, and 14% was polar compounds, and the remaining 33% corresponded to asphaltene.

Abiotic Desorption of TPH. The desorption curves in the presence of toluene at all tested concentrations follow the same pattern shown in Figure 1: desorption curves show a rapid desorption phase followed by a second phase of slow desorption. However, when toluene concentration increased the rapid desorption phase was extended as well as required time to achieve equilibrium. After 24 h the equilibrium was not achieved in all cases. Figure 2 shows HDR as a function of toluene concentration. Three intervals are distinguished: the first one for concentrations lower than 86 000 mg/kg, where HDR slightly changes from 169 to 555 mg TPH/kg. From that point on, in the second phase, HDR increases monotonically. In last phase, around 173 000 mg toluene/kg, HDR increases significantly.

Biodegradation of Hydrocarbons. The hydrocarbon consumption rate (q_{TPH}) and HDR as a function of toluene concentration are shown in Figure 2. The highest q_{TPH} is obtained with 14 000 mg toluene/kg, which is located in

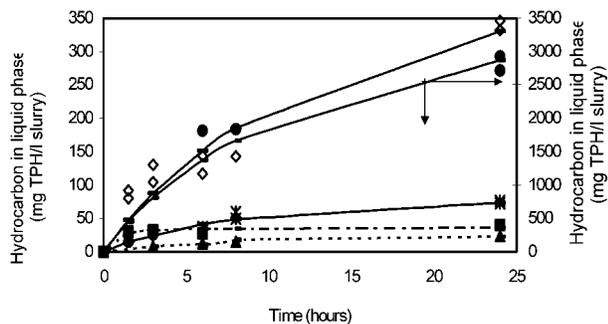


Figure 1. Desorption kinetic of hydrocarbon from soil slurries in the presence of toluene. TPH concentrations were determined only in liquid phase. Measured data are represented by symbols and fitted data by lines. Fitted data were obtained by nonlinear regression. Data are the average of duplicates. Variations were between 2.1% and 50.6% between duplicate values. Toluene (mg/kg of soil): (■) 14 000, (*) 86 000, (◆) 144 000, (●) 231 000, and (▲) nonsolvent control.

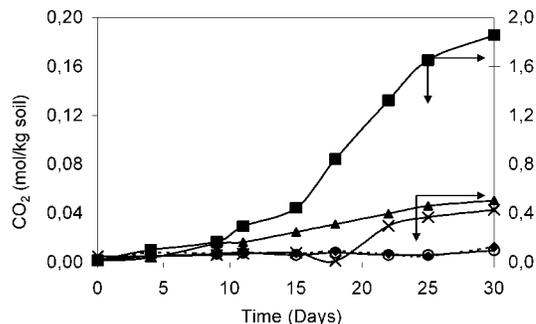


Figure 3. Carbon dioxide evolution from TPH in the presence of 14 000 (■), 86 000 (×), 144 000 (◆), and 231 000 mg toluene/kg of soil (○) and nonsolvent control (▲) in slurry system. Values are the average of two independent duplicated assays. Variations were 0.1 and 2.22% between duplicate values.

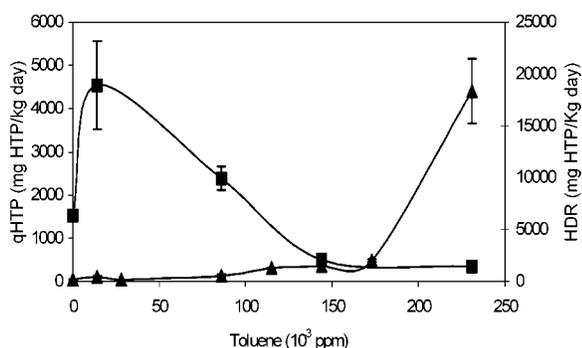


Figure 2. Hydrocarbon desorption rate, HDR (▲), and consumption rate of hydrocarbons, q_{TPH} (■), in the presence of toluene in slurry system. Data are the average of duplicates.

slow desorption zone. With increasing toluene concentration, a clear decrement was observed. The minimum values of q_{TPH} were presented in the area of rapid desorption where the toluene-TPH excess could cause a toxic effect.

