

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



**ESTUDIO DE LA ESTIMULACIÓN BIOLÓGICA PARA EL TRATAMIENTO
DE RESIDUOS DE PERFORACIÓN PETROLERA EMPLEANDO
LISÍMETROS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

BIÓL. ROBERTO RAFAEL RÍOS VÁZQUEZ

Director de tesis: Dr. Luis Carlos Fernández Linares

México D.F.

Mayo 2005

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana
está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y
además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el número de registro
0471-0

Iztapalapa, D.F. a 4 de Mayo del 2005

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

ESTUDIO DE LA ESTIMULACIÓN BIOLÓGICA PARA EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS DE PERFORACIÓN PETROLERA EMPLEANDO LISÍMETROS

que presentó

ROBERTO RAFAEL RÍOS VÁZQUEZ

COMITÉ TUTORIAL

Director: Dr. Luis Carlos Fernández Linares
Instituto Mexicano del Petróleo

Asesor. Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Asesor: Dra. Norma G. Rojas Avelízapa
Instituto Mexicano del Petróleo

JURADO:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres _____
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral _____
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Vocal: Dra. Tania Volke Sepúlveda _____
Instituto Nacional de Ecología

Vocal: Dra. Norma G. Rojas Avelizapa _____
Instituto Mexicano del Petróleo

Este trabajo se realizó en el Programa de Biotecnología del Petróleo
dentro del Proyecto D.00023 “Atenuación Natural de Sitios
Contaminados con Hidrocarburos” del Instituto Mexicano del Petróleo
bajo la dirección del Dr. Luis Carlos Fernández Linares

Agradecimientos

Agradezco el apoyo económico otorgado por el **Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, así como al **Instituto Mexicano del Petróleo (IMP)**.

Al **Dr. Luis Fernández** por su asesoría y dirección en este trabajo.

Un agradecimiento especial al **M. en I. Héctor Zegarra** por el apoyo que me brindó en todos los aspectos y que fue indispensable para la realización de este trabajo.

Al **Dr. Octavio Loera** por su amistad, enseñanza y dirección en mi formación profesional.

A los profesores **Dr. Ernesto Favela, Dra. Norma Rojas y Dra. Tania Volke** por la revisión de este trabajo y acertados comentarios.

A **Marlen Valdéz, Sara Montaña y Jesús Reyes** por su amistad y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al **Téc. Gustavo Navarrete** por su apoyo técnico en el desarrollo de este trabajo.

A **mis compañeros del Posgrado en Biotecnología y del Instituto Mexicano del Petróleo** por su apoyo y comentarios.

Dedicatorias

A **mis Padres** Rafael Ríos y Maria Elena Vázquez por su gran amor, apoyo incesante y sobre todo por la fe que despostaron en mí. Gracias.

A **mis hermanas** Martha Patricia y Rosa Elena.

A **mi País** a quien tanto amo.

ÍNDICE

	Pág.
Índice de tablas	
Índice de figuras	
Nomenclatura	
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
JUSTIFICACIÓN	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Contaminación por residuos de perforación	1
1.1.1. Legislación ambiental	3
1.2. Tecnologías de biorremediación	4
1.2.1. Atenuación natural	6
1.2.2. Bioaumentación	6
1.2.3. Bioestimulación	7
1.2.4. Bioventeo	7
1.2.5. Fitorremediación	8
1.2.6. Biorreactores	9
1.2.7. Composteo	9
13. Factores que afectan la biodegradación de hidrocarburos	9
1.3.1. Físicoquímicos	10
1.3.2. Biológicos	20
1.3.2.1. Microorganismos degradadores de hidrocarburos	20
1.3.3. Inhibición de la biodegradación	22
1.4. Lisímetros como modelo de estudio	23
2. ANTECEDENTES	28
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	32
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	33
5.1. Obtención de las muestras	33
5.2. Curva de avance en los lisímetros	33
5.3. Pruebas preliminares (nivel microcosmos)	34
5.3.1. Obtención de un inóculo de bacterias hidrocarbonoclastas	34
5.3.2. Evaluación de la bioaumentación muestras de suelo	35
5.3.2. Método de aireación	35
5.3.2.1. Selección del oxigenante y su concentración	35

5.4. Lisímetros (nivel mesocosmos)	36
5.4.1. Diseño de los lisímetros	36
5.4.2. Diseño experimental	39
5.4.2.1 Condiciones experimentales en los lisímetros	39
5.4.3. Montaje de lisímetros y acondicionamiento del suelo	40
5.5. Preparación y toma de muestras	43
5.6. Análisis estadístico	43
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
6.1. Caracterización del suelo contaminado	45
6.2. Diseño de lisímetros	49
6.3. Pruebas preliminares (nivel microcosmos)	51
6.3.1. Selección de oxigenante y concentración	51
6.3.2. Evaluación del inóculo en medio líquido	56
6.3.3. Evaluación de bioaumentación en muestras de suelo	57
6.3.4. Selección de nutrientes; evaluación de fertilización	58
6.4. Estudio de la estimulación de suelo en lisímetros (nivel mesocosmos)	61
6.4.1. Transporte de hidrocarburos en los lisímetros	61
6.4.2. Efecto de la estimulación en la degradación de hidrocarburos	61
6.4.2.1. Biodegradación en el estrato superior	64
6.4.2.2. Biodegradación en el estrato medio	66
6.4.2.3. Biodegradación en el estrato inferior	67
6.4.3. Efectos de los estimulantes sin interacción	69
6.4.3.1. Efecto de la bioaumentación	69
6.4.3.2. Efecto de la fertilización	70
6.4.3.3. Efecto del oxigenante	72
6.4.4. Respiración de los tratamientos en los lisímetros	74
6.4.4.1. Cuantificación de O ₂ y CO ₂	74
6.4.4.2. Transformación del amonio en los sistemas de estudio	78
6.4.4.3. Actividad bacteriana anaerobia	80
6.4.5. Comportamiento de la población microbiana aerobia	81
7. CONCLUSIONES	85
8. BIBLIOGRAFÍA	87
Anexo A. Métodos analíticos	99

Índice de tablas

No.	Tabla	Pág.
1.1	Tipos y composición de los lodos	2
1.2	Valores de potencial de oxido-reducción en diferentes condiciones ambientales	14
1.3	Principales géneros de microorganismos degradadores de hidrocarburos	21
1.4	Características de estudio a nivel microcosmos, lisímetros y de campo	24
1.5	Utilización de lisímetros en trabajos de biorremediación	26
5.1	Diseño factorial 2^3 utilizado para los lisímetros	39
5.2	Métodos analíticos	41
5.3	Cantidad de los elementos de bioestimulación y agua requerida para un lote de 3 kg de suelo	42
6.1	Característica físicas, químicas y microbiológicas del suelo	46
6.2	Nominación para suelos típicos	47
6.3	Biodegradación de hidrocarburos (%) para cada estrato después de 5 meses de experimentación	63
6.4	Estudios de biorremediación en columnas de suelo o lisímetros	64
6.5	Método de intervalos múltiples de Duncan para el estrato superior	65
6.6	Método de intervalos múltiples de Duncan para el estrato inferior	68
6.7	Efecto de la adición de estimulantes sin interacción sobre la degradación de hidrocarburos. Prueba de intervalos múltiples de Duncan	71
A.1	Composición del medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas	100
A.2	Composición de la solución mineral	100

Índice de figuras

No.	Figuras	Pág.
2.1	Distribución tridimensional de la contaminación de hidrocarburos totales del petróleo en Campo 10 y ubicación de los puntos de muestreo	30
5.1	Esquema de un lisímetro o unidad experimental con tres estratos con puertos para la toma de gases	37
6.1	Cromatograma que presentan las fracciones de hidrocarburos en el suelo proveniente de Campo 10	45
6.2	Curva de avance del trazador no reactivo en la columna de suelo	50
6.3	Cinética de producción de oxígeno disuelto a partir de peróxidos en medio líquido	52
6.4	Efecto de los oxigenantes químicos en el pH en medio líquido	52
6.5	Afecto de la concentración de CaO_2 en la población bacterias hidrocarbonoclastas aerobias	54
6.6	Afecto de la concentración de CaO_2 en la población de bacterias heterotróficas aerobias	54
6.7	Afecto de la concentración de CaO_2 en el consumo O_2 en microcosmos	55
6.8	Afecto de la concentración de CaO_2 en pH del suelo	55
6.9	Afecto de los nutrientes y la concentración de CaO_2 en la conductividad eléctrica	56
6.10	Efecto de la bioaumentación en muestras de suelo a nivel microcosmos	58
6.11	Efecto de los nutrientes en la cuenta de bacterias hidrocarbonoclastas en muestras de suelo a nivel microcosmos	60
6.12	Cinética de degradación de hidrocarburos en las columnas de suelo	62
6.13	Biodegradación de hidrocarburos en el estrato superior	66
6.14	Biodegradación de hidrocarburos en el estrato medio	67
6.15	Biodegradación de hidrocarburos en el estrato inferior	68

6.16	Efecto de la adición de estimulantes en el pH del suelo al inicio del tratamiento en las columnas de suelo	73
6.17	Efecto de la adición de estimulantes en el pH del suelo al final de la experimentación en las columnas de suelo	73
6.18	Conductividad eléctrica al final de la experimentación en las columnas de suelo	74
6.19	Producción de CO ₂ en los lisímetros	75
6.20	Biodegradación de hidrocarburos en función de CO ₂ producido	76
6.21	Correlación entre los valores CO ₂ y O ₂	78
6.22	Cambios de concentración NH ₄ ⁺ y NO ₃ ⁻ en las columnas de suelo	79
6.23	Cinéticas de bacterias hidrocarboclastas en los lisímetros	82
6.24	Correlación entre la cuenta de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas en los lisímetros	83

Nomenclatura

Siglas	Significado
ANOVA	Análisis de varianza
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASTM	American Society for Testing and Materials
BHC	Bacterias hidrocarbonoclastas
BHT	Bacterias heterotróficas totales
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
C	Carbono
C:N:P	Relación, carbono:nitrógeno:fósforo
CE	Conductividad eléctrica
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
CRA	Capacidad de retención de agua
C-S	Columnas de suelo
DOF	Diario Oficial de la Federación
EPA	Environmental Protection Agency
HAP	Hidrocarburos poliaromáticos
HTP	Hidrocarburos totales del petróleo
HTRP	Hidrocarburos totales recuperables del petróleo
IGM	Ingeniería genética de microorganismos
L-C	Lisímetros en campo
M	Inóculo o bioaumentación
meq	Miliequivalentes químicos
MN	Interacción: microorganismos-nutrientes
MNO	Interacción: microorganismos-nutrientes-oxigenante
MO	Interacción: microorganismos-oxigenante
N	Nutrientes o fertilización
NO	Interacción: nutrientes-oxigenante
NOM	Norma Oficial Mexicana
O	Oxigenante químico
OD	Oxígeno disuelto
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
ORC	Oxygen Releasing Materials
PE-9	Perfil-9
PEP	Pemex Exploración y Producción
SS	Suelo seco
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

En este estudio, se evaluó el efecto de la adición de un inóculo (bioaumentación), nutrientes (fertilización) y un oxigenante químico (oxigenación) como estimulantes sobre la degradación de hidrocarburos de recortes de perforación, empleando columnas de suelo o lisímetros, como modelo de estudio.

Estudios en pruebas a nivel microcosmos determinaron el empleo de CaO_2 al 0.1% (p/p) como oxigenante químico. Se produjo un inóculo de bacterias aerobias hidrocarbonoclastas, aisladas a partir del sitio de estudio, que crecieron en medio líquido con hidrocarburo crudo como única fuente de carbono y energía. Y se seleccionó NH_4Cl y K_2HPO_4 como fuente de N y P, con una relación N:P = 10:1.

Las columnas fueron empacadas con suelo de un perfil proveniente de la fosa de residuos de perforación de Campo 10, Poza Rica; con tres estratos y niveles de contaminación: estrato superior, 0 – 40 cm (11,973 mg HTP/kg SS); medio 40 – 70 cm (11,370 mg HTP/kg SS); e inferior 70 – 100 cm (18,172 mg HTP/kg SS). Se estableció un diseño experimental factorial (2^3) para evaluar el efecto de los tres estimulantes. La eliminación de hidrocarburos en los lisímetros durante 5 meses de experimentación, fue atribuida a la biodegradación. El análisis de varianza reveló un efecto significativo ($\alpha \leq 0.05$) de los estimulantes sobre la degradación de hidrocarburos en los tres estratos: estrato superior, inóculo-nutrientes (73%); medio, inóculo-nutrientes-oxigenante (71%); e inferior, todos los tratamientos que incluyen la adición de nutrientes (49 - 60%). La adición de inóculo incrementó la degradación de hidrocarburos durante el primer mes de incubación. Los diferentes requerimientos de estimulación en cada estrato revelaron diferentes condiciones a través del perfil de suelo. La atenuación natural es factible como estrategia de remediación en este sitio, ya que, se alcanzó una biodegradación de hidrocarburos de 40 – 48% en cinco meses. Sin embargo, el uso de tecnologías o sistemas de estimulación, permiten obtener resultados en tiempos más cortos, es decir acelerar la degradación de los hidrocarburos *in situ*.

ABSTRACT

In this study, the effect of inoculation (bioaugmentation), nutrients (biostimulation), and oxygen releasing materials (ORM) were evaluated on hydrocarbons biodegradation of drilling and mud cuts, using soil columns or lysimeters as study model.

The use of CaO_2 , 0.1% (w/w) like chemical oxygenate was determined by microcosm experiment test. Inoculums of autochthonous hydrocarbon degrading bacteria were isolated from study site that grew in liquid culture with petroleum as only carbon and energy source. NH_4Cl , K_2HPO_4 were selected as N y P sources with a N:P relation = 10:1.

The columns were filled with soil comes from one profile of drilling and mud cuts (Campo 10, Poza Rica), which presented three layers with different contamination levels: upper, 0 – 40 cm (11,973 mg TPH/kg); middle, 40 – 70 cm (18,370 mg TPH/kg); and lower 70 – 100 cm (18,172 mg TPH/kg). A factorial experiment design was established (2^3) in order to evaluate the effect of the three stimulants. The hydrocarbons removal in the lysimeters, after five experimental months, was attributed to the biodegradation. The variance analysis showed a significant effect ($\alpha \leq 0.05$) of stimulants on hydrocarbons biodegradation in all three layers: upper, inoculants-nutrients (73%); middle, inoculants-nutrients-ORM (71%); and lower, all the treatments that include nutrients addiction (49 - 60%). The use of inoculants increases hydrocarbons biodegradation in the first month. The difference in stimulation requirements for each layer revealed dissimilarity in conditions through the soil profile. Hydrocarbons removal in this site could be possible by natural attenuation (40 - 48%). However, the use of biostimulation technologies systems are recommended to reduce the treatment times, through the enhance of hydrocarbons removal *in situ*.

JUSTIFICACIÓN

Las actividades de la industria petrolera pueden impactar el suelo por fugas y derrames de hidrocarburos, así, como por el depósito de residuos generados durante los procesos perforación y explotación. El impacto de las primeras puede mitigarse a través de procesos de contención de la contaminación y su posterior saneamiento, mientras que el depósito de estos residuos, constituye *un pasivo ambiental* de compuestos altamente intemperizados que requiere de la implementación de tecnologías de saneamiento de bajo costo que permita su tratamiento.

En la industria petrolera mexicana, la principal fuente de residuos peligrosos (59%), la constituye los recortes y lodos de perforación originados por las operaciones de perforación de pozos de explotación o producción. Estos residuos se generan al extraer la roca del suelo, impregnada con hidrocarburos provenientes del crudo, así como por los aceites que forman los lodos de perforación. Petróleos Mexicanos, en 2002, generó 228,810 toneladas de recortes y lodos de perforación (PEMEX 2002). Adicionalmente, se estima que debido a la perforación en años anteriores existen en la actualidad un número importante de pasivos ambientales.

De acuerdo con la legislación mexicana, los recortes de perforación de pozos petroleros en los cuales se usan lodos de emulsión inversa, se consideran como residuos peligrosos (D.O.F., 1993). Incluso en la legislación se detalla que los residuos generados por actividades de perforación de pozos petroleros terrestres deben ser tratados (D.O.F., 1998), hasta niveles de limpieza aceptables cuando contaminen el suelo (D.O.F., 2002 y 2003); asimismo, se han establecido los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo y las especificaciones para su caracterización y restauración (D.O.F., 2004).

La intensa investigación sobre el saneamiento de sitios contaminados con hidrocarburos generada en Estados Unidos de Norte América por su legislación federal, fue aminorada en el tema de los residuos de lodos de perforación debido a que la *Excepción Petrolera* excluye a los recortes y lodos de perforación como residuos peligrosos (EPA, 2002; Fidler y Veil, 2002). Esto originó un vacío en la aplicación de tecnologías de tratamiento para residuos de perforación, desarrollándose principalmente procesos de saneamiento para derrames y fugas de hidrocarburos, generando como consecuencia un reto y una oportunidad de investigación.

Para evaluar la factibilidad de la biodegradación de los hidrocarburos en suelo, es necesario el desarrollo de pruebas en laboratorio (Frankenberger, 1992). Sin embargo, estos estudios comúnmente se realizan a nivel microcosmos, con sistemas alterados (humedad, agitación, etc.), presentando problemas de escala, además de no representar adecuadamente la heterogeneidad del suelo, el cambio de estrato y los procesos naturales de transformación.

Los lisímetros se han empleado como modelo de estudio para medir la biodegradación, transporte y destino de hidrocarburos, a nivel de campo. Estos se localizan en el sitio para conservar el perfil del suelo o se emplean a nivel laboratorio bajo condiciones controladas semejantes a las de campo. Además, mediante el empleo de lisímetros se puede obtener información acerca de los procesos que se llevan a cabo en el suelo durante los procesos involucrados en la atenuación natural.

1. INTRODUCCIÓN

El deterioro de los ecosistemas acuáticos, aéreos y terrestres, se encuentra íntimamente relacionado con el crecimiento industrial y con las prácticas ambientales inadecuadas durante la distribución, almacenamiento y disposición de desechos contaminantes de cualquier tipo.

En México, la industria petrolera es una de las más importantes dentro de la economía del país, siendo las actividades de perforación, almacenamiento y transporte de hidrocarburos, así como su refinación y procesamiento las que involucran un riesgo inherente de impacto ambiental, provocando contaminación en cuerpos de agua y suelo.

1.1. Contaminación por residuos de perforación

En la industria petrolera mexicana, la generación de residuos peligrosos representa el 13% de las descargas al ambiente (PEMEX, 2002). En el 2002 aproximadamente el 59% (228,810 toneladas) de estos residuos correspondieron a los recortes y lodos de perforación. Los recortes de perforación son porciones de tierra y rocas removidas durante las operaciones de perforación de pozos de explotación o producción. Estos se impregnan aproximadamente con 60% de aceite por su contacto con lodos de perforación (PEMEX, 2002). Actualmente, se están estableciendo procesos para su tratamiento; sin embargo, antes de la última década, los recortes fueron depositados, directamente en el suelo sin tratamiento, contaminando fosas aledañas a los pozos perforados. Así, se estima que existen en la actualidad un número importante de *pasivos ambientales* en México. Esto ha hecho necesaria la oferta de nuevos procesos para el tratamiento de estos residuos, incluyendo a los tratamientos biológicos, que permitan reducir los altos costos de los procesos actualmente desarrollados, mismos que pueden tener oportunidad de ser empleados para tratar los residuos generados actualmente.

El proceso de perforación se realiza mediante el uso de barrenas rotatorias empleando un fluido circulante (lodo de perforación) que tiene funciones de: movimiento de los recortes, enfriamiento y lubricación de la tubería y barrena, la protección del agujero sellando y previniendo la pérdida del fluido, el control de las presiones superficiales, así como la aplicación de presión al yacimiento.

La composición de los fluidos de perforación puede variar de acuerdo a los requerimientos de la perforación. Los tipos y composición de los lodos se presentan en la Tabla 1.1. De manera general los lodos contienen bentonita como controladores de pérdida de filtrado y viscosificante; y barita ($BaSO_4$) como espesante para incrementar la densidad del lodo (Zamudio e Islas, 2000).

Tabla 1.1. Tipos y composición de lodos de perforación

Tipos	Composición
Bentónicos	Formados por bentonita y agua con fosfatos o tanatos
Cálcicos	Son iso bentónicos más cemento, sosa, tanatos de ubrique o quebracho como dispersante.
Base yeso	Bentónico más Palustre de Paris ($CaSO_4 \cdot 1/2H_2O$) más un coloide orgánico almidón o driscosa y un conservador (creosota o formaldehído).
Salino	Zeogel de $60Kg/m^3$ e impermex $25 Kg/m^3$ y pH 12, para evitar que el almidón se fermente.
Emulsionados	Se adiciona diesel o aceite crudo, aproximadamente 12% y un emulsionante carbonox o emultan. Es para mejorar los bentónicos y cálcicos
Base aceite	Con asfalto "Black Magic" y diesel

García (1958)

Existen tres tipos de fluidos de perforación utilizados actualmente por Petróleos Mexicanos: a) emulsiones base agua, b) emulsiones base aceite (emulsión inversa) y c) emulsiones base aceite sintético. De estos, el más empleado en México es la emulsión base aceite, aunque se han realizado esfuerzos por sustituirlo.

1.1.1. Legislación ambiental

Los recortes de perforación fueron tradicionalmente descargados en el mar desde el inicio de la explotación petrolera hasta la década de los 80's, formando lo que actualmente se conoce como "pilas de recortes de perforación". En tierra, estos residuos se han depositado en "rellenos sanitarios". A partir de los años 90's prácticamente en todo el mundo se prohibió la descarga de recortes de perforación en tierra y mar. Esto principalmente por el impacto ambiental generado por los químicos presentes en los fluidos de perforación, principalmente los de emulsión inversa. En México, La Unidad de perforación y mantenimiento de pozos de Pemex exploración y producción (PEP) generó 228,810 toneladas de recortes y lodos de perforación, de los cuales 54% se originó en la División Norte principalmente en la Unidad de Burgos, 39% en la División Sur y 7% en la División Marina (PEMEX, 2002).

Diferentes organismos mundiales de protección al ambiente, se encargan de regular o prohibir las descargas de recortes y lodos de perforación impregnados con hidrocarburos en el ambiente. Tales regulaciones exigen a las compañías tratar o confinar los recortes de perforación, lo cual requiere de equipos costosos, como sistemas de centrifugado, de lavado o de tratamiento térmico; así mismo, la recolecta y transporte a depósitos apropiados es costoso (Zamudio e Islas, 2000).

De acuerdo con la legislación mexicana, los recortes de perforación de pozos petroleros que contienen lodos de emulsión inversa, son residuos peligrosos (D.O.F., 1993). Incluso en la legislación se detalla que los residuos generados de actividades de perforación de pozos petroleros terrestres deben ser tratados (D.O.F., 1998), hasta niveles de limpieza aceptables cuando contaminen el suelo (D.O.F., 2002 y 2003). Dentro de la legislación, se han establecido los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo y las especificaciones para su caracterización y restauración (D.O.F., 2004).

Como consecuencia de estas legislaciones, a partir de 1995, se ha incursionado en la aplicación de procesos de saneamiento de recortes de perforación impregnados con hidrocarburos. Se ha utilizado: el encapsulamiento, confinamiento, incineración y desorción térmica, con resultados no muy satisfactorios desde el punto de vista ambiental y económico. Aunado a lo anterior, a principios de 1999, Pemex publicó el lineamiento interno No. PEP/ASIPA-L-001/99, que establece los requerimientos en materia de Seguridad Industrial y Protección Ambiental que deberán cumplir las localizaciones equipos para la perforación de pozos, así como el abandono de sitios. Basado en esta normatividad y lineamiento, Pemex lleva a cabo el “Proyecto Integral Ecológico Cero Descargas”, con objeto de eliminar las descargas de contaminantes durante las actividades de perforación y terminación de pozos (Zamudio e Islas, 2000).

En 1992, Estados Unidos publicó las normas para las actividades de explotación de hidrocarburo costa-afuera. Sin embargo, referente a legislación de residuos de lodos de perforación en la actualidad, se excluyen a estos residuos como “residuos peligrosos” (EPA, 2002).

1.2. Tecnologías de biorremediación

La necesidad de recuperar sitios contaminados ha permitido el desarrollo de diferentes **técnicas de remediación** de tipo físico, químico y biológico. Los métodos biológicos se engloban en las **tecnologías de biorremediación**: las cuales son efectivas para la eliminación de hidrocarburos del suelo y acuíferos, son económicas y amigables con el ambiente (Loehr, 1992; Saval, 1998).

La biorremediación es un proceso natural o controlado, en el cual, la actividad biológica, especialmente la microbiana, acumula o transforma los contaminantes a niveles no tóxicos, minimizando el riesgo para las personas en el área. Los procesos de biorremediación se pueden aplicar bajo las condiciones naturales del sitio o

estimulando la actividad biológica, a través de la adición de nutrientes, de aceptores de electrones, controlando la humedad u otro parámetro.

Los tratamientos de remediación en suelo, se pueden aplicar:

En el sitio (*in situ*) - Esta operación se realiza en el mismo sitio contaminado sin excavar ni disponer el suelo para su tratamiento; modificando de forma mínima la estructura del suelo. Requiere de periodos de tratamiento más largos y es menos seguro debido a la heterogeneidad propia del suelo. Las tecnologías de biorremediación *in situ*, incluyen: bioventeo, bioaumentación, bioestimulación fitorremediación y atenuación natural (Van Deuren *et al.*, 1997).

Fuera del sitio (*ex situ*) - Operaciones que requieren que el suelo contaminado sea excavado y transportado a otro sitio, para ser sometido a un tratamiento de remediación. Generalmente requiere periodos más cortos de tratamiento, son más seguros en cuanto a uniformidad de tratamiento ya que el sistema puede homogeneizarse; sin embargo, requieren de excavación del suelo, lo que provoca un aumento en los costos para su tratamiento. Las tecnologías de biorremediación *ex situ*, en general incluyen: composteo (biopilas) y biorreactores (Van Deuren *et al.*, 1997).

Entre las ventajas de las técnicas de biorremediación se encuentran: a) son tecnologías limpias, b) es un sistema biológico de bajo costo, c) se puede llevar a cabo en el mismo sitio, eliminando el costo de transporte, d) ocasiona trastornos mínimos al sitio, e) los contaminantes son eliminados (no transferidos) al formar bióxido de carbono y agua y e) son tecnologías que gozan de aceptación social y por las autoridades ambientales (Saval, 1997).

Entre las desventajas de las técnicas de biorremediación se encuentran; a) no tiene éxito en suelos de baja permeabilidad, b) la actividad de los microorganismos se

pueden inhibir con altas concentraciones de contaminantes, c) algunos compuestos no pueden ser eliminados, y d) necesidad de monitoreo extensivo para cada sitio.

A continuación se describen las técnicas de remediación de tipo biológicas:

1.2.1. Atenuación natural

Es la acción de los procesos naturales intrínsecos del suelo, sin la adición de elementos externos o la manipulación del sistema. Es una estrategia de remediación que debe ser supervisada y controlada mediante un seguimiento analítico y basada en un estudio de riesgo. Incluye los procesos físicos como la volatilización, dilución, adsorción y dispersión hidráulica que resulta de una reducción de la contaminación (IMP, 2004).

La atenuación natural como estrategia de remediación, es ideal, cuando ciertos factores son favorables: las condiciones geológicas, geoquímicas, factores físicos y químicos y presencia de microorganismos degradadores de contaminantes. Además, es necesaria la caracterización del sitio, la verificación de la toxicidad de intermediarios o productos, así como la migración de contaminantes antes de su degradación o transformación. Esto último permite - junto con el escenario del sitio - obtener una evaluación del riesgo de salud y el ambiente (agua subterránea y suelo) para discernir si los procesos de atenuación natural son suficientes en la mitigación del riesgo o si se requieren tratamientos más activos.

1. 2. 2. Bioaugmentación

Consiste en la adición de microorganismos vivos, capaces de degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o biotransformación. Esta tecnología es utilizada cuando se desea reducir el tiempo de tratamiento de un sitio contaminado o cuando la microflora natural es insuficiente en número o

capacidad para degradar los contaminantes involucrados. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de su dispersión y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Riser Roberts, 1998). Antes de llevar a cabo la bioaumentación en un sitio, es necesario realizar cultivos de enriquecimiento, aislar microorganismos capaces de cometabolizar o utilizar el contaminante como fuente de carbono y reproducirlos hasta obtener grandes cantidades de biomasa (Alexander, 1994).

1.2.3. Bioestimulación

La bioestimulación implica la adición de elementos nutricionales al suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos, preferiblemente hasta su conversión a productos inocuos. Típicamente, implica la inyección de agua con nutrientes (Van Deuren *et al.*, 1997). Se aplica en caso de suelos pobres en nutrientes como N y P. La bioestimulación puede acompañarse con el manejo de aceptores de electrones, el contenido de humedad y puede aplicarse junto con la bioaumentación.

Esta tecnología no es recomendable para suelos arcillosos, altamente estratificados o demasiado heterogéneos, debido a limitaciones en la transferencia, especialmente en tratamientos *in situ*. Otros factores que limita su aplicación son: a) el tipo de suelo que no favorezca el crecimiento microbiano, b) incremento en la movilidad de los contaminantes por la circulación de agua. c) no homogeneidad en la distribución de nutrientes, microorganismos u oxígeno en el suelo (Volke, 2002).

1.2.4. Bioventeo

Aplicación de aire a un suelo o cuerpo de agua para satisfacer los requerimientos de oxígeno de los microorganismos encargados de la biodegradación. El suministro de

oxígeno, se lleva a cabo mediante la aireación del sitio contaminado a través de movimiento forzado (vacío o inyección) con bajas velocidades de flujo.

Una alternativa para llevar a cabo el bioventeo, es el uso de oxigenantes químicos, como el H_2O_2 , que en su reacción libera oxígeno y agua. Una limitante en el uso del peróxido es su rápida descomposición a H_2O y O_2 , incluso algunas sustancias del suelo pueden ayudar a su catálisis, como el hierro, el cobre y las enzimas catalasas. Esto produce una rápida liberación del oxígeno que forma rápidamente burbujas debido a su baja solubilidad por lo que no se transporta eficientemente a los microorganismos (Leeson y Hinchee, 1997).

Recientemente se han utilizado oxigenantes de metales primarios como el peróxido de magnesio y de calcio, que presentan las siguientes ventajas: mayor estabilidad, menor solubilidad, precipitan y son de liberación prolongada (Cassidy e Irvine, 1999; Regenesis, 2002).

1.2.5. Fitorremediación

La fitorremediación es un proceso que utiliza plantas vivas y los microorganismos asociados a sus raíces para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes orgánicos e inorgánicos en suelos o sedimentos. Los mecanismos de fitorremediación incluyen; rizodegradación, fitoextracción, fitodegradación y fitoestabilización. En ecosistemas naturales, las plantas filtran y reciclan sustancias potencialmente tóxicas (Van Deuren *et al.*, 1997; Hutchinson *et al.*, 2001).

Entre las limitaciones de la fitorremediación, se encuentran: altas concentraciones de contaminantes las cuales pueden ser tóxicas para las plantas, su eficiencia depende de la estación del año, no es efectiva para tratar contaminantes fuertemente sorbidos, la toxicidad y biodisponibilidad de los productos de la degradación no siempre se conoce y pueden mobilizarse o bioacumularse en animales.

1.2.6. Biorreactores

Es una tecnología de remediación *ex-situ*, que se aplica en contenedores, en los cuales los suelos contaminados son tratados por dilución en un medio con nutrientes para crear un lodo. Los lodos son continuamente agitados y aireados para optimizar la concentración de oxígeno disuelto. La degradación se lleva a cabo por microorganismos en suspensión o inmovilizados en fase sólida (Riser-Robert, 1998).

Entre los factores que limitan el uso y la efectividad de los biorreactores se encuentran: el suelo contaminado debe ser tamizado y transportado a otro sitio para su tratamiento, los suelos heterogéneos y arcillosos pueden generar problemas de manipulación, cuando se tratan materiales explosivos o solventes clorados, los productos intermediarios pueden ser más tóxicos que el contaminante original, los residuos pueden requerir de tratamiento o disposición final (Van Deuren *et al.*, 1997; Riser-Roberts, 1998).

1.2.7. Composteo

Composteo (tecnología *ex situ*) es un sistema controlado que utiliza la actividad microbiana para degradar los contaminantes del suelo, el cual se dispone en montículos, en los cuales se pueden agregar materiales texturizantes o de volumen, nutrientes y sistemas de aireación; formando un producto final estable. Los sistemas de composteo pueden llevarse a cabo en tanques circulares, recipientes abiertos y biopilas (Alexander, 1994; Semple *et al.*, 2001).

1.3. Factores que afectan la biodegradación de los hidrocarburos

La velocidad de degradación de hidrocarburos está una función de varios factores que intervienen de manera compleja: la naturaleza química del compuesto, la

actividad microbiana, propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y otros factores ambientales. Los principales factores se describen a continuación.

1.3.1. Fisicoquímicos

Textura

Un suelo ideal para la biorremediación debe tener textura tipo arenosa con alta porosidad para que permita la difusión de oxígeno. Esta alta porosidad permitirá una adecuada aireación para la oxidación de hidrocarburos, pero debe tener suficiente limo y arcilla en la matriz del suelo para que se garantice una adecuada humedad con una apropiada capacidad de retención del agua (Frankenberger, 1992).

Suelos con permeabilidades mayores a 10^{-4} cm/s y con una moderada homogeneidad son buenos candidatos para la remediación *in-situ*. En cambio, suelos con permeabilidad muy baja y/o con grandes variaciones pueden limitar el movimiento de fluidos necesarios para los tratamientos *in-situ*, como la extracción con vapor o la inyección de nutrientes en la biorremediación *in-situ* (Rogers *et al.*, 1993; USEPA, 1997).

Disponibilidad de hidrocarburos

La disponibilidad de los hidrocarburos para los microorganismos depende del tipo de hidrocarburo y de las propiedades del suelo como la adsorción en la superficie de las partículas del suelo, disolución en los constituyentes naturales del suelo (p. ej. ácidos húmicos) e interacción con la superficie mineral, entre otros (Huesemann *et al.*, 2002; De Jonge *et al.*, 1997).

Los hidrocarburos biodisponibles en un suelo, son los que se encuentran en contacto directo con los microorganismos; los emulsificados por agentes tensoactivos de origen biológico o químico; y la fracción de hidrocarburos solubles en el agua que ocupa los intersticios del suelo (Rosenberg y Ron, 1997). Así, de acuerdo con la

revisión de Leahy y Colwell (1990), cinéticas tipo Michaelis-Menten, han sido reportadas en la degradación de hidrocarburos de bajo peso molecular y con alta solubilidad en agua. En cambio los hidrocarburos de mayor peso molecular presentan como una limitante la disolución en agua para su posterior degradación, por lo que generalmente no se adecuan a las cinéticas típicas de reacción.

Por otro lado, los hidrocarburos pueden formar complejos con materia orgánica, disminuyendo su disponibilidad y alterando sus propiedades fisicoquímicas (Leahy y Colwell, 1990; Atlas, 1981). La estructura del suelo también afecta la disponibilidad de los hidrocarburos, los suelos arcillosos impiden que éstos sean atacados por microorganismos por lo compacto de la arcilla, lo cual disminuye su disponibilidad debido a la baja movilidad de los contaminantes (Sadeghi *et al.*, 2000; Roger *et al.*, 1993).

Algunas soluciones a este problema han sido el empleo de compuestos que ayuden a los hidrocarburos para que pasen de estar adsorbidos a solubilizados, estos incluyen: surfactantes (aniónicos, iónicos y no-iónicos), biosurfactantes, cosolventes y sales inorgánicas –pirofosfatos- (Müller-Markgraf, 1995). El empleo de estas sustancias se ha cuestionado - especialmente *in situ* - por incrementar la movilidad o disponibilidad y así el efecto tóxico del contaminante, por incrementar el volumen de agua subterránea contaminada, modificar las propiedades del suelo, con lo cual se puede complicar su remediación, representan una fuente de carbono alterna a la de los hidrocarburos, disminuyendo posiblemente la actividad de degradación.

Concentración de hidrocarburos

Contrario al problema de la baja biodisponibilidad, la exposición de los microorganismos del suelo a altas concentraciones de hidrocarburos, provoca la inhibición de la biodegradación, posiblemente debido a tres causas: 1) desbalance de los nutrientes y oxígeno disponible, en relación con la alta concentración de carbono aportado por el hidrocarburo (produciéndose condiciones limitantes); 2) impedimento

físico producido por la fase orgánica presente; y 3) por el efecto tóxico debido a la alta concentración de contaminante (Leahy y Colwell, 1990).

Es debido a esto que se ha desarrollado el concepto de concentración máxima o umbral de hidrocarburos, que podría limitar la degradación haciendo inoperantes las tecnologías biológicas. Sin embargo estas concentraciones, depende de la capacidad de degradación de cada tipo de suelo. Dibble y Bartha, 1979 reportaron un umbral de 100,000 mg/kg para suelos con crudo. Algunos reportes no recomiendan emplear la biorremediación, sin pruebas adecuadas de biotratibilidad, cuando la concentración de hidrocarburos sea mayor a 50,000 mg/kg (Atlas y Bartha, 1998; Pope y Matthews, 1993; Zegarra, 2000).

Sin embargo, Roldan *et al* (2003), han reportado hasta 75% de degradación de hidrocarburos, en concentraciones de 134,000 mg/kg, en estudios de composteo a nivel mesocosmos. Por otro lado, Zapien (2004), en pruebas de biotratibilidad a nivel microcosmos, empleando sistemas sobresaturados con agua, bajo condiciones de aireación forzada y con adición de nutrientes, reportó degradación hidrocarburos a una concentración de 150,000 mg/kg.

Disponibilidad de oxígeno y otros aceptores de electrones

La biodegradación aerobia de hidrocarburos por bacterias y hongos requiere de la oxidación de sustratos, a través de oxigenasas, así mismo el oxígeno molecular es empleado como aceptor final de electrones. Sin embargo, muchos contaminantes pueden ser metabolizados bajo condiciones anaeróbicas (Reuter *et al.*, 1996; Widdel y Rabus, 2001).

En la zona vadosa o no saturada con agua, la respiración microbiana, junto con la de las raíces de las plantas y la de otros organismos, consumen el oxígeno de la atmósfera del suelo y lo enriquecen con dióxido de carbono. Aunque estos gases se difunden e intercambian con los de la atmósfera, su concentración en la atmósfera

del suelo siempre es menor. El contenido de arcillas y la presencia de materia orgánica, afectan la concentración de oxígeno en el suelo. La primera por retener humedad, que evita la difusión de oxígeno, y la segunda por incrementar la actividad microbiana, que consume el oxígeno (Sims *et al.*, 1990).

La pérdida del oxígeno como aceptor de electrones, induce a cambios en la actividad y composición de la población microbiana. Algunos microorganismos facultativos pueden cambiar a un aceptor de electrones que esté disponible en el medio, mientras que otros, sin capacidad de hacerlo, serán desplazados (Sims *et al.*, 1990).

Se han reportado estudios de degradación en condiciones aerobias, anaerobias y anóxicas. En el primer caso, se ha demostrado una mayor actividad degradadora y mayor eficiencia en un menor tiempo (Frankenberger, 1992). Por esto, tradicionalmente se ha preferido operar en condiciones aerobias, pero en aquellos casos en los que no se justifique la introducción de oxígeno molecular –por problemas técnicos y/o financieros– se ha suministrado, con éxito, otras fuentes alternas de aceptores de electrones. Estas fuentes son compuestos inorgánicos como SO_4^- , NO_2^- y NO_3^- , que operan principalmente bajo condiciones anóxicas. También se ha observado degradación anaerobia con producción de dióxido de carbono y metano, bajo condiciones metanógenas (Leahy y Colwell, 1990; Frankenberger, 1992).

En la Tabla 1.2 se presentan valores de potencial de óxido-reducción para algunos aceptores de electrones en condiciones aerobia, anóxica y anaerobia reportadas en la literatura. Estas condiciones están acompañadas por los productos metabólicos observados para cada condición; estos productos sirven para determinar el proceso que impera en el sistema.

Tabla 1.2. Valores de potencial de óxido-reducción en diferentes condiciones ambientales

Condición	Principal aceptor de electrones	Proceso	Sub-productos	Potencial redox (mV)
Aerobia	O ₂	Respiración aerobia	CO ₂ y H ₂ O	+810
Anóxica	NO ₃ ⁻	Desnitrificación	NO ₂ ⁻ , NO, N ₂ O y N ₂	+750
	Mn ⁴⁺	Reducción de Mn (IV)	Mn ²⁺	+300 a +100
	Fe ³⁺	Reducción de Fe (III)	Fe ²⁺	+100 a -100
	SO ₄ ⁻	Sulfatorreducción	H ₂ S	-220
Anaerobia	CO ₂	Metanogénesis	CH ₄	< -240

Gordon *et al* (1980); Rogers *et al* (1993); Sims *et al* (1990)

Como se mencionó anteriormente en la descripción del bioventeo, la aireación es un factor limitante en la biodegradación. El oxígeno en el subsuelo puede ser incrementado por dos métodos: i) inyección de aire a través del suelo, en el cual se utiliza un sistema de bombeo *-aireación forzada-*, o ii) utilización de *oxigenantes químicos*.