The degree of biodegradation of TPH was determined in 30-day cultures (Table 1). Addition of 14 000 mg toluene/kg improves degradation, consuming up to 45% of initial TPH. Higher toluene concentrations did not improve degradation.

The biodegraded TPH samples were fractionated by column chromatography. As shown in Table 1, asphaltene fraction was not degraded as was expected. Aliphatic hydrocarbons were degraded to the same extent for nonsolvent control and when 14 000 mg/kg of toluene was added. Aromatic fraction was degraded to a greater extent when 14 000 mg of toluene/kg was added.

Figure 3 shows CO_2 evolution from assayed toluene concentrations during a 30-day incubation. In the absence of toluene 0.5 mol CO_2 /kg soil were totally produced. When 14 000 mg toluene/kg soil was added, CO_2 produc-

tion was 1.9 mol/kg soil. The proportional increase in CO_2 production suggested that hydrocarbon mineralization took place, and not only transformation. Unfortunately for higher concentrations of toluene the CO_2 evolved was lower than that produced in the control case, suggesting a strongly inhibitory effect of the toluene-TPH organic phase dispersed into liquid phase.

Biodegradation Model. The k_m and k_i constants were 57 ± 8.5 and 490 ± 29.5 mg TPH/L, respectively, in liquid phase from desorption and biodegradation experiments. k_L has an average value of $0.157/\text{day} \pm 0.039$ obtained from desorption-only assays. Table 2 shows the estimated parameters for the initial toluene concentrations tested. Estimated Da values indicate limitations due to transport in the absence of the solvent and with 86 000 mg toluene/kg. With toluene addition greater than 86 000 mg/kg, Da is less than 1, which indicates limitations in the biological reaction. Nevertheless, in this case the inhibitory effect of toluene-TPH should be considered.

Predictions of hydrocarbon consumption on liquid phase are shown in Figure 4. The experimental data were estimated by using $Y_{CO_2/TPH}$ and CO_2 evolution. Good agreement was found between experimental and fitted data when $C_L < C^*$ for 14 000 mg toluene/kg, otherwise the model was applied for all experimental data, also resulting in good fit.

Discussion

Desorption of TPH. The three phases observed in HDR experiments could be explained according to the following. Toluene is an excellent solvent for asphaltenes and polar compounds (10), which when released remain over the soil surface due to their hydrophobic character. At initial concentrations close to 86 000 mg/kg, toluene was found as a phase dispersed into droplets. Hence hydrocarbon partition was preferentially toward the soil. At concentrations higher than 173 000 mg/kg, when a NAPL was present, partition of hydrocarbons was toward the organic phase (17), increasing the hydrocarbon desorption.

Table 1. Effect of Toluene Concentrations on Biodegradation of TPH and Hydrocarbon Composition after 30 Days of Culture^a

C_T (mg/kg)	TPH ^b (%)	saturation ^c 95 520	aromatics ^c 64 240	polars ^c 40 880	asphaltenes ^c 96 360
0	13.5 ± 3.6	71 000 ± 1000	47 000 ± 2000	55 000 ± 3000	68 000 ± 1000
14 000	45.5 ± 8.0	84 000 ± 1000	24 000 ± 3000	34 000 ± 2000	61 000 ± 3000
86 000	14.5 ± 4.9	nd	nd	nd	nd
144 000	4.5 ± 2.2	nd	nd	nd	nd
230 000	3.9 ± 1.2	105 000 ± 7071	42 500 ± 6334	83 500 ± 2121	47 500 ± 6364

^a Concentrations at the end of the culture in mg of fraction per kg of dry soil. ^b Degradation. Values are the mean of two measurements. ^c Concentrations at the start of the culture in mg of fraction per kg of dry soil. nd: not determined.