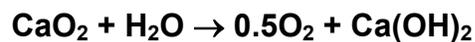
El oxígeno molecular, en medio líquido, presenta una solubilidad baja (con un máximo de 8 a 10 mg/L), pudiéndose incrementar a 40 o 50 mg/L mediante la inyección de oxígeno puro, bajo condiciones estándares. Mientras que con H₂O₂ se puede, teóricamente, alcanzar una solubilidad hasta 500 mg/L aplicando tan sólo 1,000 mg H₂O₂/L (Pardieck *et al.*, 1992). La liberación de oxígeno - y de agua - a partir de H₂O₂ se realiza de acuerdo con la siguiente reacción:



Una limitante para el uso del peróxido, es su rápida descomposición en agua y oxígeno, incluso algunas sustancias del suelo pueden ayudar a su catálisis como el hierro, el cobre y las enzimas catalasas (Pardieck *et al.*, 1992). La rápida liberación del oxígeno puede inclusive formar burbujas debido a su baja solubilidad por lo que

no se transporta eficientemente a los microorganismos. Así, la liberación a la atmósfera puede ser más rápida que su consumo por parte de los microorganismos por lo que no estaría biodisponible (Pardieck *et al.*, 1992).

Como se mencionó anteriormente una alternativa para una liberación prolongada del oxígeno es el empleo de peróxidos de metales primarios. Estos por su baja solubilidad limitan su reacción y por ende disminuyen la velocidad de producción de oxígeno. Estos peróxidos reaccionan de acuerdo con la siguiente ecuación (ejemplificada para peróxido de calcio):



Un posible problema que se observa en la reacción anterior es la formación de un hidróxido que puede incrementar el pH por arriba del requerido para las bacterias de (7 a 8) y la formación de sales como subproducto de la reacción con compuestos ácidos.

Humedad

El contenido de humedad en el suelo sirve para la locomoción microbológica, transporte de nutrientes y compuestos orgánico, así como la remoción de productos metabólicos (Frankenberger, 1992).

Una manera común de expresar la cantidad de agua en el suelo, es a través del porcentaje de humedad, con respecto a la capacidad de retención de agua (CRA) (Frankenberger, 1992). A porcentajes cercanos o mayores al 100% de la CRA (saturados o sobresaturados), sin un sistema de aireación, se puede limitar la transferencia de gases a la matriz del suelo, debido a que sus espacios se encuentran totalmente ocupados por agua (Frankenberger, 1992). Mientras que con valores cercanos o menores al 10%, la fuerza osmótica y matricial del suelo reducen la biodisponibilidad de agua para los microorganismos, a tal grado que la actividad

metabólica se vuelve marginal (Bossert y Bartha, 1984). Una región considerada como óptima es del 50 al 70% de la CRA, pero depende de las características del sitio (Sims *et al.*, 1990; Frankenberger, 1992; Loehr, 1992).

Sin embargo, en sistemas sobresaturados, pero con aireación por agitación y aireación forzada, se favorece la biodegradación de hidrocarburos, por incremento en la biodisponibilidad de gases, dispersión de las partículas del suelo y mejora el contacto de microorganismos, hidrocarburos, oxígeno y nutrientes (Zapien, 2004).

pH

Los intervalos de pH ideales para promover la biodegradación de hidrocarburos por bacterias en el suelo, se encuentran desde pH neutro hasta ligeramente alcalinos (Dibble y Bartha, 1979; Song *et al.*, 1990). La mayoría de los hongos pueden trabajar a valores de pH ácidos (Blaine, 1993; Atlas y Bartha, 1983).

Muchas enzimas que se utilizan en la biodegradación de hidrocarburos son sensibles a cambios de pH, la disminución de su actividad se puede presentar con valores extremos. Estudios experimentales han demostrado la inhibición de la biodegradación a valores de pH arriba de 9.5 (Leahy y Colwell, 1990; Frankenberger, 1992).

El pH también tiene efecto en la disponibilidad de nutrientes, inhibidores y de contaminantes, debido a que afecta la solubilidad y estado de los compuestos. La solubilidad del fósforo se maximiza a pH de 6.5, mientras que el plomo se encuentra menos soluble a pH de 7 a 8 (Sims *et al.*, 1990; Frankenberger, 1992). En general para minimizar el transporte de metales se recomienda un pH mayor a 6 (Sims *et al.*, 1990). La introducción de hidrocarburos en el suelo puede producir una disminución drástica del pH, hasta de 3 unidades (Bossert y Bartha, 1984). La adición de las sales de amonio, nitritos y nitratos pueden acidificar el suelo y las sales de fosfatos

en actuar como un sistema amortiguador para el pH dependiendo de la relación de concentraciones de sus sales conjugadas (Gary, 1993).

Temperatura

La temperatura influye en la biodegradación de los hidrocarburos por su efecto directo en el crecimiento microbiano, la actividad de degradación, la composición de la comunidad microbiana, así como la naturaleza física del petróleo y sus derivados (Atlas, 1981).

A bajas temperaturas la viscosidad de los hidrocarburos aumenta, la volatilización de alcanos de cadena corta se reduce y disminuye la solubilidad del O₂ en agua, afectando así la biodegradación. Las tasas de degradación generalmente aumentan cuando la temperatura incrementa. Esto es posible debido al aumento en la tasa de la actividad enzimática o del factor Q₁₀. Este último factor – que representa la tasa del incremento de la utilización del sustrato por el aumento de cada 10°C - se ha reportado entre valores de 1.7 y 2.3 para suelo (Bossert y Bartha, 1984). El rango de temperatura óptimo para degradación de hidrocarburos se reporta entre 18 y 30°C ó entre 24 y 30°C (Bossert y Bartha, 1984; Frankenberger, 1992). Arriba de 40°C se ha reportado un desnaturalización de la membrana, sin embargo, se han logrado aislar microorganismos degradadores de hidrocarburos entre -1 y 70°C (Frankenberger, 1992).

En zonas polares, típicamente se han reportado condiciones limitantes para la biorremediación por las bajas temperaturas. En el mundo existen condiciones ambientales extremas como en los valles secos, llegando a alcanzar - 40°C y en desiertos calientes de arena hasta 65°C (Bossert y Bartha, 1984). Los cambios climáticos y de estaciones seleccionan de manera natural a las poblaciones de los microorganismos degradadores de hidrocarburos, los cuales se adaptan a las temperaturas ambientales (Leahy y Colwell, 1990).

Estudios a nivel laboratorio sobre el efecto de la temperatura en la biodegradación de hidrocarburos, requieren ser validados en campo, debido a la gran diferencia del efecto causado por las fluctuaciones de temperatura durante las 24 horas del día comparada con una temperatura empleada en el proceso de incubación controlada (Dibble y Bartha, 1979). Estos cambios de temperatura dependerán de la humedad del suelo, debido al alto poder calorífico del agua, los suelos más húmedos son menos sensibles que los secos a los cambios diurnos de temperatura.

Nutrientes

Los nutrientes esenciales para el crecimiento de los microorganismos son: C, N, P, K, S, Fe, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Mb, Na y Co. Los últimos 11 elementos se requieren en pequeñas cantidades y generalmente se encuentran en concentraciones suficientes en el suelo (Foth, 1987).

El nitrógeno y fósforo en el suelo son factores que limitan el crecimiento y la actividad metabólica de los microorganismos degradadores de hidrocarburos. Incluso pueden estar en concentraciones deficientes en los suelos contaminados con hidrocarburos, debido al fuerte aporte de C por los hidrocarburos (Sylvia *et al.*, 1999; Atlas y Bartha, 1998).

El **nitrógeno** forma parte de las principales biomoléculas de las células; aminoácidos, ácidos nucleicos, amino azúcares, vitaminas y polímeros. Es uno de los elementos más abundantes en la Tierra, pues en su forma gaseosa (N₂) constituye el 78% de la atmósfera. Sin embargo, la cantidad de nitrógeno que se presenta en muchos suelos es escasa, debido a su propia dinámica y ciclo biogeoquímico, la adición de éste permite a los microorganismos autóctonos, capaces de degradar hidrocarburos, estimular su crecimiento y metabolismo (Atlas y Bartha, 1998; Boopathy *et al.*, 1997).

La adición del N con respecto a la fuente de carbono en un sistema, determina la relación C:N como un balance o ajuste de requerimientos nutricionales que permite orientar el metabolismo. En biorremediación la relación C:N se ha utilizado para el manejo de las concentraciones de nutrientes que permite mantener un proceso de biodegradación eficiente (Alexander, 1994; Walworth y Reynolds, 1995; Smith *et al.*, 1998).

El amonio, como fuente de nitrógeno para los microorganismos es la forma más fácilmente asimilable (Frankenberger, 1992; Walworth y Reynolds, 1995). Su utilización no requiere oxidación o reducción, debido a que el nitrógeno en las células (aminoácidos, purinas y pirimidinas) está también en forma de amonio (Gaudy y Gaudy, 1981). Por el contrario, el nitrato se debe reducir a amonio antes de incorporarse a los aminoácidos (Paul y Clark, 1989; Walworth y Reynolds, 1995). El número de bacterias capaces de asimilar directamente nitrógeno a partir del amonio es mayor comparado con aquellas que pueden reducir los nitratos (Gaudy y Gaudy, 1981). Este último proceso de reducción se conoce como desnitrificación.

El amonio puede oxidarse (nitrificarse) a nitrito y nitrato de manera relativamente rápida en condiciones aeróbicas y pH neutro (Paul y Clark, 1989). Sin embargo, este efecto disminuye por la presencia de hidrocarburos (Deni y Penninckx, 1999). Además, a bajas concentraciones de amonio se reprimen las enzimas requeridas para su nitrificación y obtención de energía de las bacterias autótrofas que no favorecen la degradación de hidrocarburos (Paul y Clark, 1989).

El **fósforo** es un elemento esencial para los microorganismos, que se encuentra como éster de fosfato en el ATP, es un componente de biomoléculas como ácidos nucleicos y fosfolípidos, que forman parte de la membrana celular. Debido a la facilidad de oxidación, el fósforo elemental no se encuentra en estado libre en la naturaleza, se encuentra en forma de fósforo orgánico e inorgánico, dependiendo de la naturaleza de los compuestos que lo contengan. La forma orgánica se encuentra

en el humus y materia orgánica y sus niveles en el suelo puede variar desde 0 hasta más de 0.2%. La fracción inorgánica esta constituida por otros compuestos de hierro, aluminio, calcio, flúor, y normalmente es más abundante que los compuestos orgánicos.

Como se mencionó, la biorremediación puede involucrar la adición de fuentes de nitrógeno y fósforo –fertilización- permitiendo así, compensar desbalance de la relación C:N:P causado por el exceso de carbono proveniente del hidrocarburo y favoreciendo su biodegradación (Leahy y Colwell, 1990). Una relación C:N:P recomendada en varios estudios para la biodegradación de hidrocarburos del petróleo es 100:10:1 (Frankenberger, 1992; Demque *et al.*, 1997; Blaine, 1993).

1.3.2. Factores biológicos

1.3.2.1. Microorganismos degradadores de hidrocarburos

La biodegradación de hidrocarburos en diferentes ecosistemas (suelo y agua) requiere de la presencia de microorganismos (bacterias, hongos, algas) que, a través de la actividad bioquímica, oxiden los hidrocarburos. Algunas especies de microorganismos pueden metabolizar un número limitado de hidrocarburos, de manera que la presencia de poblaciones mixtas con diferentes capacidades metabólicas, es necesaria para degradar mezclas complejas de hidrocarburos como el crudo (Leahy y Colwell, 1990; Bouchez, *et al.*, 1995). En la Tabla 1.3, se presentan los principales géneros de bacterias y hongos degradadores de hidrocarburos aislados de ambientes acuáticos y de suelos.

La degradación de hidrocarburos se lleva acabo principalmente por bacterias, seguidas por los hongos, levaduras y algas, entre otros. En un estudio comparativo de poblaciones Song *et al* (1986), observaron que las bacterias participaron en el 82% de la degradación de n-hexadecano y los hongos con un 13%. Leahy y Colwell,

(1990) citan algunos estudios en que se reporta la degradación de hidrocarburos por algas.

Tabla 1.3. Principales géneros de microorganismos degradadores de hidrocarburos

Bacterias		Hongos
<i>Achromobacter</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Aurogebasidium</i>
<i>Arthobacter</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Candida</i>
<i>Aeromonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Corollospora</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Dendryphiella</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Serratia</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Brevibacter</i>	<i>Spharicus</i>	<i>Lulworthia</i>
<i>Candida</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Mortierella</i>
<i>Cicrobacter</i>	<i>Spirillum</i>	<i>Mucor</i>
<i>Corynebacterium</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Enterobacter</i>	<i>Sporobolomyces</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Flavobacterium</i>	<i>Shigobacter</i>	<i>Sporobolomyces</i>
<i>Hafnia</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Trichoderma</i>
<i>Listonella</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Variscosporina</i>

Atlas y Bartha (1983); Song *et al* (1986); Kirk y Gordon (1988); Leahy y Colwell (1990); Arenas (1999); Escalante (2002)

En la última década, debido al desarrollo de nuevas técnicas en biología molecular se han descrito más especies de microorganismos degradadores de hidrocarburos, aislados de ecosistemas terrestres, marinos y de agua de producción petrolera, entre otros (Alazard *et al.*, 2002; Van Hamme *et al.*, 2003).

Los reportes del porcentaje de bacterias y hongos presentes en suelos, varían de forma importante de entre 0.13 y 50% para bacterias, y de 6 a 82% para hongos, con respecto a la comunidad heterótrofa total del suelo. La proporción de hongos y bacterias dependerá de las condiciones del sitio (Leahy y Colwell, 1990) y de las condiciones de cultivo que se utilicen para su cuantificación. El número de microorganismos heterótrofos totales en suelo, considerado como “típica” se encuentra en una cuenta total de 10^7 a 10^9 UFC por gramo de suelo; para degradadoras potenciales en suelos no contaminados entre 10^5 y 10^6 ; y entre 10^6 y 10^8 en suelos contaminados (Bossert y Bartha, 1984).

En ecosistemas en donde las poblaciones microbiológicas degradadoras no son significativas, se ha utilizado la bioaumentación con el propósito de incrementar la tasa de biodegradación de los contaminantes. Se prefiere la bioaumentación empleando microorganismos autóctonos, ya que los alóctonos pueden presentar problemas de adaptación (Frankenbeger, 1992; Leahy y Colwell, 1990; Saval, 1998). Recientemente se ha considerado el uso de microorganismos genéticamente manipulados para la biorremediación de sitios contaminados (Odukuma y Dickson, 2003; Ripp *et al.*, 2000; Van Hamme *et al.*, 2003).

1.3.3. Inhibición de la biodegradación

Aunque los productos finales de la mineralización de hidrocarburos son CO₂, H₂O y biomasa celular, la biodegradación de hidrocarburos, especialmente los de alto peso molecular, puede producir intermediarios que pueden acumularse inhibiendo la actividad microbiana. La degradación de compuestos aromáticos puede producir intermediarios de ácidos benzóico y fenólico. Se ha reportado la acumulación de derivados salicílicos que limitan la degradación de naftalenos; de ácido láurico, que limita la degradación de n-hexadecano; de n-alcanos de cadena larga en la degradación de crudo; y de alcoholes en la degradación de alcanos (Frankenbeger, 1992).

También se han reportado efectos adversos en la degradación de hidrocarburo por la presencia de metales como el Pb, Zn, Cr, Ni, y Cd. Dependiendo de la procedencia de las gasolinas y diesel se ha encontrado – en especial en gasolinas antiguas que empleaban como aditivo al tetraetilo de plomo – concentraciones relativamente altas de Pb (entre 75 y 7,500 mg/kg). Mientras que en aceites de motor se ha encontrado concentraciones de hasta 13,000 mg/kg de Pb, 2,500 de Zn, 50 de Cu, 20 de Cr, 5 de Ni, y 0.1 de Cd (Frankenberger, 1992).

Frankenberger (1992), encontró que altas concentraciones de plomo (5,000 mg/kg) en suelo, causa una disminución en la población bacteriana. Los suelos generalmente contienen entre 15 y 100 mg/kg de plomo en forma natural. La biodisponibilidad de Cd es comúnmente - a las mismas concentraciones - mayor a la del Pb. Sin embargo, se ha observado inhibición en la biodegradación de diesel con concentraciones de Pb de 10, 100 y 1,000 mg/kg y con 1,000 mg/kg de Cd.

1.4. Lisímetros como modelo de estudio

El término lisímetro, etimológicamente deriva de los vocablos griegos “lyo” (disolver) y “metron” (medir), y significa “medidor de la disolución”. Los lisímetros se han empleado desde el siglo XIX para realizar estudios sobre el balance de materia de los nutrientes. De acuerdo con Hire el origen de los lisímetros se remonta a 1688 (Fürh *et al.*, 1997).

A través de la historia, los lisímetros se han empleado en al menos 1,800 estudios (Fürh *et al.*, 1997). Estos estudios incluyen distintas áreas como la agricultura, en donde se han empleado en estudios de ganancia de agua (irrigación, precipitación y condensación) y pérdidas (evapotranspiración) de agua y solutos; en ingeniería civil, en sistemas de riego y lixiviados de rellenos sanitarios; en ingeniería ambiental, en el transporte y destino de pesticidas, nitratos y algunos otros compuestos. Algunos incluso han sido diseñados para estudiar efectos de lixiviados de residuos de baja radiación (Cox, 2000).

De manera general podemos definir al **lisímetro** como un dispositivo constituido por una columna de suelo, que permite simular y medir la biodegradación, así como el transporte y destino de uno o varios compuestos de interés, a través del material poroso del suelo. Usualmente se emplean a nivel de campo y se localizan en el sitio de estudio para conservar el perfil del suelo inalterado o se emplean a nivel laboratorio bajo condiciones controladas semejantes a las de campo.

De acuerdo con las pautas de la OECD (2000) los lisímetros pueden clasificarse, de acuerdo con su diseño de la siguiente manera¹:

1. Por su forma de empaçado:
 - a. Monolito inalterado
 - b. Lisímetros empaçados artificialmente
2. Considerando el régimen de flujo:
 - a. Con simulación de nivel freático
 - b. Con fondo libre
3. De acuerdo con la recolección de lixivados:
 - a. Recolección activa o forzada con succión de lixivados
 - b. Recolección pasiva por gravedad
4. Por el sistema de bioventeo:
 - a. Física: Pasiva o activa (forzada o mecánica)
 - b. Química con adición de compuestos liberadores de oxígeno

Algunas características de estudio que han evaluado a través de lisímetros, en estudios de pesticidas, se presentan en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. Características de estudio a nivel microcosmos, lisímetros y campo

Característica de estudio	Laboratorio (microcosmos)	Lisímetros en campo	Datos de campo
Balances de materia	SI	SI	NO
Simular condiciones de campo	NO	SI	SI
Los resultados dependen de las condiciones climáticas	NO	SI	SI
Refleja la estructura del suelo	NO	SI	SI
Muestreo periódico del suelo a través del estudio	SI	NO	SI
Posibilidad de estudiar el comportamiento en el subsuelo	NO	NO	SI

Jones *et al* (1998)

¹ Modificado de la OECD (2000) debido a que los lisímetros propuestos se emplean para observar el transporte y destino de los pesticidas en condiciones naturales del suelo y no para estimular su biodegradación por lo que originalmente no se incluye al bioventeo.

Los estudios en campo presentan la desventaja de que los resultados dependen de las condiciones climáticas. Así, los estudios en diferentes años, en el mismo sitio pueden presentar resultados distintos. Del mismo modo la generalización de los resultados a otros sitios es limitada.

En estudios a nivel de campo se observan variaciones del 100% por lo que se recomiendan muestreos muy exhaustivos de 15 a 20 muestras por cada incremento en tiempo y profundidad. Una manera de controlar esta variabilidad es realizando estudios con suelos confinados en lisímetros, en los que las muestras de las capas del suelo puedan ser homogenizadas con anterioridad al sub-muestreo.

Los resultados obtenidos empleando lisímetros en laboratorio pueden originar diferencias con respecto a los resultados en lisímetros en campo, debido al incremento en la escala, e incluso puede afectar condiciones de operación en campo cuando se aplique una tecnología de saneamiento.

No se recomienda emplear lisímetros con suelos arcillosos, debido a la capacidad de contracción de las arcillas provocando microfracturas en el núcleo y separación de los lisímetros con la pared de las columnas, que origina lixiviados (agua y solutos) directamente al fondo de los lisímetros (OECD, 2000).

En la última década, los lisímetros se han empleado en varios trabajos de biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos, en los cuales se ha evaluado el transporte y degradación de hidrocarburos, cambios de poblaciones microbianas, biodisponibilidad, efecto de factores de estimulación biológica y utilización de microorganismos manipulados por ingeniería genética (Tabla 1.5).

Tabla 1.5. Utilización de lisímetros en trabajos de biorremediación

Autor	Estudio	Contaminante	Tema
Wang <i>et al</i> (1990)	L-C	Diesel oil	Degradación de HPA
Song y Bartha, (1990)	C-S	Destilado de hidrocarburos	Cambio de comunidades
Grundmann y Jürnen, (1991)	L-C	Diesel	Degradación de HPA
Breedvel y Brieseid (1993)	C-S	Creosota	Degradación de HPA
Phelps <i>et al</i> (1994)	C-S	Contaminado por actividades militares	Degradación de alcanos
Frankenberger <i>et al</i> (1997)	C-S	Residuos de refinería	Degradación de HTRP
De Jonge <i>et al</i> (1997)	L-C	Crudo	Biodisponibilidad
Fiorenza y Ward (1997)	C-S saturadas	BTEX	Adaptación microbiológicas por adición de H ₂ O ₂
Ripp <i>et al</i> (2000)	L-C estratificados	HPA	IGM en biorremediación
Gibb <i>et al</i> (2001)	C-S	Crudo	Biorremediación a temperatura bajas
Margesin y Schinner (2001)	L- C	Diesel	Evaluación de la atenuación natural y bioestimulación
Sovik <i>et al</i> (2002)	L-C	Jet fuel	Transporte y degradación
Duncan <i>et al</i> (2003)	L-C	Crudo	Composición de especies
Zucchi <i>et al</i> (2003)	C-S	Crudo	Cambios de comunidades
Odukuma y Dickson (2003)	L-C	Crudo	Biorremediación en suelo tropical húmedo.

C-S, columnas de suelo; L-C, lisímetros en campo; HPA, hidrocarburos poliaromáticos; HTRP, hidrocarburos totales recuperables del petróleo; IGM, ingeniería genética de microorganismos; BTEX, benceno, tolueno, etilbenceno y xileno

Por otro lado, los lisímetros pueden contribuir al estudio de la atenuación natural brindando información que permite sustentar los siguientes argumentos:

i) *Los procesos de atenuación natural son razonablemente comparables con otros procesos estimulados* (USEPA, 1999). Aunque los lisímetros no permitan representar absolutamente todas las condiciones en campo, sí permiten simular a nivel mesocosmos, en un plazo medianamente corto, los procesos exclusivos de la atenuación natural y compararlos con los estimulados.

ii) *El principal proceso de reducción de la concentración de hidrocarburos es la biodegradación* (USEPA, 1999). Considerando que tanto las autoridades como las guías prefieren que el principal mecanismo de la atenuación natural sea destructivo, se pueden emplear lisímetros para cuantificar - en caso de no ser despreciable - al transporte natural y dilución de los hidrocarburos y compararlo con la biodegradación.

2. ANTECEDENTES

El saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos por métodos o tecnologías biológicas requiere, junto con aspectos básicos de geohidrología, información acerca de la química de contaminantes, física y química del suelo, los procesos biológicos. Generalmente, se aplican sin conocer los procesos que se llevan a cabo, limitando muy seguramente estas tecnologías y su potencial. Por lo anterior, se requiere de bases científicas de los procesos de biodegradación de hidrocarburos en suelos, haciendo indispensable la investigación mediante modelos experimentales controlados a nivel laboratorio, que permitan, por una parte, verificar si la degradación biológica es factible como proceso de la atenuación natural, y por otra, determinar de que manera se puede estimular biológicamente al suelo para implementar procesos activos y efectivos de saneamiento.

Führ *et al* (1997), sugieren tener precaución con la interpretación de datos de laboratorio, que algunas veces no describen las condiciones de campo. Así, estudios realizados a nivel microcosmos pueden presentar un problema de escala al no considerar la heterogeneidad a un nivel por arriba de la representada en los microcosmos (Sharabi y Bartha, 1993; Jones *et al.*, 1998; Alexander, 1999), y son generalmente representativas de un solo estrato sin considerar las relaciones entre los estratos geológicos con distintos grados de contaminación.

Varias condiciones ambientales pueden afectar la biodegradación, las de mayor interés son el aporte de nutrientes (Graham *et al.*, 1995) y la biodisponibilidad de oxígeno u otro aceptor de electrones (Leahy y Colwell, 1990). Sobre el primero, se reconoce que la adición de fuentes de N y P permite satisfacer los requerimientos nutricionales de los microorganismos y así se estimula la biodegradación de hidrocarburos (Graham *et al.*, 1995; Walworth *et al.*, 1997; Thomassin *et al.*, 2002); sin embargo, el éxito también va a depender de las características específicas del sitio. Para el oxígeno se reportan problemas de difusión y biodisponibilidad,

especialmente en suelos arcillosos (típicos en residuos de perforación), un método alternativo, para aportar oxígeno al sistema, es el empleo de “agentes químicos oxigenantes” (Pardieck *et al.*, 1992; Regenesis, 2002).

La gran biodiversidad de microorganismos presentes en los distintos tipos de suelo ha demostrado su capacidad de adaptación a los hidrocarburos contaminantes (Leahy y Colwell, 1990). Estos hidrocarburos ejercen una presión de selección en las poblaciones microbianas, favoreciendo a aquellas que presentan la capacidad para degradar hidrocarburos (hidrocarbonoclastas), lo que permite obtener inóculos, es decir, producir más biomasa de microorganismos hidrocarbonoclastas y añadirla al mismo suelo contaminado, incrementando así el número de microorganismos con capacidad de degradar el contaminante (Blaine, 1993; Kästner *et al.*, 1998).

Con base en lo anterior, este trabajo se enfocó a determinar el efecto de la adición de nutrientes, el suministro de oxígeno, y la bioaumentación con bacterias autóctonas, sobre la biodegradación de hidrocarburos; utilizando un sistema de columnas empacadas con suelo contaminado con residuos de perforación como modelo.

El presente estudio forma parte de un proyecto integral de remediación de sitios contaminados con residuos de separación: Proyecto D.00023 “Atenuación Natural de Sitios Contaminados con Hidrocarburos” del Instituto Mexicano del Petróleo. El proyecto global tuvo como objetivo general, la búsqueda de conocimientos y criterios que permitieran determinar la existencia de procesos de atenuación natural y su factibilidad como proceso de remediación, de acuerdo a las condiciones particulares de estos sitios (fosas de residuos de perforación) y la propuesta de tecnologías activas alternativas, biopilas y bioestimulación. Esta propuesta contribuirá aportando conocimiento sobre el movimiento y biodegradación natural de los hidrocarburos, así como el efecto de la aplicación de tratamientos activos, oxigenación, fertilización y bioaumentación y su efecto combinado.

De forma preliminar al desarrollo de esta investigación, se obtuvo el perfil físico químico del suelo y la distribución y caracterización de los contaminantes. La distribución tridimensional de la contaminación de hidrocarburos totales del petróleo en el área de estudio, donde se tomó el suelo de estudio se muestra en la Figura 2.1. En este sitio se depositaron, principalmente, residuos de lodos de perforación con hidrocarburos en las décadas de los 60 y 70, lo que pudo permitir un largo periodo de selección de bacterias hidrocarbonoclastas. La información obtenida sirvió de apoyo para la caracterización previa del material del suelo y la selección de los estratos.

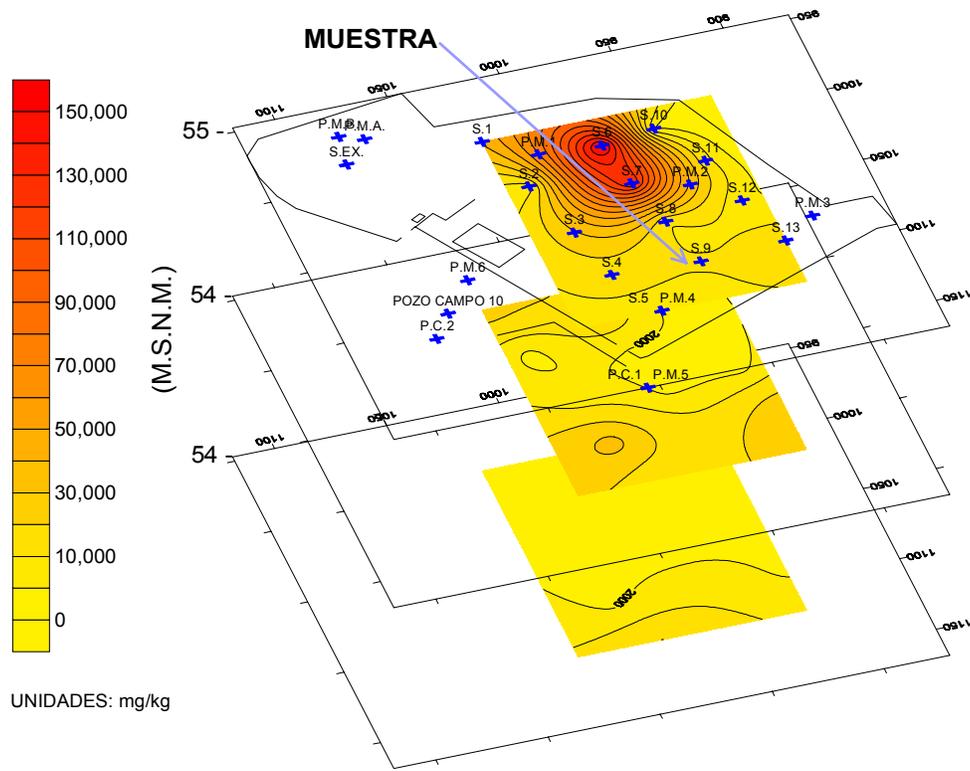


Figura 2.1. Distribución tridimensional de la contaminación de hidrocarburos totales del petróleo en Campo 10 y ubicación de los puntos de muestreo

3. HIPÓTESIS

- Los lisímetros permiten evaluar la atenuación natural y la bioestimulación de hidrocarburos en matrices arcillosas no saturadas.
- La biodegradación de hidrocarburos de recortes y lodos de perforación se incrementa por la adición de nutrientes, bacterias autóctonas y/u oxígeno.
- Los oxigenantes químicos permiten la aireación y estimulación de la biodegradación en suelos arcillosos.

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar el efecto de la estimulación biológica (fertilización, bioaumentación y oxigenación química) en la degradación de hidrocarburos de recortes y lodos de perforación, utilizando lisímetros.

Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la estimulación biológica sobre la remoción de hidrocarburos, en suelos contaminados con residuos de perforación.
- Establecer las condiciones de estimulación biológicas más adecuadas; tipo de nutrientes, oxigenante químico e inóculo de bacterias autóctonas hidrocarbonoclastas, para el sistema propuesto.
- Diseñar un sistema de lisímetros como modelo de estudio para el seguimiento de los procesos de degradación.

5. DESAROLLO EXPERIMENTAL

Este estudio se realizó con columnas o lisímetros empacados con suelo contaminado con residuos de perforación con hidrocarburos, obtenidos del Campo 10, Poza Rica. Se establecieron las condiciones de estimulación biológica (fertilización, bioaumentación y oxigenación) en pruebas preliminares a nivel microcosmos, así como el diseño de los lisímetros y posteriormente, se evaluó el efecto de los estimulantes en la degradación de los hidrocarburos en los lisímetros.

5.1. Obtención de las muestras

Las muestras se obtuvieron del Campo 10 Poza Rica, Municipio Tihuatlán, Veracruz, próximas al área de quemadores en el perfil PE-9 (Figura 2.1), con base en la caracterización física, química y microbiológica de la zona. Las principales características de selección para coleccionar el perfil PE-9 fue que presentó una concentración de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) menor a 25,000 mg HTP/kg de suelo seco (SS) y una textura representativa de la zona, sin exceso de arcillas.

Las muestras fueron representativas de un perfil con tres estratos correspondientes a las capas superficiales con mayor concentración de hidrocarburos en el sitio de estudio. Un estrato superior de 0 a 40 cm de profundidad; el segundo estrato de 40 a 70 cm; y el tercer estrato de 70 a 100 cm.

5.2. Curva de avance en los lisímetros

Con el objetivo de corroborar la factibilidad de utilizar los lisímetros como modelos, se realizó una curva de avance de agua utilizando una solución de NaCl, que por su fácil detección con un conductímetro, su contraste con el suelo poco salino y su alta solubilidad, permite determinar el avance del frente del agua por un proceso de

infiltración por gravedad de acuerdo con las recomendaciones para trazadores de Davis y De Wiest (1967).

Para tal efecto, se adicionaron 50 ml de una solución NaCl 8.7% (p/v), en una columna de suelo y se mantuvo a 30°C. La conductividad eléctrica se midió a los 28 y 62 días del inicio de la prueba.

5.3. Pruebas preliminares (nivel microcosmos)

5.3.1. Obtención de un inóculo de bacterias hidrocarbonoclastas

Con la finalidad de aislar un consorcio de bacterias hidrocarbonoclastas autóctonas para utilizarlas como inóculo en la bioaumentación, fue necesario obtener un preinoculo en matraces serológicos y posteriormente, el inóculo en un reactor de 20 L.

Para la obtención del preinóculo, se inocularon con 1 g de suelo contaminado húmedo, seis matraces de 500 ml con 250 ml de medio mineral (Tabla A.1) adicionados crudo maya estéril al 0.4% (v/v) como única fuente de carbono y energía (C:N = 100:12.91). Los matraces se incubaron 7 días a 30°C, en agitación (60rpm). Las bacterias heterótrofas totales (BHT) e hidrocarbonoclastas (BHC) se cuantificaron cada 24 h por el método “cuenta en placa” (Clark, 1965; Parkinson, 1982) y la determinación de amonio por método “potenciométrico ión selectivo” (ASTM D1426-98). La descripción de estas metodologías se presentan en el Anexo A.

El inóculo se obtuvo en un reactor con cultivo en lote con 20 L medio mineral (C:N = 100:12.91), y crudo al 0.4 % (v/v) como única fuente de carbono y energía, la aireación se realizó por tres sopladores con difusores y se incubó a 30°C. Las BHT y BHC se cuantificaron diariamente por cuenta en placa y el amonio se determinó al

inicio y final de la incubación por método potenciométrico ión selectivo (ASTM D1426-98). Finalmente, el inóculo para la bioaumentación de los lisímetros se obtuvo durante su fase de crecimiento exponencial (7 días).

5.3.2. Evaluación de la bioaumentación en muestras de suelo

Una vez obtenido el inóculo de BHC en medio líquido, con el objetivo de confirmar el éxito de la inoculación en suelo, se evaluó la bioaumentación a nivel microcosmos: en 9 matraces serológicos de 125 ml con tapa de teflón, con 50 g de suelo húmedo con hidrocarburos en una concentración de 15,004 mg HTP/kg SS. El inóculo se obtuvo a partir de 5 ml del reactor (con una cuenta de 1.3×10^8 UFC/ml), la muestra se centrifugó a 9,000 rpm por 20 minutos para obtener un botón y se resuspendió en 1 ml de solución salina (0.85% de NaCl) estéril; posteriormente se mezcló con los 50 g de suelo. Los matraces fueron incubados a 30°C durante 7 días. Las BHC y BHT se cuantificaron al inicio y al final de la incubación por el método de cuenta en placa.

5.3.3. Método de aireación

Se realizaron pruebas cualitativas a nivel laboratorio del suministro de aire mediante el método de aireación forzada con sopladores y compresores en columnas empacadas con suelo del sitio de estudio. Este método se excluyó, por emplear un suelo de tipo arcillos. Como método de aireación se eligió el uso de un oxigenante químico.

5.3.3.1. Selección del oxigenante y su concentración

Para la selección del oxigenante se evaluó la concentración de oxígeno disuelto (O. D.) por algunos peróxidos comerciales BaO_2 y CaO_2 en medio líquido. Para lo anterior, se usaron matraces de 250 ml, a una concentración de 200g de oxigenante/L, durante 14 días, a temperatura ambiente. Se midió el O. D. por el

método del electrodo (APHA, 1980) y el pH por método potenciométrico (USEPA, 1996).

Posteriormente, para el mejor peróxido se evaluó el efecto de distintas concentraciones 0, 0.1, 0.5 y 1 % (p/p) sobre el crecimiento bacteriano, en suelo del estrato superior, a nivel microcosmos. El estudio se realizó por triplicado en frascos serológicos de 125 ml con tapa de teflón, que contenían 50 g de suelo húmedo con una concentración de 15,004 mg HTP/kg SS, además, se adicionó 1,704 mg de NH_4/kg SS (como NH_4Cl) y 31.60 mg PO_4/kg SS (como K_2HPO_4). Los sistemas se incubaron a 30°C durante 8 días y se cuantificó diariamente la concentración de O_2 y CO_2 del “headspace” en un cromatógrafo de gases con detector de conductividad térmica. Las BHT y BHC se cuantificaron al inicio y final de la incubación por el método de cuenta en placa, la conductividad eléctrica con un conductímetro y el pH por método potenciométrico.

5.4. Lisímetros (nivel mesocosmos)

5.4.1. Diseño de los lisímetros

Para el monitoreo de la biodegradación de hidrocarburos durante 5 meses se desarrollaron dos tipos de lisímetros:

- a) Columnas de PVC de 2” de diámetro con tres estratos de 15 cm de altura cada uno (con paredes internas ásperas), empacadas con residuos de lodos de perforación (Figura 5.1 y Foto 5.1). Cada estrato simuló los tres horizontes obtenidos del perfil del suelo. Las columnas fueron selladas en la parte superior e inferior con una tapa, entre los compartimentos se dispuso una malla de fibra de vidrio (cuadrícula 1mm) que fue fijada al tubo por un cople o conexión de PVC.

- b) Columnas de PVC de 4" de diámetro con tres estratos de 15 cm de altura cada uno, como se describió anteriormente. Además, presentó tres puertos laterales, instalados por una conexión de plástico (tygon) y con una llave trifásica a la mitad de cada compartimento (Figura 5.1 y Foto 5.2). Estas columnas se emplearon únicamente, para evaluar la concentración de O_2 y CO_2 de los espacios intersticiales del suelo.

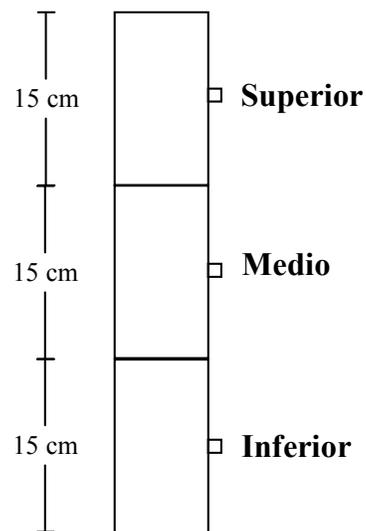


Figura 5.1. Esquema de un lisímetro o unidad experimental con tres estratos con puertos para la toma de gases



Foto 5.1. Lisímetros de 2" para la evaluación de la biodegradación de hidrocarburos



Foto 5.2. Lisímetros de 4" para el monitoreo de gases

5.4.2. Diseño experimental

Para determinar el efecto de la estimulación sobre la biodegradación de hidrocarburos por la adición de nutrientes (fertilización), inóculo (bioaugmentación) y un oxigenante, se estableció un diseño experimental factorial de tres variables independientes o factores (estimulantes), cada factor se evaluó en dos niveles: con y sin adición del estimulante. El diseño resultante, mostrado en la Tabla 5.1, fue un diseño aleatorio con arreglo factorial de 2^3 (por triplicado).

Tabla 5.1. Diseño factorial 2^3 utilizado para los lisímetros

		Oxigenante (O)			
		-		+	
		Inóculo (M)			
		-	+	-	+
Fertilización con Nutrientes (N)	-	Control	M	O	OM
	+	N	MN	ON	OMN

+ adición de estimulante; - ausencia de estimulante

5.4.2.1. Condiciones experimentales de los lisímetros

El diseño experimental de la Tabla 5.1, se desarrolló para los lisímetros de 2" y 4" de diámetro.

Se instalaron 120 lisímetros de 2" de diámetro, los cuales se emplearon para muestreos mensuales, con la finalidad de evaluar el porcentaje de biodegradación como variable de respuesta durante cinco meses de estudio. Los muestreos de los lisímetros o unidades experimentales fueron "destruictivas y sin reemplazo", por lo que se "sacrificaron" tres réplicas o unidades experimentales por tratamiento (Foto 5.1).

También, se instalaron 24 lisímetros de 4" de diámetro, que se emplearon para monitorear semanalmente la concentración de O₂ y CO₂ en el interior de las columnas (Foto 5.2).