Table 2. Kinetic Parameters for Estimating Damkhöler Number

C_T (mg toluene/kg)	$Y_{CO_2/TPH}^a$ (g/g TPH)	$q_{CO_2}^b$ (mmol CO ₂ /kgday)	Da^c (R^2)
0	0.61	5.4	$\gg 1$
14 000	0.66	6.8	2.88 (0.967)
86 000	0.04	1.4	37.7 (0.948)
144 000	0.06	0.4	0.26 (0.721)
231 000	0.04	0.5	0.02 (0.916)

^a CO₂ yield. Estimated from CO₂ evolved and TPH consumed in 30 days. Values are the mean of two measurements, observed variations between 10% and 25%. ^b Maximum CO₂ production. Estimated from CO₂ evolution kinetics. Values are the mean of two measurements, observed variations between 7.5% and 34%. ^c Dimensionless Damkhöler group. Estimated as parameter from the desorption-biodegradation model.

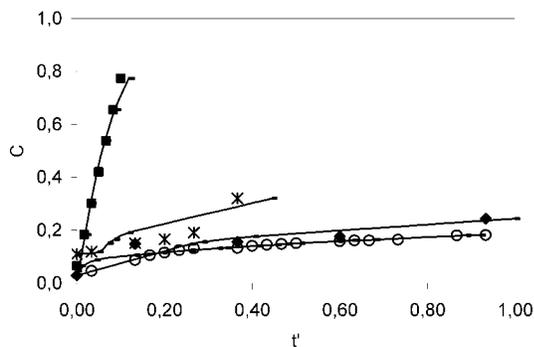


Figure 4. Dimensionless hydrocarbon concentration in liquid phase (C) during dimensionless biodegradation time (t) in the presence of toluene in slurry system. Measured data are represented by symbols and fitted data by lines. Data were fitted by desorption/biodegradation model. The values of R^2 are given in Table 2. Toluene (mg/kg of soil): (■) 14 000, (*) 86 000, (◆) 144 000, and (○) 231 000. Nonsolvent control was not included because in the absence of toluene C becomes an undetermined variable because C^* is zero.

Degradation of Hydrocarbons. In the absence of the solvent HDR was 10 times lower than consumption rate estimated in the same conditions. This indicates that the microbial population was capable of using the compounds as soon as they were available and that desorption rate was the limiting step (J). When 14 000 mg toluene/kg was added, q_{TPH} increased three times. The remarkable increase in q_{TPH} , which was greater than the observed HDR, suggested a high consortium degradation capacity to consume the hydrocarbon in the toluene-TPH droplets formed. When microorganisms consumed hydrocarbons from the liquid phase, the gradient between C^* and C_L increased, enhancing the hydrocarbon transport, and then it was possible to obtain a q_{TPH} value higher than those estimated for HDR.

The consumption of aliphatic compounds was independent of toluene addition. Probably bioavailability of this fraction was higher than aromatic compounds. Toluene could stimulate the degradation of other aromatic compounds (18) so that an improving consortium degrading capacity was observed when 14 000 mg toluene/kg was added.

For toluene concentrations higher than 14 000 mg/kg, q_{TPH} did not increase. This could be explained by regarding two aspects: (i) toluene-TPH inherent toxicity (19) and (ii) a low bioavailability since larger toluene-TPH droplets could be formed (20).

On the other hand, CO₂ evolution in nonsolvent control may be attributed to the consumption of organic matter in soil and, to a lesser extent, to the hydrocarbon consumption. When 14 000 mg toluene/kg was added,

CO₂ evolution was proportional to hydrocarbon consumption. $Y_{CO_2/TPH}$ estimated values were similar to those of different aliphatic hydrocarbons reported (21), even in the presence of lower toluene concentrations.