Como prueba adicional, se evaluó el transporte de hidrocarburos a través del perfil de suelo, empleando 4 lisímetros de 2" y 4" de diámetros. Los estratos se colocaron de forma combinada, empleando suelo contaminado y no contaminado de la zona de estudio. Se determinó la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) al inicio y al final de la experimentación (Método, EPA 8015M, USEPA, 1996). La descripción de la metodología se presenta en el Anexo A.

Los lisímetros se incubaron a 30°C. Mensualmente se adicionó agua a cada estrato.

Al Inicio de la experimentación se determinó; textura, capacidad de retención de agua y densidad aparente. Semanalmente se monitoreo la concentración de O₂ y CO₂ en los espacios intersticiales del suelo. Mensualmente se evaluaron: hidrocarburos totales del petróleo, pH, humedad, fósforo, conductividad eléctrica, carbón orgánico, nitrógeno amoniacal, nitritos, nitratos, sulfatos, bacterias heterótrofas totales y bacterias hidrocarbonoclastas. Las metodologías analíticas evaluadas al suelo se resumen en la Tabla 5.2.

5.4.3. Montaje de los lisímetros y acondicionamiento de suelo

Para el montaje de los lisímetros, el suelo obtenido del campo, se homogenizó sobre un plástico (2 x 3m), se vertieron 4 cubetas de aproximadamente 20 kg de suelo por estrato. Se eliminaron de manera manual pedazos de plásticos, palos y rocas grandes. Los grumos fueron disgregados con un mazo y finalmente el suelo se mezcló usando una pala.

Tabla 5.2. Métodos analíticos

Parámetro	Método	Referencia
Hidrocarburos totales del petróleo (HTP)	Cromatografía de gases con detector de ionización de flama	EPA 8015 M USEPA (1996)
Densidad de partícula	Picnómetro	Aguilera y Domínguez, 1980
Textura	Hidrómetro Bouyoucos	Bouyoucos (1962)
Capacidad de retención de agua (CRA)	Drenado con embudo	Parent y Caron (1993)
Humedad	Gravimétrico	Topp (1993)
pH	Potenciométrico	EPA 9045 USEPA (1996)
Conductividad eléctrica (C.E.)	Conductímetro	Janzen (1993)
Materia orgánica	Walkley-Black	López y López, 1978
Carbono orgánico total (COT)	Analizador de carbono Shimadzu	EPA 9060 USEPA(1996)
Nitrógeno total	Micro-Kjeldahl	AOAC (1970)
Nitrógeno amoniacal	Electrodo de ión selectivo	ASTM D1426-98 (ASTM, 1998)
Nitritos y nitratos	Electroforesis capilar	Waters IC and CIA (2000)
Sulfatos	Electroforesis capilar	Waters IC and CIA (2000)
Fósforo	Método Bray	Bray y Kurtz (1945)
Bacterias heterótrofas totales (BHT)	Conteo en placa	Clark (1965)
Bacterias hidrocarbonoclastas (BHC)	Conteo en placa con hidrocarburo como única fuente de carbono	Clark (1965)
Oxígeno disuelto (O.D.)	Electrométrico	APHA, 1980
Medición de gases (microcosmos)	Cromatografía de gases con detector de conductividad térmica	
Medición de gases (lisímetros)	Analizador portátil con detectores infrarrojo, electroquímico compensación catalítica y conductividad térmica (INOVA y GT- CO ₂ marca Gastech)	ThermoGasTech (2001a) ThermoGasTech (2001b)

Los métodos analíticos son descritos y/o referenciados en el Anexo A

Los lisímetros fueron empacados con una densidad aparente de 1.2 g/cm³ con residuos de lodos de perforación y suelo provenientes del “perfil obtenido en campo”, más la adición de los elementos de bioestimulación que corresponde a cada estrato y tratamiento (Tabla 5.1 y 5.3).

Tabla 5.3. Cantidades de los elementos de bioestimulación y agua requerida para un lote de 3 kg de suelo

Lisímetro	2" o 4"		
	Superior	Medio	inferior
Humedad inicial (%)	9.29	12.05	11.32
CaO ₂ 0.1% (g)	3	3	3
NH ₄ Cl 20% (ml)	62	.96	95
K ₂ HPO ₄ 2% (ml)	7	11	10
Inóculo en suspensión (ml)	40	40	40
Agua (ml)	621	538	560

Las mezclas se prepararon por lotes de 3.0 kg de suelo con sus respectivos elementos de estimulación de acuerdo a su tratamiento. Una vez hecha la mezcla, ésta se adicionó en pequeñas cantidades en el interior de las columnas, por estratos de menos de 3 cm, la distribución se realizó con percusión.

Los métodos de adición de los estimulantes fueron los siguientes:

Fertilización. Se utilizó NH₄Cl al 20% como fuente de nitrógeno y K₂HPO₄ al 2% como fuente de fósforo. De acuerdo a la concentración de hidrocarburos en cada estrato de suelo, medido como HTP, se adicionó la cantidad correspondiente de NH₄Cl y K₂HPO₄ para mantener una relación inicial de C:N:P = 100:10:1.

Estas soluciones se adicionaron con el volumen final de agua. Los lisímetros se empacaron con suelo con 30% de humedad y, como cada horizonte presentó diferente humedad inicial, la cantidad de agua requerida para cada horizonte varió.

Las cantidades de los elementos de bioestimulación calculados y adicionados se muestran en la Tabla 5.3.

Oxigenante químico. Se adicionó CaO_2 al 0.1% (p/p) al suelo y se mezcló perfectamente, antes de adicionar el volumen final de agua requerida (Tabla 5.3).

Inóculo (bioaugmentación). Un volumen de 30 ml del reactor (con una cuenta de 1.3×10^8 UFC/ml) se centrifugó a 9,000 rpm 20 minutos para obtener un botón y se resuspendió en 5 ml de solución salina (0.85% de NaCl) estéril, posteriormente se adicionó con la cantidad de agua final (Tabla 5.3). El suelo bioaugmentado alcanzó 1×10^7 UFC/g SS.

5.5. Preparación y toma de muestras

Las muestras de suelo se tomaron a partir de cada estrato de los lisímetros, vertiendo el material de cada estrato sobre un contenedor de plástico, para mezclarlo posteriormente. Las muestras de suelo húmedo, fueron almacenadas en frascos de vidrio y conservadas a una temperatura de 4°C antes de su análisis. Se requirieron muestras de suelo secas para la determinación de otros parámetros, éstas se secaron a 30°C durante un periodo de 48h. Una vez secas, se trituraron y se molieron hasta grano fino. Finalmente, se almacenaron en frascos de vidrio, conservándolas a temperatura ambiente hasta el análisis.

5.6. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados del crecimiento de BHC y BHT a nivel microcosmos, degradación de hidrocarburos y formación de CO_2 en lisímetros fueron analizados mediante el paquete estadístico NCSS-2000, a través de un análisis de varianza (ANOVA), con el objetivo de determinar si existía diferencia significativa entre el control y los tratamientos, con un nivel de significancia, $\alpha \leq 0.05$.

Posteriormente, se realizó una prueba de comparación múltiple por el “método de intervalos múltiples de Duncan”, que permite identificar que tan diferentes son los tratamientos y si existe una diferencia real entre ellos, con un nivel de significancia, $\alpha \leq 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización del suelo contaminado

Las características físicas, químicas y biológicas de los estratos del suelo contaminado utilizado en este estudio se presentan en la Tabla 6.1. El suelo presentó una concentración de hidrocarburos de 11,973 mg HTP/kg SS para el estrato superior; 18,370 mg HTP/kg SS para el estrato medio; y 18,172 mg HTP/kg SS para el estrato inferior. Estas concentraciones, de acuerdo con las observaciones sugeridas por Dibble y Bartha (1979), Leahy y Colwell (1990), y McAllister *et al* (1995), podrían encontrarse por abajo de una concentración de hidrocarburos que podría limitar su biodegradación.

El perfil de hidrocarburos (Figura 6.1) no es típico de un crudo y estos están constituidos principalmente por hidrocarburos de 11 a 28 carbonos, con posibles trazas de compuestos de 32 átomos de C. La ausencia de compuestos ligeros (C <11), evidencia el estado de intemperización de los suelos; los cuales se han perdido por evaporación y degradación biótica y abiótica.

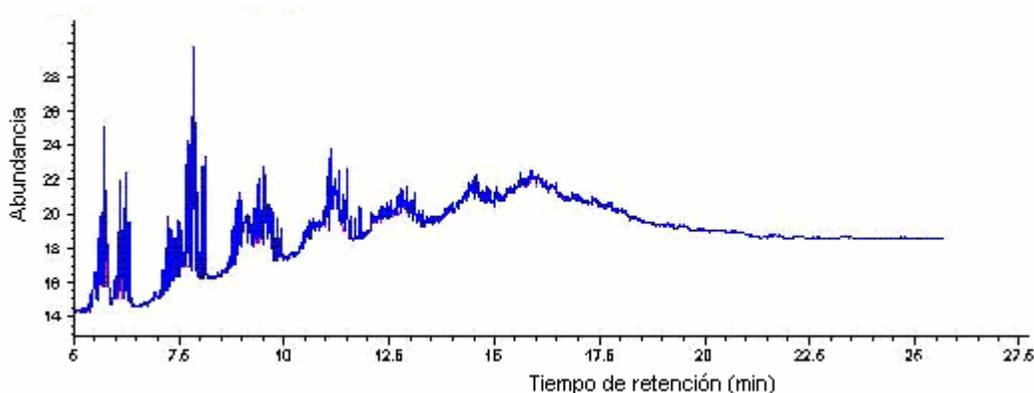


Figura 6.1. Cromatograma que presenta las fracciones de hidrocarburos en el suelo proveniente de Campo 10

Tabla 6.1. Características físicas, químicas y microbiológicas del suelo

Parámetro	Estrato superior		Estrato medio		Estrato inferior	
	Limo	Arcilla	Limo	Arcilla	Limo	Arcilla
Concentración de hidrocarburos (mg/kg SS)	11,973 (7.33)		18,370 (6.10)		18,172 (7.39)	
Densidad de partícula (g/cm ³)	2.30 (1.86)		2.28 (1.87)		2.33 (0.93)	
Textura	34%	34%	51%	17%	41%	27%
	(7.11)	(4.48)	(17.77)	(34.6)	(9.32)	(17.6)
	Franco arcillosa		Franco limosa		Franco arcillosa	
Humedad (%)	20.45 (2.89)		20.12 (1.89)		20.09 (2.72)	
pH	7.62 (0.52)		7.63 (1.17)		7.67 (0.13)	
Materia orgánica (%)	6.21 (11.3)		5.85 (10.42)		5.98 (10.91)	
Carbono orgánico (%)	3.61 (11.3)		3.40 (10.42)		3.47 (10.91)	
Nitrógeno total (%)	0.13 (1.17)		0.11 (5.37)		0.10 (8.30)	
Nitrógeno amoniacal (mg/kg SS)	6.23 (8.03)		1.55 (17.04)		1.09 (0.06)	
Fósforo (mg/kg SS)	78.68 (6.26)		74.98 (7.47)		67.83 (6.01)	
Capacidad de intercambio catiónico (meq/100g SS)	34.82 (17.29)		61.33 (3.93)		56.16 (9.35)	
Bacterias heterótrofas aerobias (UFC/g SS)	2.52 x 10 ⁷ (18.08)		4.52 x 10 ⁷ (8.99)		1.71 x 10 ⁸ (0.25)	
Bacterias hidrocarbonoclastas (UFC/g SS)	1.89 x 10 ⁷ (14.88)		1.80 x 10 ⁷ (47.06)		1.05 x 10 ⁸ (0.26)	

El valor entre paréntesis corresponde al coeficiente de variación. Las concentraciones se reportan en masa de suelo seco (SS), para poder comparar ajustes en la humedad

La textura de los estratos de suelo contaminados fueron del tipo “franco arcillosa” para el estrato superior; “franco limosa” para el estrato medio y “franco arcillosa” para el inferior (Tabla 6.1). Estos cambios de textura, a través del perfil del suelo, concordaron con los datos previos obtenidos del “Proyecto de atenuación natural”. Los tres estratos presentaron un alto contenido de arcilla, con presencia de limo y escasez de arena que puede limitar la transferencia de fluidos, evitando una adecuada aireación (Jury, 1986). Sin embargo, la presencia de limos permite un

incremento en la capacidad de retención de agua, brindando la posibilidad de ajustar la humedad y la adición de nutrientes en solución, para favorecer el crecimiento de bacterias en la matriz del suelo (Song, 1990; Frankenberger, 1992).

Las densidades de partícula o densidad real para los tres estratos se mantuvieron en valores de 2.28 a 2.33 g/cm³. Estos valores son bajos para suelos típicos encontrados en la zona vadosa (Jury, 1986); siendo representativos de la región de suelos minerales de arcilla (Porta *et al.*, 1994; Juma, 1998).

El pH del suelo no varió entre los estratos, manteniéndose entre 7.62 a 7.67. Este intervalo es adecuado para el crecimiento de bacterias, que es preferentemente entre 7.0 y 8.0 (Pelczar *et al.*, 1982), por lo que no se requirió ajustar el pH en los sistemas de estudio. La presencia de hidrocarburos en suelo, durante largos periodos, puede producir una variación del pH original del suelo (Bossert y Bartha. 1984; Block *et al.*, 1989). Esto posiblemente por la producción de CO₂ y ácidos orgánicos (Gordon *et al.*, 1980).

Debido a que en el campo de la biodegradación de hidrocarburos, todavía no se cuenta con información de una clasificación generalizada de suelos por el contenido de nutrientes, se empleó la nominación para suelos con base en un criterio de fertilidad en el área agrícola (Tabla 6.2). Un respaldo para el empleo de dicha nominación es la relación directa que existe entre la actividad microbiana del suelo y su fertilidad, desde el punto de vista agrícola (Porta *et al.*, 1994).

Tabla 6.2. Nominación para suelos típicos

Nominación	Materia orgánica¹ (%)	Nitrógeno^{2,3} (%)	Fósforo⁴(mg/kg)
Extremadamente pobre	0 – 0.2	< 0.032	
Pobre	0.8 – 2.0	0.032 - 0.063	< 15
Regular	2.0 – 4.0	0.064 – 0.095	15 –30
Medianamente rico	4.0 – 8.0	0.096 - 0.126	
Rico	8.0 – 15.0	0.127 – 0.158	>30
Muy rico	15.0 - 30.0	0.159 - 0.221	
Extremadamente rico	> 30.0	> 0.221	

¹ Aguilera, 1989; ² Vázquez y Bautista, 1993; ³ Tavera, 1985; y ⁴ D.O.F., 2002a

De acuerdo con esta nominación, los tres estratos corresponden a suelos medianamente ricos en contenido de materia orgánica. Cabe destacar que los hidrocarburos representa un aporte de carbono, lo que incrementaría el contenido de carbono orgánico y por ende de materia orgánica. El contenido medio de materia orgánica puede representar una reserva de nutrientes esenciales que se liberan durante su descomposición.

En cuanto a otros nutrientes, el suelo del estrato superior fue rico en nitrógeno (0.13%) y los estratos medio e inferior fueron medianamente ricos (0.11 y 0.10% respectivamente). Mientras que en fósforo, los tres estratos fueron muy ricos (78, 74 y 67 mg P/Kg SS, respectivamente). A pesar que los suelos, por sus características, se clasifican como fértiles, se consideró la estimulación con fuentes de nitrógeno y fósforo, para cubrir el desbalance debido, posiblemente a la presencia del hidrocarburo (sustrato rico en carbono).

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) correspondió a valores altos (Tabla 6.1), característicos de suelos arcillosos (Brady y Weil, 1999), con una alta capacidad de retención de nutrientes esenciales, que en la solución pueden ser asimilados por parte de los microorganismos. Obire y Nwaubeta (2002), al evaluar el efecto de los hidrocarburos en un suelo (franco-arenoso) reportaron valores de CIC menores a los obtenidos en este trabajo, e incluso lo definieron como “suelo fértil”.

Las cuentas de bacterias hidrocarbonoclastas (BHC), presentaron valores típicos de suelos contaminados con microorganismos adaptados. Según Atlas (1981), las cuentas de bacterias degradadoras en suelos no contaminados varía de 1.0×10^5 a 1.0×10^6 y para los contaminado de 1.0×10^6 a 1.0×10^8 UFC/g. Las cuentas de BHC observadas en los tres estratos contaminados (1.80×10^7 a 1.05×10^8 UFC/g) corresponden a una población alta, que se podría considerar como adaptada, típica de suelos con presencia de hidrocarburos durante periodos prolongados, que en este caso fueron dos décadas. Incluso, estas cuentas corresponden con valores

reportados para poblaciones microbianas bajo condiciones de estimulación de degradación o, adaptadas por largos periodos de exposición (Atlas, 1981; Pritchard *et al.*, 1992; Fiorenza y Ward, 1997; Kanaly *et al.*, 1997). También se observó que la población hidrocarbonoclasta representó un alto porcentaje con respecto de la población heterótrofa total, con 75, 40 y 61% para los estratos superior, medio e inferior, respectivamente. De acuerdo con las recomendaciones reportadas en la literatura estos niveles corresponden a suelos con alto potencial de biodegradación (Walker y Colwell, 1976; Bossert y Bartha, 1984; Huesemann, 1994).

6.2. Diseño de lisímetros

El empleo de lisímetros para suelos contaminados con residuos de lodos de perforación, puede presentar problemas debido al alto contenido de arcillas de los residuos. De acuerdo con los lineamientos técnicos de la OECD (2000), no es recomendable emplear lisímetros con suelos arcillosos, debido a la propiedad que tienen las arcillas de contraerse y formar espacios por microfracturas del núcleo y/o por la separación entre la pared de la columna del suelo. Esto provoca el movimiento rápido por “corto circuito” del agua y solutos directamente al fondo de los lisímetros.

Para minimizar el efecto de la contracción de arcillas se recomienda diseñar a los lisímetros con paredes ásperas, para un mejor contacto y retención de las arcillas a la pared (Smajstrla, 1985 en Corwin, 2000). Otras recomendaciones, que implican alteraciones mínimas de los lisímetros y de sus patrones de flujo, son la instalación de barreras y la incorporación de añillos anulares (Brown *et al.*, 1985 en Corwin, 2000).

Con el objetivo de reducir el efecto de la contracción del núcleo se diseñaron los lisímetros con paredes ásperas internas a través del lijado del PVC. Este material fue más manipulable, resistente y presentó mayor contacto con el suelo, que el vidrio y acero inoxidable evaluados. Así también se desarrolló un procedimiento de

empacado manual con aplicación de delgadas capas de suelo que permitió mejorar el contacto entre el suelo y las paredes, así como reducir las posibilidades de fractura del suelo, por un depósito uniforme del material, sin gradientes de humedad (asociadas a la formación de fracturas). Procedimientos similares de empacado manual en la evaluación de la biodegradación de hidrocarburo se ha reportado previamente (De Jonge *et al.*, 1997; Ripp *et al.*, 2000).

Para confirmar que las adecuaciones del diseño del lisímetro disminuyeron el efecto de contracción de las arcillas, se realizó una prueba con un trazador no reactivo. En la Figura 6.2, se observa el movimiento de la solución a través de la columna de suelo, que representa una curva de concentración típica de un pulso de avance sin la presencia de microfracturas en el interior de la columna de suelo que pudiera afectar la difusión normal de fluidos.

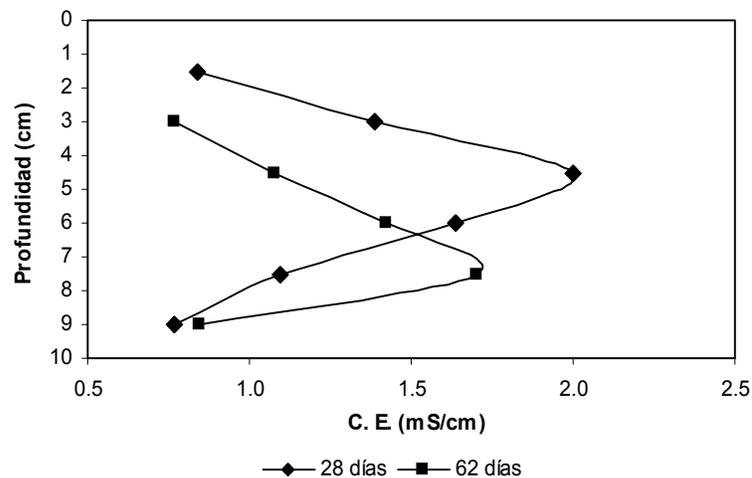


Figura 6.2. Curva de avance del trazador no-reactivo en la columna de suelo

La curva de avance del trazador, también mostró la imposibilidad de emplear una “aireación forzada” debido a la baja permeabilidad del suelo (4.2 cm/mes), así

mismo, para determinar que la adición de los nutrientes se debería realizar antes del empaçado, adicionando los nutrientes y oxigenante al suelo y homogenizar.

6.3. Pruebas preliminares (nivel microcosmos)

6.3.1. Selección del oxigenante y concentración

Debido a las propiedades arcillosas del suelo, es difícil aplicar una técnica de bioventeo efectiva, por tratarse de suelos altamente impermeables (Leeson y Hinchee, 1997). A través de pruebas cualitativas en laboratorio, se demostró que la aplicación de aire con sopladores y compresores, sobre las columnas empaçadas con suelos arcillosos, produce la fractura del núcleo (suelo poco compacto) o la expulsión del núcleo (muy compactos) antes que el aire se difunda entre los espacios intersticiales.

De esta manera, se encontró que no era factible la “aireación forzada”, considerando como método alternativo de aireación la adición de peróxidos de metales primarios. Éstos, por su baja solubilidad, limitan su reacción y por consiguiente disminuye la velocidad de producción de oxígeno. Estos peróxidos reaccionan de acuerdo con la siguiente ecuación (ejemplificada para peróxido de calcio):



Un problema que se puede observar en la reacción anterior es la formación de un hidróxido que puede incrementar el pH por arriba del requerido para las bacterias (de 7 a 8) y la formación de sales como subproducto de la reacción con compuestos ácidos. Es por esto que se cuantificaron el efecto del oxigenante sobre dichos parámetros durante la selección del mismo.

Inicialmente se evaluó el oxígeno disuelto generado por los oxigenantes en medio líquido. Los peróxidos generaron más oxígeno disuelto en el líquido, que lo que

aporta el aire. De los peróxidos probados, el CaO_2 generó una mayor concentración de O.D. que la producida por el BaO_2 (Figura 6.3).

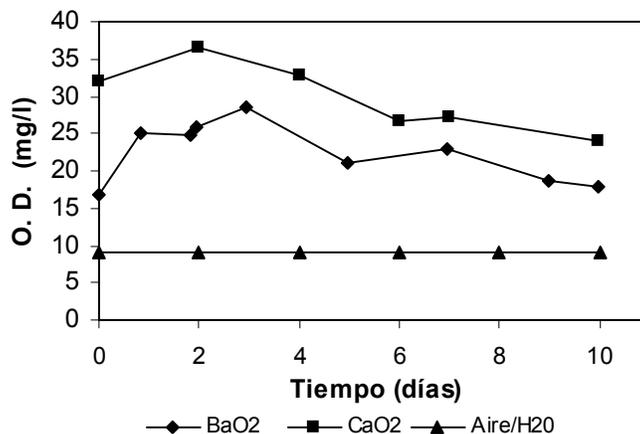


Figura 6.3. Cinética de producción de oxígeno disuelto (O. D) a partir de peróxidos en medio líquido

Ambos compuestos, el BaO_2 y CaO_2 , inicialmente incrementaron el pH del medio líquido de 6.5 hasta 13.2 y 12, respectivamente, al final (10 días) se incrementó 0.4 y 0.6 unidades más (Figura 6.4).

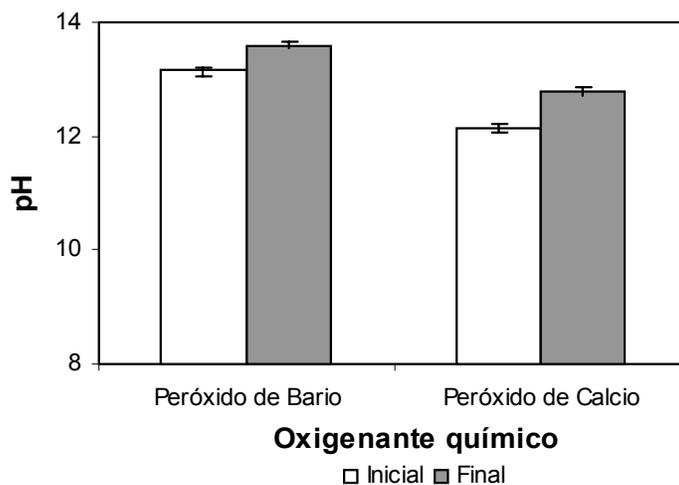


Figura 6.4. Efecto de los oxigenantes químicos en el pH en medio líquido
Basándose en lo anterior, se seleccionó al peróxido de calcio como oxigenante, debido a la mayor liberación de oxígeno de manera prolongada. Otra consideración fue que en el suelo existieron altas concentraciones de bario (10 000 – 40 000 mg/kg

SS), proveniente del sulfato de bario, que se encuentran por arriba del límite establecido por PROFEPA (2000). Aunado a lo anterior, el CaO_2 es al menos ocho veces más barato que los otros peróxidos de metales primarios.

Debido a que los peróxidos presentan un efecto "desinfectante", es decir de inhibición del crecimiento de bacterias (Pardieck *et al.*, 1992), se determinó la concentración que permitiera la mayor estimulación de la biodegradación, pero sin inhibir a las bacterias. Para lo anterior, se consideraron algunos reportes que recomiendan una concentración máxima de 0.3% (p/p) (Hince, 2002); 2-6 g/cm^3 de suelo equivalente a 0.12 a 0.36% (p/p) (FMC, 2002); y 1.650 lb/200 ORC equivalente a 0.008% (p/p) (Regenesis, 2002). De esta manera, se evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de peróxidos 0, 0.1, 0.5 y 1% (p/p) sobre el crecimiento bacteriano en suelo.

La adición de 0.1% de CaO_2 en el suelo, estimuló significativamente el crecimiento de bacterias hidrocarbonoclastas aerobias después de ocho días (Figura 6.5). Sin embargo, concentraciones mayores (0.5 y 1%) no estimularon el crecimiento, no obstante no hubo un efecto inhibitorio; la población no fue menor a la inicial o a la del control. Resultados similares se observaron para las bacterias heterótrofas (Figura 6.6).

De acuerdo con la cinética de consumo o liberación de O_2 en los microcosmos (Figura 6.7) la adición de CaO_2 (0.5 y 1%) incrementó el O_2 en el "headspace", mientras que la adición de CaO_2 (0.1%) presentó una disminución de O_2 , esto debido, probablemente al incremento en la actividad biológica.

Igualmente, la concentraciones de 0.5 y 1% de CaO_2 , no estimularon la producción de CO_2 , sin embargo, con 0.1%, si se estimuló la producción de CO_2 , pero sin diferencias significativas con el control.

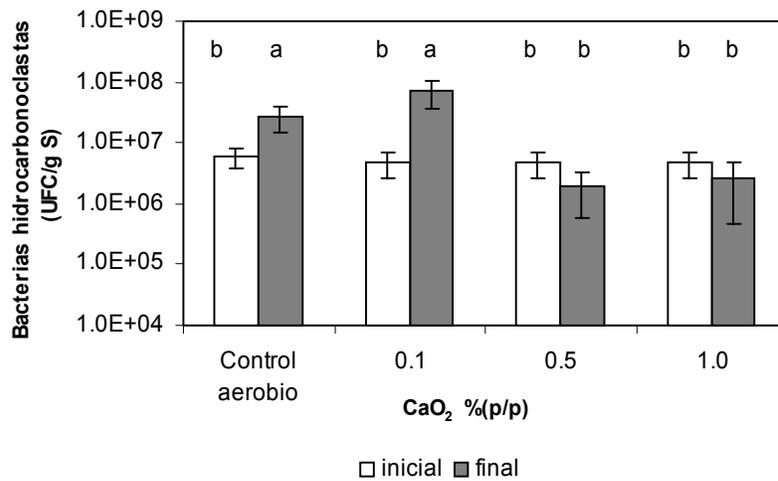


Figura 6.5. Efecto de la concentración de CaO₂ en la población de bacterias hidrocarbonoclastas aerobias (las barras muestran la desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias significativas)

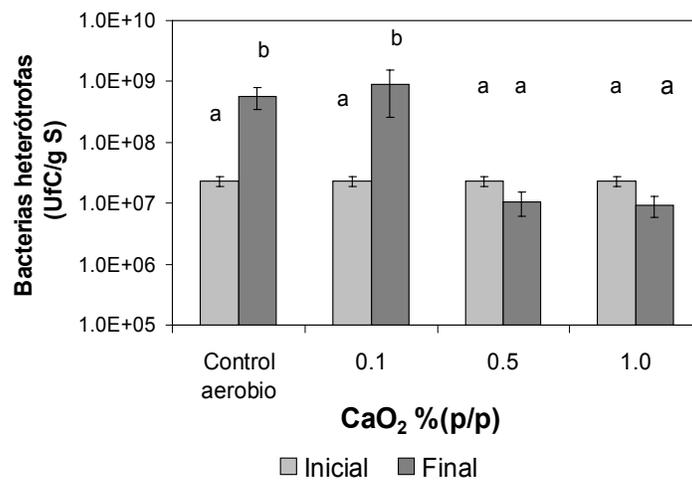


Figura 6.6. Efecto de la concentración de CaO₂ en la población de bacterias heterótrofas aerobias (las barras muestran la desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias significativas)

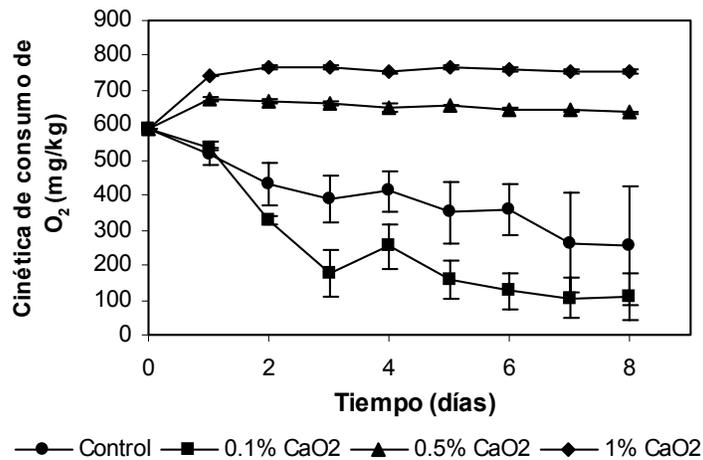


Figura 6.7. Efecto de la concentración de CaO₂ en el consumo de O₂ en microcosmos (las barras muestran la desviación estándar)

La adición de CaO₂ al suelo incrementó el pH de 7.65 a 8.62 para 0.1 % de CaO₂; a 9.95 para 0.5%; y a 10.43 para 1%, esto debido a la formación de hidróxido de calcio. Sin embargo, el pH disminuyó a los ocho días de experimentación (Figura 6.8), posiblemente debido a la formación de ácidos orgánicos producto de la actividad metabólica, así como la generación de CO₂ que se disuelve formando carbonatos y bicarbonato. El CaO₂ a 0.1% (p/p) presentó un intervalo de pH cercano al óptimo para el crecimiento de bacterias.

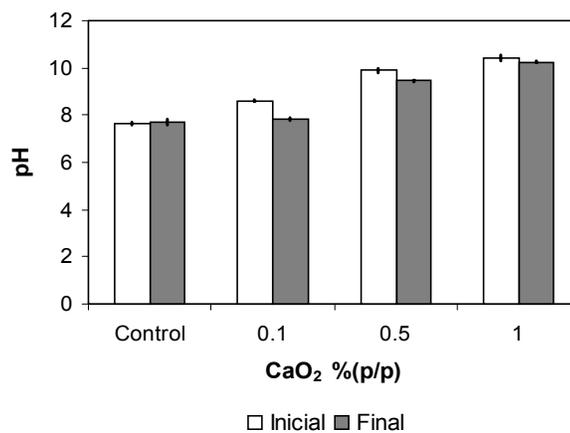


Figura 6.8. Efecto de la concentración de CaO₂ en el pH del suelo (las barras muestran la desviación estándar)

No se encontró ningún efecto del CaO_2 sobre la conductividad eléctrica (C. E.), con las tres concentraciones probadas (Figura 6.9). El aumento de la conductividad en los tratamientos fue consecuencia de las sales inorgánicas adicionadas al suelo, con el fin de estimular el desarrollo bacteriano.

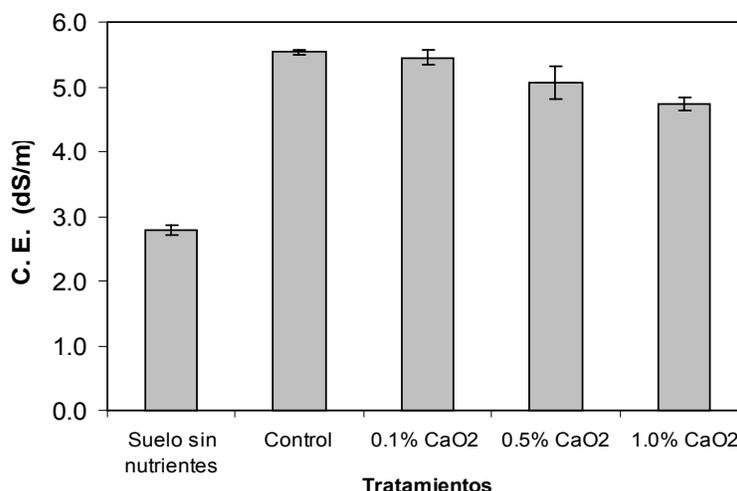


Figura 6.9. Efecto de los nutrientes y la concentración de CaO_2 en la conductividad eléctrica (las barras muestran la desviación estándar)

Basándose en los resultados de estimulación de crecimiento bacteriano, producción de oxígeno disuelto, menor aumento de pH en el suelo, se seleccionó la concentración de 0.1% (p/p) de CaO_2 , para su adición como oxigenante en los estudios en columnas de suelo.

6.3.2. Evaluación del inóculo en medio líquido

A partir del suelo contaminado, se obtuvo un preinóculo (1.5 L) con bacterias autóctonas hidrocarbonoclastas que fue capaz de crecer en un medio mineral mínimo con petróleo como única fuente de carbono y energía. Después de una selección por enriquecimiento en varios pasos consecutivos, se obtuvo una población heterótrofa que en su totalidad era hidrocarbonoclasta, la cual presentó una fase exponencial de siete días. A partir de este cultivo se arrancó un reactor de 20 L.

No existió diferencia significativa ($\alpha \leq 0.05$) entre las cuentas de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas en el preinóculo -inóculo en medio líquido-. La similitud entre las cuentas de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas asegura que toda la población o la mayoría es hidrocarbonoclasta, permitiendo determinar las bacterias hidrocarbonoclastas como heterótrofas; reduciendo el tiempo de 7 días a 24 horas.

Para asegurar que la concentración de amonio en el medio no fuera un factor limitante para el crecimiento del preinoculo, se determinó el amonio en el medio. Después de 7 días, el amonio se consumió en un 32%, quedando una concentración final a 340 mg/L.

6.3.3. Evaluación de la bioaumentación en muestras de suelo

El efecto del inóculo en suelo a nivel microcosmos sobre el crecimiento microbiano se presenta en la Figura 6.10. Los suelos inoculados presentaron un incremento en 2 órdenes de magnitud de bacterias hidrocarbonoclastas, después de 8 días. El incremento en la biomasa se presentó, incluso, en un suelo con cuenta inicial alta (1.9×10^7 UFC/g SS).

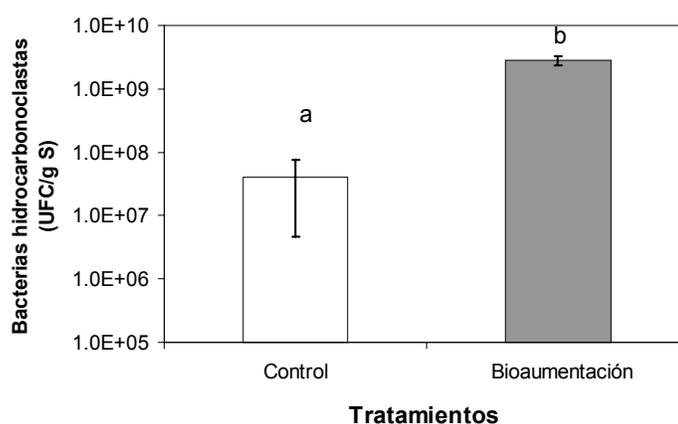


Figura 6.10. Efecto de la bioaumentación en muestras de suelo a nivel microcosmos (las barras muestran la desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias significativas)

Phelp *et al* (1994), reportaron en estudios con columnas de suelo, que la adición de microorganismos autóctonos incrementó lentamente la concentración de bacterias hidrocarbonoclastas. Resultados similares, fueron encontrados en estudios de bioaugmentación en lisímetros a nivel de laboratorio por Imamura *et al* (1997), reportando un aumento en la cuenta de la cepa JMI en dos ordenes de magnitud.

6.3.4. Selección de nutrientes; evaluación de la fertilización

Con la finalidad de estimular la biodegradación de los hidrocarburos, se seleccionaron dos macronutrientes (nitrógeno y fósforo), que se reportan en la literatura como algunos de los principales factores que favorecen la actividad de biodegradación (Bossert y Bartha, 1984; Leahy y Colwell, 1990; Van Hamme *et al.*, 2003). Estos se requieren debido al desbalance de nutrientes que ocurre en el suelo como consecuencia del aporte de carbono proveniente de los hidrocarburos. Bragg *et al* (1994), reportaron que la adición adecuada de nutrientes (N y P) incrementa la biodegradación al menos en un factor de cinco.

Los fertilizantes orgánicos fueron descartados en este estudio debido al aporte de una fuente de carbono adicional (Jackson y Pardue, 1999; Mohn y Steward, 2000). De la misma forma, los compuestos iónicos que podrían tener un papel como aceptor de electrones (NO_3^- , SO_4^{2-}) se descartaron con el fin de evaluar únicamente el efecto del nutriente.

Se decidió utilizar como fuente de nitrógeno a una sal de amonio por ser una forma fácilmente asimilable (Frankenberger, 1992; Walworth y Reynolds, 1995). Su utilización no requiere oxidación o reducción, debido a que el nitrógeno en las células (aminoácidos, purinas y pirimidinas) está también en forma de amonio (Gaudy y Gaudy, 1981). Por el contrario el nitrato se debe reducir primero a amonio antes de incorporarse a los aminoácidos (Paul y Clark, 1989; Walworth y Reynolds, 1995).

Incluso el número de bacterias capaces de asimilar directamente nitrógeno a partir del amonio es mayor comparado con aquellas que pueden reducir los nitratos (Gaudy y Gaudy, 1981).

El empleo de sales de amonio, para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos lo reportan un importante número de autores (Leahy y Colwell, 1990; Montemagno *et al.*, 1993), y en especial se reporta el uso de cloruro de amonio (Dibble y Bartha, 1979; McAllister *et al.*, 1995; Jackson y Pardue, 1999; Zegarra, 2000). Cabe mencionar que se han empleado otras fuentes de amonio, como sulfato que se descartaron por su función como aceptor de electrones (Atlas, 1981; Frankenberger, 1992).

Para este estudio en particular, se seleccionó al NH_4Cl por ser una forma soluble y disponible en el mercado, la cual ha sido evaluada en otros estudios como una de las sales de nitrógeno amoniacales más recomendables (Frankenberger, 1992; Walworth y Reynolds, 1995; Jackson y Pardue, 1999). Hunt *et al* (1973), reportaron que a nivel microcosmos, durante 30 días, el NH_4Cl favoreció la actividad de biodegradación cinco veces más que el NH_4NO_3 y ligeramente mejor que el NaNO_3 . Mientras que un estudio más reciente Jackson y Pardue (1999), demostró que el NH_4Cl fue más efectivo para estimular la biodegradación requiriendo sólo el 20% de la concentración de KNO_3 para alcanzar el mismo efecto.

Para el caso del fósforo, las sales inorgánicas se han utilizado para fomentar la biodegradación de hidrocarburos en suelo comúnmente incluye a los fosfatos mono y dibásicos; siendo la sal de fosfato más comúnmente empleada el K_2HPO_4 (Dibble y Bartha, 1979; Mills y Frankenberger, 1994; Jackson y Pardue, 1999).

El fosfato de potasio dibásico, se eligió por ser una fuente comercial soluble. El fosfato de amonio se descartó debido a que el aporte del P era tres veces mayor al de N, mientras que el nitrógeno amoniacal se requirió arriba de 36 veces que el

fosfato, esto complicaba los cálculos experimentales y no ofrecía ninguna ventaja práctica.

Así se evaluó, durante ocho días a nivel microcosmos, el efecto de la estimulación con nutrientes sobre la población microbiana del suelo. Se adicionó al suelo 1,704 mg NH_4/kg SS (como NH_4Cl) y 31.60 mg PO_4/kg SS (como K_2HPO_4) (C:N:P = 100:10:0.1).