Biodegradation Model. k_L was not dependent on toluene concentration. In fact, the estimated value was an average of k_L obtained for each toluene concentration used, including nonsolvent control. The k_L was three times the one reported by Rijnaarts et al. (22) for aging α -hexachlorocyclohexane in a system using 250-mL glass bottles containing 115 mL of slurry at 8 rpm. k_m for toluene-TPH was higher than that determined for nitrogen-substituted naphthalenes (23) or phenol in a slurry system (24) but comparable to the one determined for toluene (25). The k_i value is higher than other values reported (26) for toluene. The k_i suggested that addition of 14 000 mg toluene/kg could be inhibitory. We draw the following conclusion from these results: Even though toluene addition is able to dissolve complex organic hydrocarbons, it forms a toluene-hydrocarbons phase that is highly toxic. The inhibitory effect of toluene-TPH limits toluene's practical application.

In our work, Da indicated that in the absence of solvent there was mass transfer limitation. The presence of solvent overcomes transfer limitations, and therefore improving microbial degrading capacities will not lead to higher biotransformation rates because the mass transference is the limiting step. However, the inhibitory effect of toluene-TPH should be considered in the decrease of Da when greater toluene concentrations were added. In the case of naphthalene (13) addition of heptamethylnonane (HMN) shows the same response: mass transfer is relatively rapid and does not limit biodegradation when coal tar is dispersed in HMN.

The data in the system are well described by the proposed inhibition model involving sequential desorption and biodegradation restricted to the liquid phase. Toluene addition allows TPH to remain deposited on the outer layer of the soil particle, where it may be more bioavailable. Furthermore, toluene addition at low concentrations facilitates the biodegradation of aromatic compounds. The proposed model could be used to estimate the optimum solvent concentration that may lead to the maximum degradation rate in slurry phase of aged soil.

We think is necessary to analyze the in-depth phenomena by characterizing one by one all steps we supposed are occurring when microorganisms and toluene are added. Unfortunately, the resulting system was quite complex to experimentally distinguish, for example, between (i) toluene and TPH, (ii) CO₂ from organic matter and from toluene or from TPH, (iii) respiratory inhibition and biodegradation activity inhibition, and (iv) mass convective transfer and mass diffusive transfer limitations. Since all phenomena occurred simultaneously and changed with respect to the time, an attempt to discuss under a mixed effect was done. That is why we successfully used a mathematical approach. In the inhibition model the mass transfer or TPH desorption contribution of toluene is clearly separated, as an independent term, from that term that takes into consideration the biodegradation-inhibition per se. These sequential events can be seen as a differential equation that, when solved, will give a sustained idea of what is happening into the experimental system. The proposed model is a suitable approach for marginally biodegradable organics in soil, an attempt to cope with the problem of oil-spilled soils or soil contaminated with petroleum hydrocarbons.

Acknowledgment

Part of this work was supported by The Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) and by the Mexican Institute of Petroleum (IMP FIES-96F-48-VI).