Como se observa en la Figura 6.11, se presentó un incremento de la cuenta de bacterias hidrocarbonoclastas aerobias en 2 órdenes de magnitud por la estimulación con nutrientes. De esta manera, se seleccionó al NH_4Cl y K_2HPO_4 como fuente de N y P para estimular la biodegradación de hidrocarburos en los estudios en columnas de suelo.

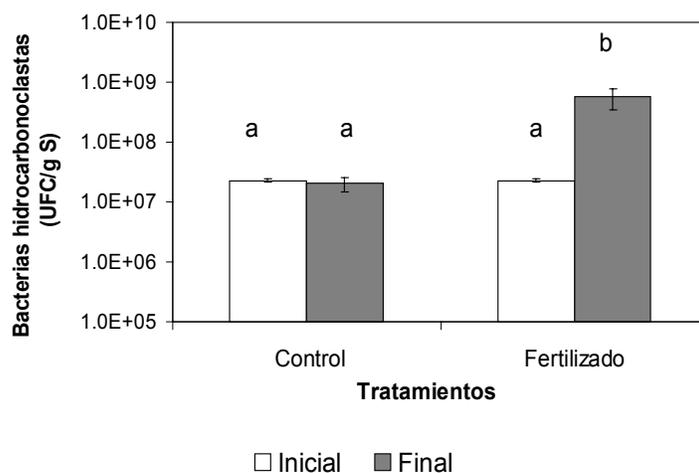


Figura 6.11. Efecto de los nutrientes en la cuenta de bacterias hidrocarbonoclastas en muestras de suelo a nivel microcosmos (las barras muestran la desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias significativas)

Con base en lo anterior, se diseñó un lisímetro como modelo de estudio, con paredes internas ásperas que minimizan la contracción del suelo arcilloso. Ante la dificultad de emplear aireación forzada se seleccionó un oxigenante químico el CaO_2 a una concentración de 0.1% (p/p). Se eligió al NH_4Cl y al K_2HPO_4 como fuente de N y P

respectivamente, a una relación N:P = 10:1 para estimular la degradación de hidrocarburos. Se obtuvo un inóculo de bacterias hidrocarbonoclastas que crecieron en medio líquido con crudo como única fuente de carbono y energía, a partir del suelo de estudio, el cual se empleó para bioaumentar las columnas de suelo.

6.4. Estudio de estimulación de suelos en lisímetros (nivel mesocosmos)

6.4.1. Transporte de hidrocarburos en los lisímetros

La evaluación del transporte de hidrocarburos a través de los lisímetros, empleando estratos con suelo contaminado de residuos de lodos de perforación y suelo limpio de la zona, determinó que los hidrocarburos no migran entre los estratos y la concentración de hidrocarburos adheridos a las paredes internas de PVC fue despreciable (menor a 0.7%). Por lo anterior, la disminución de hidrocarburos es atribuible a la biodegradación.

6.4.2. Efecto de la estimulación en la biodegradación de hidrocarburos

La disminución de la concentración de hidrocarburos a través de cinco meses, se muestra en la Figura 6.12. Las cinéticas de biodegradación de los diferentes tratamientos (tres factores y sus interacciones) fueron similares durante todo el periodo experimental; sin embargo, estas sí se diferencian del sistema no estimulado o control.

Los valores promedio de biodegradación obtenidos para el quinto mes en el estrato superior fue entre el 48 y 75% (equivalente a una eliminación de 5,747 a 8,981 mg HTP/kg SS respectivamente); entre 49 y 71% (8,266 a 13,042 mg HTP/kg SS) para el estrato medio; y entre 40 y 60% (7,269 a 10,903 mg HTP/kg SS) para el estrato inferior (Tabla 6.3).

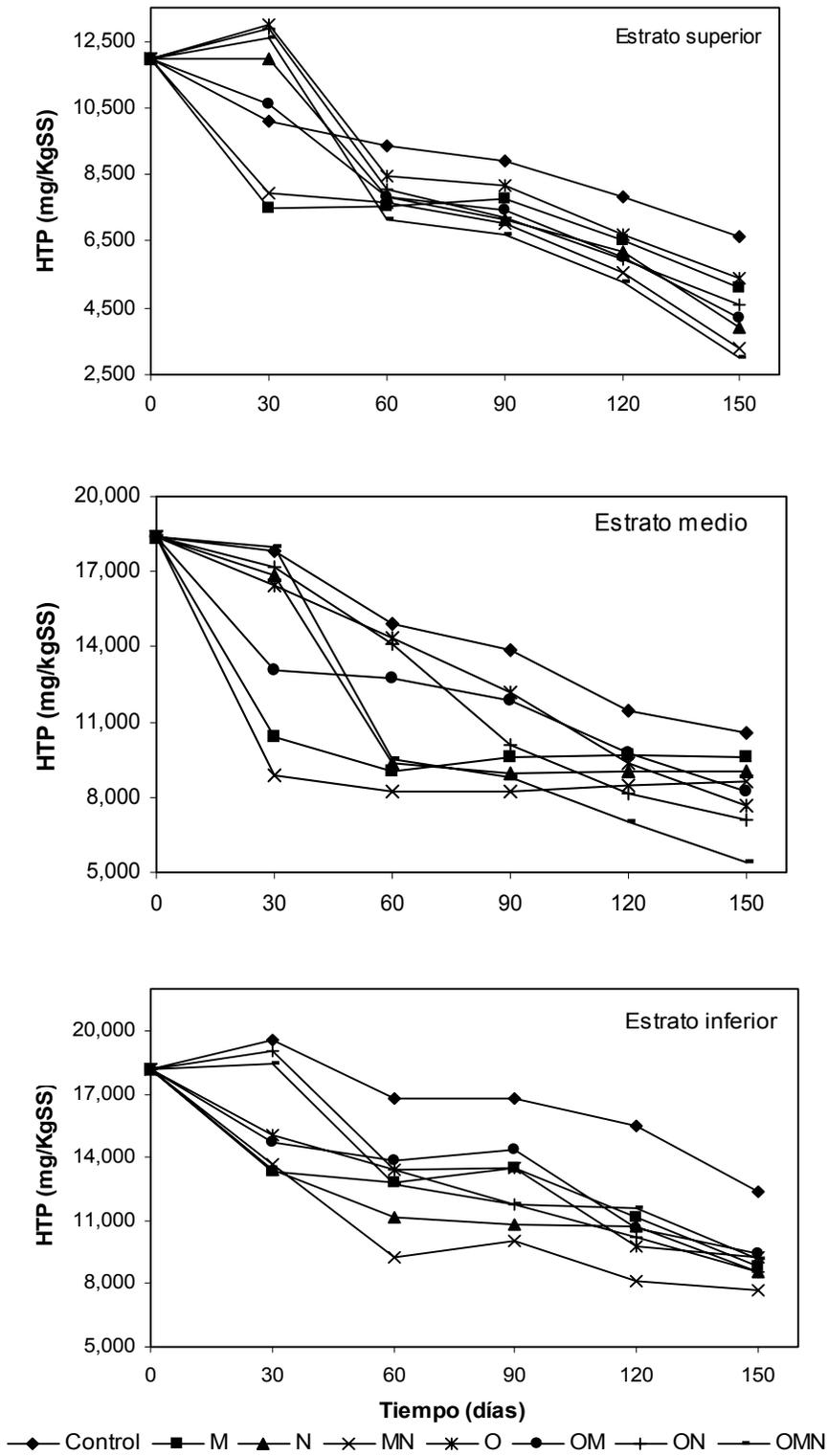


Figura 6.12. Cinética de degradación de hidrocarburos en la columnas de suelo (M, inoculadas; N, nutrientes; O, oxigenante)

Tabla 6.3. Biodegradación de hidrocarburos (%) para cada estrato, después de 5 meses de experimentación

Tratamiento	M	N	O	Estratos		
				Superior	Medio	Inferior
Control	-	-	-	48.18 (11.33)	44.87 (27.48)	39.94 (21.81)
M	+	-	-	57.13 (2.05)	47.83 (5.13)	51.34 (18.06)
N	-	+	-	67.06 (0.69)	51.03 (5.76)	53.00 (10.45)
MN	+	+	-	72.72 (5.87)	53.18 (3.94)	60.23 (10.90)
O	-	-	+	55.03 (14.53)	55.91 (2.13)	48.58 (2.78)
MO	+	-	+	65.00 (0.94)	55.19 (7.31)	48.17 (2.10)
NO	-	+	+	61.77 (3.74)	57.09 (10.61)	53.03 (3.20)
MNO	+	+	+	74.88 (4.72)	70.74 (5.83)	49.47 (2.64)

“+” adición de estimulante; “-” sin adición de estimulante. **M** = Inoculadas; **N** = Nutrientes; y **O** = Oxigenante. Los valores corresponden a los promedios en base seca, mientras que el valor entre paréntesis corresponde al coeficiente de variación.

La mayor degradación de hidrocarburos, que fue de 75%, se puede considerar relativamente alta; tomando en cuenta el tipo de sistema que se empleó: un suelo con alto contenido de arcilla y presencia de hidrocarburos intemperizados y de peso molecular relativamente alto. La OECD (2000), no recomienda emplear lisímetros con suelos arcillosos para estudios de biorremediación; por otra parte, se ha demostrado que la biodegradación de hidrocarburos intemperizados y/o de alto peso molecular es limitada (EPA; 1993, 1999); no obstante, en este trabajo se obtuvieron resultados alentadores. Otros niveles de degradación obtenidos en estudios de biorremediación a través de columnas de suelo o lisímetros se presentan en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Estudios de biorremediación en columnas de suelo o lisímetros

Biodegradación	Estudio	Contaminante	Textura	Referencia
40% (7 semanas)	Columnas de suelo en laboratorio	36,000 mgHTRP/kgS	Arena de coral	Phelps <i>et al</i> (1994)
50% (12 semanas)	Columnas de suelo en laboratorio	Destilados 50,000-135,000 mg/kgS	36% arena 40% limo 24% arcilla	Song y Bartha (1990)
67% (6 meses)	Columnas de suelo en laboratorio	Creosote oil 6.300 mgHPA/kgS	Suelo arenoso	Breedvel y Briseid (1993)
72% (3 meses)	Columnas de suelo en laboratorio	Residuos de refinería 130,000 mgHTRP/kgS	Suelo arenoso	Frankenber <i>et al</i> (1997)
64% -estrato A 86% -estrato B (20 meses)	Lisímetros en campo	Crudo oil 4,000 mgHTP/kgS	73% arena 19% limo 8% arcilla	De Jonge <i>et al</i> (1997)
72-89% (9 semanas)	Lisímetros en campo	Crudo oil 12,749 mgHTP/kgS	76% arena 6% limo 17% arcilla	Odokuma y Dickson (2003)
84% (12 semanas) 95% (20 semanas)	Lisímetros en campo	Diesel oil 60,000 mgHPA/kgS	68% arena 16% limo 16% arcilla	Wang <i>et al</i> (1990)
50-85% (primeras semanas) 95 % (9 meses)	Lisímetros en campo	Combustible diesel 10,000 mg/kgS	Suelo arenoso	Grundmann y Jürgen (1991)

Song y Bartha (1990), reportaron degradaciones de hidrocarburos de 50% en un suelo franco arcilloso, en sistemas de columnas, después de 12 semanas de experimentación. Se han reportado porcentajes de degradación más altos (hasta 95%), pero en periodos más prolongados y en sistemas de suelos arenosos, que favorece las condiciones de estimulación; control de humedad, adición de nutrientes, adición microorganismos e implementación de mecanismos de aireación (Wang *et al.*, 1990; Grundmann y Jürgen, 1991).

6.4.2.1. Biodegradación en el estrato superior

La cinética de biodegradación de hidrocarburos para los tratamientos (factores e interacciones) para el estrato superior durante 5 meses de experimentación, se

presenta en la Figura 6.12. Todos los tratamientos y el control presentan disminución de hidrocarburos. Sin embargo, no existe diferencia significativa entre los tratamientos, pero si entre estos y el control ($\alpha \leq 0.05$) (Tabla 6.5)

La prueba de intervalos múltiples de Duncan determinó que los tratamientos con interacción MN y MNO tuvieron un efecto significativo ($\alpha \leq 0.05$) sobre la de degradación de hidrocarburos, con 72.72 y 74.88 % respectivamente (Tabla 6.5).

Tabla 6.5. Método de intervalos múltiples de Duncan para el estrato superior

Tratamientos	n	Media para grupos homogéneos				
		a	b	c	d	e
Control	3	48.18				
O	2	55.02	55.02			
M	3		57.13			
NO	3		61.77	61.77		
MO	3			65.00		
N	3			67.06	67.06	
MN	3				72.72	72.72
MNO	3					74.88

Término de significancia; $\alpha \leq 0.05$

Los tratamientos MN y MNO se encuentran en el mismo grupo homogéneo, indicando que cualquier de los dos puede ser utilizado con buenos resultados. Como criterio de selección o discernimiento entre estos, se puede considerar que como la adición de oxigenante no tuvo un efecto significativo, la mejor opción sea el tratamiento MN, descartando el tratamiento MNO.

La falta de efecto significativo de la adición del oxigenante en el estrato superior se puede atribuir a que los primeros 15 cm pudieron presentar aireación, por la difusión de gases. Esto, a pesar que la capa superior del lisímetro se encontraba cerrada para reducir la pérdida de humedad a 30°C. Así, se considera factible la transferencia de oxígeno a través del estrato, disminuyendo el efecto del oxigenante.

El control (sin estimulación) presentó el menor porcentaje de biodegradación (48%) de todos los lisímetros. Las diferencias de los porcentajes de degradación entre

tratamientos, se muestran con barras de los promedios de degradación para cada tratamiento en la Figura 6.13.

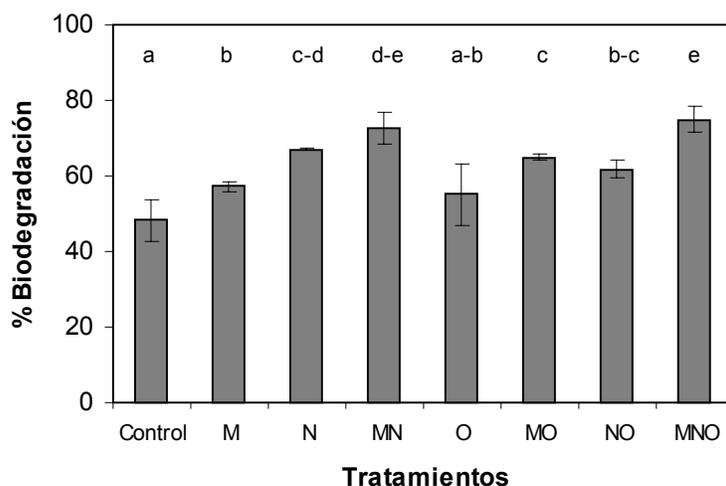


Figura 6.13. Biodegradación de hidrocarburos en el estrato superior (las barras representan la desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias significativas)

6.4.2.2. Biodegradación en el estrato medio

La cinética de degradación de hidrocarburos en el estrato medio, durante 5 meses de experimentación, se presenta en la Figura 6.12, de igual manera, que en el estrato superior el comportamiento de los tratamientos fue similar y no hubo diferencia significativa entre ellos a excepción del control. La prueba de intervalos múltiples de Duncan indicó que el tratamiento con interacción MNO tuvo efecto significativo ($\alpha \leq 0.05$), siendo éste el que presentó la mayor biodegradación de hidrocarburos (70.74%), (Figura 6.14).

En el estrato superior el mejor tratamiento fue el MN y MNO, en este caso fue el MNO, lo que evidencia que la adición de nutrientes-microorganismos, aumenta la actividad microbiana de degradación de hidrocarburos, lo que incrementa la demanda de oxígeno.

En el estrato medio, el efecto del oxigenante en la degradación de hidrocarburos fue mayor al encontrado en el estrato superior, esto puede deberse a que a diferencia del estrato superior, en este si se utiliza y/o requiere del oxigenante por no haber transferencia de oxígeno atmosférico, como podría ser el caso del estrato superior.

La biodegradación de hidrocarburos en el control fue significativamente menor ($\alpha \leq 0.05$) que los tratamientos estimulados, con un promedio de degradación de 44.87% (Figura 6.14).

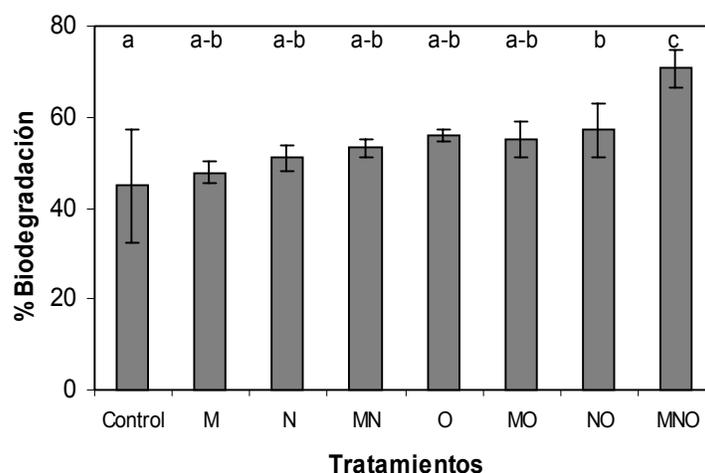


Figura 6.14. Biodegradación de hidrocarburos en el estrato medio (las barras representan la desviación estándar y las letras diferentes indican diferencias significativas)

6.4.2.3. Biodegradación en el estrato inferior

En el estrato inferior el comportamiento de las cinéticas fue similar a los superiores y solo se encontró diferencia significativa entre el control y los tratamientos ($\alpha \leq 0.05$). Posteriormente, la prueba de intervalos múltiples de Duncan, mostró diferencia entre los tratamientos que presentaron un efecto significativo ($\alpha \leq 0.05$) sobre la biodegradación de hidrocarburos (Tabla 6.6).

Tabla 6.6. Método de intervalos múltiples de Duncan para el estrato inferior

Tratamientos	n	Media para grupos homogéneos		
		a	b	c
Control	3	39.94		
MO	3	48.17	48.17	
O	2	48.57	48.57	
MNO	3	49.47	49.47	49.47
M	3		51.34	51.34
N	3		53.00	53.00
NO	3		53.03	53.03
MN	3			60.23

Alfa \leq 0.05

Con el fin de determinar, que factor pudiera diferenciar “el” o “los” tratamientos mas eficientes en el estrato inferior; se recurrió a un ANOVA adicional y una prueba de comparación múltiple de Duncan, considerando únicamente el efecto de los tratamientos sin interacción, encontrándose, que el tratamiento con adición de nutrientes tuvo efecto significativo (alfa \leq 0.05) en la biodegradación de hidrocarburos (Tabla 6.7).

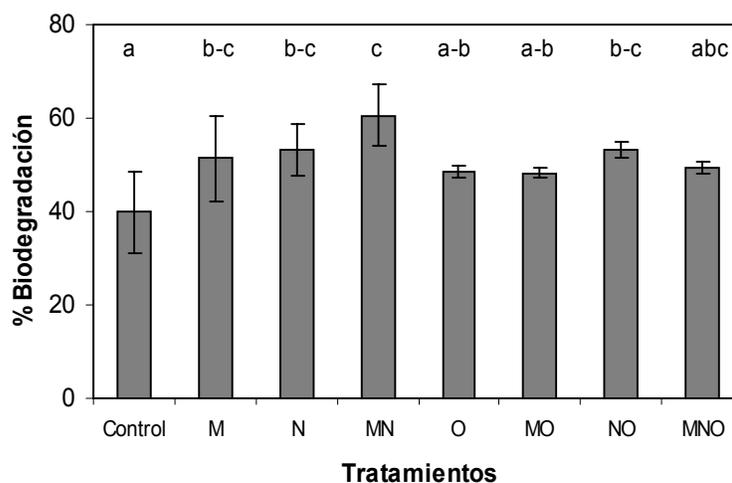


Figura 6.15. Biodegradación de hidrocarburos para el estrato inferior (la barra representa la desviación estándar y las letras muestran los tratamientos con diferencias significativas)

Este último análisis concuerda con los resultados anteriores (Tabla 6.6) observándose que los factores y sus interacciones, en los cuales se adicionó nutrientes, se observan los mejores efectos en el aumento de la biodegradación de hidrocarburos. La biodegradación de hidrocarburos en el tratamiento sin estimulación fue significativamente menor que los tratamientos estimulados (Figura 6.15).

6.4.3. Efecto de los estimulantes sin interacción

6.4.3.1. Efecto de la bioaugmentación

Durante el primer mes de estudio, el tratamiento con adición de inóculo, presentó una rápida disminución de la concentración de hidrocarburos en los tres estratos; (Figuras 6.12), alcanzando degradación de 38, 43 y 27% para los estratos superior, medio e inferior, respectivamente. En los siguientes meses y hasta el final de experimentación, se registro una degradación adicional de 19, 5 y 24% para los estratos superior, medio e inferior, respectivamente. Lo anterior, mostró que durante el primer mes se obtuvo la mayor remoción de hidrocarburos (más de 50% como degradación total) con respecto al final del periodo de incubación.