References and Notes

- (1) Carmichael, L. M.; Christman, R. F.; Pfaender, F. K. Desorption and mineralization of kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 126–132.
- (2) Geerdink, M.; Van Loosdrecht, M.; Luyben, K. Model for microbial degradation of nonpolar organic contaminants in soil slurry reactor. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 779–786.
- (3) Boopathy, R.; Manning, J. Surfactant-enhanced bioremediation of soil contaminated with 2,4,6-trinitrotoluene in soil slurry reactors. *Water Environ. Res.* **1999**, *71*, 119–124.
- (4) Castaldi, F. J. Bio-slurry reaction system and process for hazardous waste treatment. U.S. Patent 5,232,596, 1993.
- (5) Laha, S.; Luthy, R. G. Effects of nonionic surfactants on the mineralization of phenanthrene in soil–water systems. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, *11*, 1367–1380.
- (6) Catherine, A. P.; Luthy, R. Coal tars dissolution in water-miscible solvents: experimental evaluation. *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*(13), 2831–2843.
- (7) Birman, I.; Alexander, M. Optimizing biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *45*, 267–272.
- (8) Villemur, R.; Déziel, E.; Benachenhou, A.; Marcoux, J.; Gauthier, E.; Lépine, F.; Beaudet, R.; Comeau, Y. Two liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Biotechnol. Prog.* **2000**, *16*, 966–972.
- (9) Isken, S.; Derks, A.; Wolfs, P.; Bont, J. Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 2631–2635.
- (10) Fenistein, D.; Barré, L.; Broseta, D.; Espinat, D.; Livet, A.; Roux, J.; Scarsella, M. Viscosimetric and neutron scattering study of asphaltene aggregates in mixed toluene/heptane solvents. *Langmuir* **1998**, *14*, 1013–1020.
- (11) Volkering, F.; Breure, A.; Sterkenburg, A.; Van An del, J. Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1992**, *36*, 548–552.
- (12) Bosma, T.; Middeldorp, P.; Schraa, G.; Zehnder, A. Mass transfers limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 248–252.
- (13) Ghoshal, S.; Ramaswami, A.; Luthy, R. Biodegradation of naphthalene from coal tar and heptamethylnonane in mixed batch systems. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 1282–1291.
- (14) Alexander, M.; Scow, K. Kinetics of biodegradation in soil. In *Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils*. Sawhney and Brown, Eds.; Soil Science Society of America Inc.: Wisconsin, 1989; pp 243–269.
- (15) Gallegos, M.; Gómez, S.; González, C.; Montes de Oca, G.; Yañes, T.; Zermeño, E.; Gutiérrez, R. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Water Sci. Technol.* **2000**, *42*, 377–384.
- (16) Robinson, K. G.; Farmer, W. S.; Novak, J. T. Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. *Water Res.* **1990**, *24*, 345–350.
- (17) Jonge, H.; Freijer, J.; Verstraten, J.; Westerveld, J. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 771–775.
- (18) Alvarez, P.; Vogel, T. Substrate interactions of benzene, toluene, and *p*-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *37*, 2981–2985.
- (19) Huertas M.; Duque E.; Molina L.; Mosqueda G.; Godoy P.; Christensen B.; Molin S.; Ramos, J. Tolerance to sudden organic solvents shock by soil bacteria and characterization of *Pseudomonas putida* strains isolated from polluted sites. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 3395–3400.
- (20) Moo-Yung M.; Shimuzu, T.; Whitworth, D. Hydrocarbons fermentation using *Candida lipolytica*. I: Basic growth parameters for bath continuous culture condition. *Biotechnol. Bioeng.* **1971**, *13*, 7741–760.
- (21) Johnson, M. Growth of microbial cells on hydrocarbons. *Science* **1967**, *155*, 1515–1520.
- (22) Rijnaarts, H. M.; Bachmann, A.; Jumelet, J. C.; Zehnder, A. J. Effect of desorption and intraparticle mass transfer on the aerobic biomineralization of α -hexachlorocyclohexane in a contaminated calcareous soil. *Environ. Sci. Technol.* **1990**, *24*, 1349–1354.
- (23) Al-Bashir, B.; Hawari, J.; Samsom, R.; Leduc, R. Behavior of nitrogen-substituted naphthalenes in flooded soil-part II. Effect of bioavailability of biodegradation kinetics. *Water Res.* **1994**, *28*, 1827–1833.
- (24) Chunsheng, F.; Pfanstiel, S.; Gao, Ch.; Yan, X.; Govind, R. Studies on contaminant biodegradation in slurry, wafer, and compacted tube reactors. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 0, 743–750.
- (25) Reardon, K.; Mosteller, D.; Rogers, B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene, and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *69*, 385–400.
- (26) Mirpuri, R.; Jones, W.; Bryes, J. Toluene degradation kinetics for planktonic and biofilm-grown cells of *Pseudomonas putida* 54G. *Biotechnol. Bioeng.* **1997**, *53*, 535–546.

Accepted for publication June 5, 2002.

BP020288R