El efecto inicial de la adición de inóculo en la remoción de hidrocarburos, mostró la importancia de la bioaugmentación para incrementar la degradación. Sin embargo, el efecto positivo de la bioaugmentación no se mantuvo constante durante todo el periodo de experimentación. Los cambios de humedad y la disminución de fuente de carbono y nutrientes pudieran originar cambios en el interior de los lisímetros modificando la relación C:N y por lo tanto el metabolismo, favoreciendo el crecimiento de otras especies de bacterias y con ello la disminución de la degradación de hidrocarburos. Smith *et al* (1998), plantearon la hipótesis de un efecto colimitante de N y C, incluyendo cambios de población microbiana hacia aquellas con menor actividad degradadora.

En un estudio de bioaumentación, Ripp *et al* (2000), reportaron que la sobrevivencia de *Pseudomonas fluorescens* HK44 en lisímetros estratificados en campo fue exitosa; sin embargo, ésta presentó una disminución en la cuenta (3 ordenes de magnitud) en dos años, y el restablecimiento celular en los lisímetros se realizó por la adición de HPA, nutrientes y aireación. La cuenta de *Acinobacter baumannii* en un estudio de bioremediación *in situ* se mantuvo constante durante un año, debido al mantenimiento de las condiciones del suelo, incluyendo: nivel de humedad, nutrientes y aireación (Mishra *et al.*, 2001).

Por otro lado, la cuenta de bacterias hidrocarbonoclastas no se incrementó en los tratamientos inoculados durante el primer mes (sección 6.4.5). Esto posiblemente como consecuencia de que: i) el mayor crecimiento ocurrió al inicio de la inoculación y se redujo al completar el primer mes; ii) la alta cuenta inicial con un gran porcentaje de bacterias hidrocarbonoclastas (1.8×10^7 a 1.05×10^8 UFC/g SS) no permitió un mayor crecimiento de bacterias, iii) la heterogeneidad en la cuenta de bacterias en los lisímetros no permitió observar cambios, esto a pesar que a una menor escala (microcosmos) los cambios si fueron significativos (incremento de 2 ordenes de magnitud). Se descartó que el protocolo de inoculación en los lisímetros no fuese adecuado, debido a los resultados obtenidos a nivel microcosmos.

6.4.3.2. Efecto de la fertilización

El efecto de los estimulantes, -sin interacción- sobre la degradación de hidrocarburos en los tres estratos se presenta en la Tabla 6.7. La adición de nutrientes presentó efectos significativos en todos los estratos, evidenciando el requerimiento de nutrientes para estimular la actividad microbiana a través del perfil del suelo.

Tabla 6.7. Efecto de la adición de los estimulantes sin interacción sobre la degradación de hidrocarburos. Prueba de intervalos múltiples de Duncan

Estrato	Efecto			Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Nivel de significancia
	M	N	O				
Superior	-	√	-	222.75	2	111.375	0.0258
Medio	-	√	√	99.14	2	49.574	0.0160
Inferior	-	√	-	132.192	2	66.096	0.0352

Termino de significancia, $\alpha \leq 0.05$

En el presente trabajo se manejó una relación C:N:P = 100:10:1 y, ésta fue elegida basándose en las recomendaciones de literatura (Frankenberger 1992; Pope, 1996; Demque *et al.*, 1997) que consideran los rendimientos y la composición de elementos observada en la biomasa para determinados grupos microbianos.

Los tratamientos con adición de nutrientes alcanzaron hasta el quinto mes un 67, 51 y 53% de remoción de hidrocarburos para los estrato superior, medio e inferior, respectivamente.

La adición de fuentes de nitrógeno y fósforo origina cambios de la población microbiana y aumenta de la degradación de crudo (Macnaughton *et al.*, 1999). Así mismo favorece el crecimiento de especies dominantes (Smith *et al.*, 1998).

La adición de nutrientes presentó un efecto positivo en la degradación de los hidrocarburos, corroborando el efecto detectado en los estudios previos a nivel microcosmos. Para el caso de los estudios en lisímetros, como se mencionó anteriormente, los mejores tratamientos que estimularon la degradación en los estratos superior y medio correspondieron a MN y MNO respectivamente. Para el estrato inferior todos los tratamientos con fertilización fueron significativos.

Por lo anteriormente expuesto, se puede decir que la fertilización en la biorremediación, ha sido exitosa e incluso, más eficiente que la bioaumentación. La biodegradación de hidrocarburos se puede favorecer eficientemente con la adición adecuada de nutrientes y el manejo de condiciones ambientales (como el contenido de humedad, temperatura pH, nivel de aireación y otras condiciones de experimentación) que favorece el establecimiento de poblaciones con mayor actividad (Odukuma y Dickson 2003).

6.4.3.3. Efecto del oxigenante

En diferentes trabajos se ha encontrado que la adición de oxigenantes estimula la biodegradación en suelos (Fiorenza y Ward, 1997; Johnson y Odencratz, 1997; Cassidy e Irvine 1999). En el presente trabajo, también se encontró una estimulación; sin embargo, ésta no fue significativa en todo el perfil del suelo (los tres estratos). Los lisímetros, al parecer presentaron buena disponibilidad de O_2 , inicialmente por el aporte de agua -los estratos se abrieron momentáneamente para adicionar agua-, que permitió la aireación por el oxígeno disuelto presente en el agua y por arrastre de aire – efecto semejante al de la lluvia-. Es probable que la aireación en los lisímetros se origine por este mecanismo, más que por estimulación con CaO_2 .

La adición del CaO_2 en los lisímetros. Inicialmente incrementó el pH (Figura 6.16), pero este efecto disminuyó al final de la experimentación (Figura 6.17), posiblemente, debido a la formación de ácidos orgánicos producto de la actividad metabólica, así como la generación de CO_2 que se disuelve formando carbonatos y bicarbonatos, mientras que la salinidad sólo varió a causa de la adición de los nutrientes (Figura 6.18). Estos mismos efectos también se observaron a nivel microcosmos.

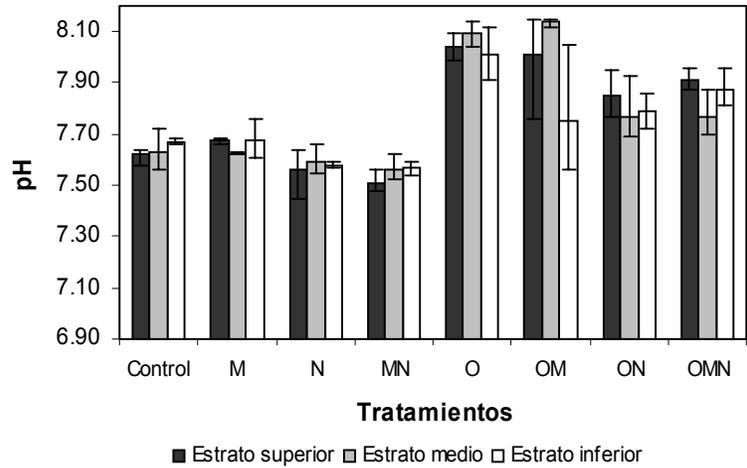


Figura 6.16. Efecto de la adición de estimulantes en el pH del suelo al inicio del tratamiento, en las columnas de suelo (las barras muestran la desviación estándar)

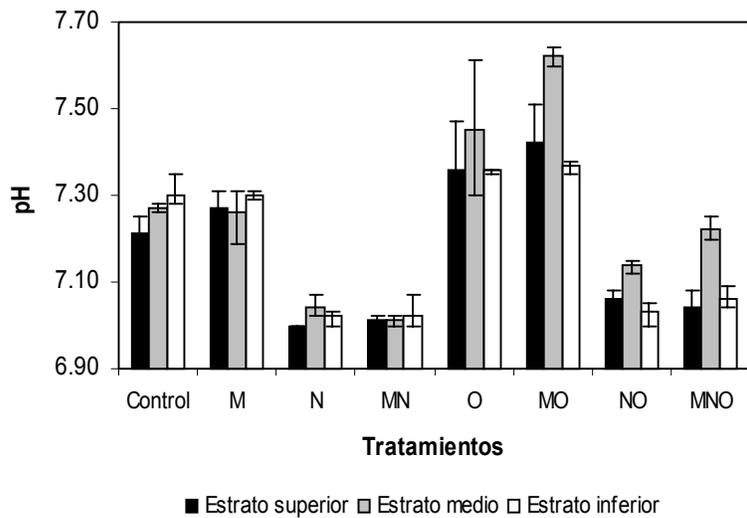


Figura 6.17. Efecto de la adición de estimulantes en el pH al final de la experimentación en las columnas de suelo (las barras muestran la desviación estándar)

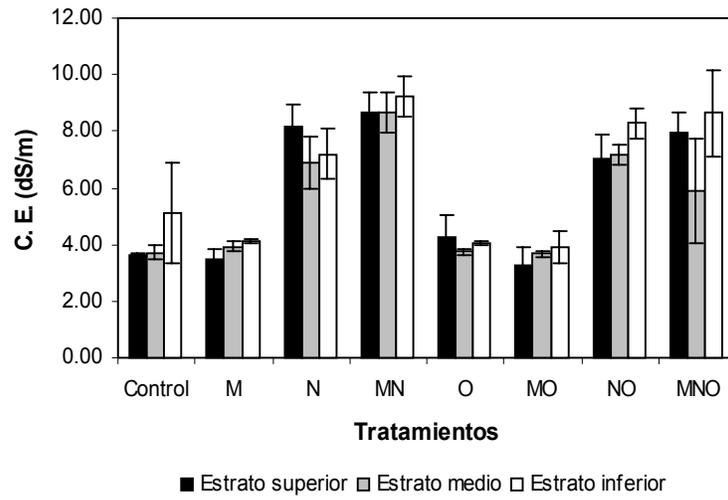


Figura 6.18. Conductividad eléctrica al final de la experimentación en las columnas de suelo (las barras muestran la desviación estándar)

6.4.4. Respiración de los tratamientos en los lisímetros

6.4.4.1. Cuantificación de O₂ y CO₂

La producción de CO₂ en los diferentes tratamientos y por estratos, se presenta en la Figura 6.19. Los tratamientos estimulados presentaron mayor producción de CO₂ en los tres estratos respecto al tratamiento sin estimulación (control), comportamiento similar al de biodegradación de HTP.

Mediante un ANOVA y una prueba de intervalos múltiple de Duncan, en los tres estratos, se determinó que la producción de CO₂ fue significativamente menor para el control con respecto a los demás tratamientos (alfa ≤ 0.05), los cuales presentaron mayor producción de CO₂. Sin embargo, no existe diferencia significativa entre los tratamientos.

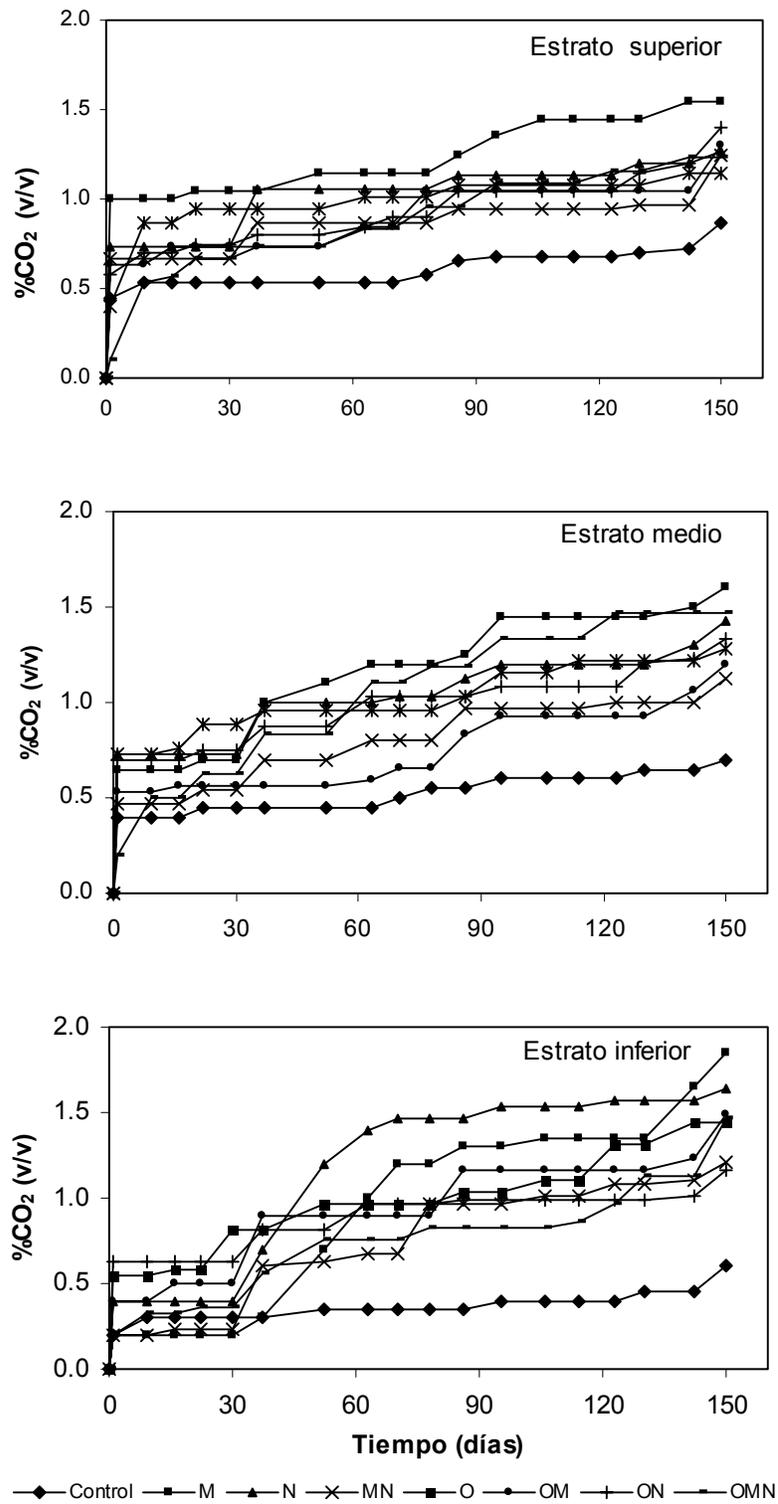


Figura 6.19. Producción de CO₂ en los lisímetros

Aunque la producción de CO₂ presentó un comportamiento similar al de degradación de HTP, estadísticamente no se encontró una relación entre el dióxido de carbono producido y la biodegradación de hidrocarburos durante el periodo experimental (Figura 6.20).

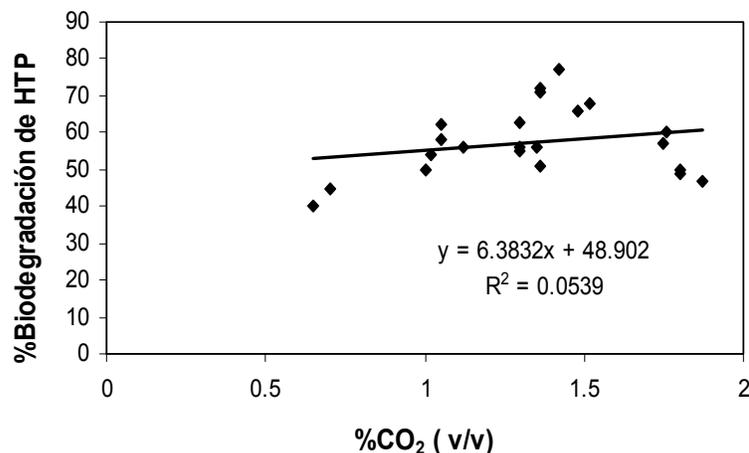


Figura 6.20. Biodegradación de HTP en función del CO₂ producido

Este comportamiento puede deberse a que son distintas respuestas; la **biodegradabilidad** considera la reducción de la concentración de los hidrocarburos por actividad biológica, mientras que la **producción de CO₂** mide al carbono mineralizado, así se observa que:

- a) No todo el carbono proveniente del hidrocarburo biodegradado se mineraliza. Otros destinos del carbono incluyen la formación de biomasa, metabolitos intermediarios e incorporación en el humus del suelo (Bouchez *et al.*, 1996; Kanaly *et al.*, 1997). Un estudio de biorremediación a nivel de campo reportó que el 27% de los hidrocarburos se mineralizó y 40% del residuo se transformó en metabolitos y humus (Glazovskaya y Pikovskiy 1985). Bouchez *et al* (1996), observaron que del 56 al 77% se mineraliza, del 16 al 35% se incorpora en la biomasa y del 5 al 23% se acumula en

metabolitos. Kanaly *et al* (1997), reportaron que el 50% de los hidrocarburos se mineralizó, el 20% se incorporó a metabolitos (biomasa) y el 25% se incorporó al humus del suelo. En este último caso los compuestos parcialmente degradados formaron uniones covalentes irreversibles con los compuestos que fueron parte del humus del suelo.

- b) Existen otras fuentes bióticas y abióticas productoras de CO₂. Entre las fuentes bióticas se reconocen a la biomasa y materia orgánica del suelo (Frankenberger, 1992; Sharabi y Bartha, 1993). Sharabi y Bartha (1993) determinaron que más del 50% del CO₂ producido puede ser debido a la biodegradación de la biomasa y de la materia orgánica y, en ningún caso, del sustrato contaminante en suelo. Sin embargo, no toda la materia orgánica es biodegradable (como el humus y parte de la fracción de ligninas); materia orgánica muy estable como en el caso de la presencia de arcillas minerales y carbonato de calcio que forman asociaciones con la materia orgánica son muy difíciles de degradar (Freijer, 1996). Por otro lado, las fuentes abióticas incluyen los aportes al sistema de bicarbonato por formaciones geológicas carbonatadas, suelos calcáreos y reacciones de H₂CO₃ con CaCO₃ mineral del suelo (Aelion *et al.*, 1997); así como cambios en el pH como en el aumento de iones H⁺ que pueden reaccionar con el CO₂ y disminuir su producción al formar CO₃²⁻.

Las concentraciones de O₂ tuvieron un comportamiento oscilatorio similar al de CO₂, mostrando una alta correlación (Figura 6.21). Esto se debe a que son variables complementarias en la respiración microbológica; el oxígeno es consumido de la atmósfera del suelo para degradar la materia orgánica o hidrocarburos, mientras existe formación de CO₂ y H₂O.

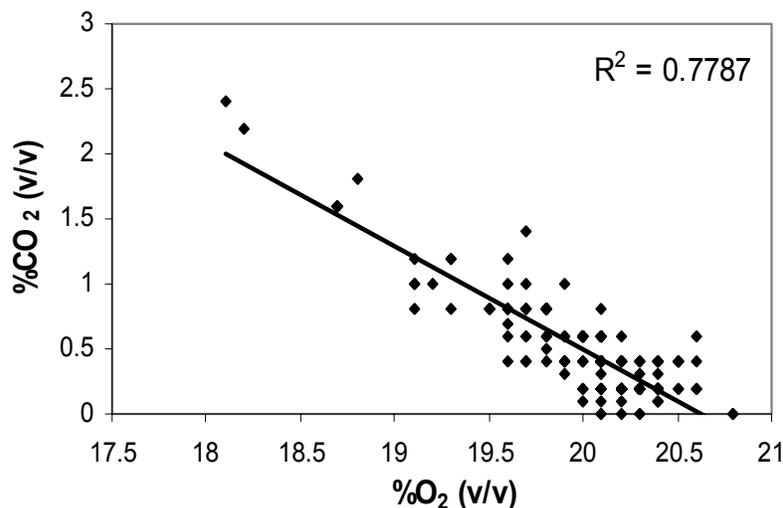


Figura 6.21. Correlación entre los valores de CO₂ y O₂

El empleo de trazadores radiactivos permitiría determinar el origen real de la fuente de CO₂ y el destino del O₂ para tener así una interpretación más clara de los balances de materia en la biodegradación de mezclas ricas de hidrocarburos en un medio tan complejo como el suelo.

6.4.4.2. Transformación del amonio en los sistemas de estudio

Los cambios en la concentración de amonio y nitrato para los tratamientos en los estratos de lisímetros se muestran en la Figura 6.22. La adición de la fuente de nitrógeno en los tratamientos con nutrientes (N, NM, NO y NMO) incrementó la concentración inicial de NH₄⁺ en el suelo en un rango entre 1,050 y 1,200 mg de NH₄⁺/kg SS. Mientras los tratamientos sin adición de NH₄⁺ (Control, M, O y MO) su contenido fue de 0.7 y 1.2 mg de NH₄⁺/kg SS.

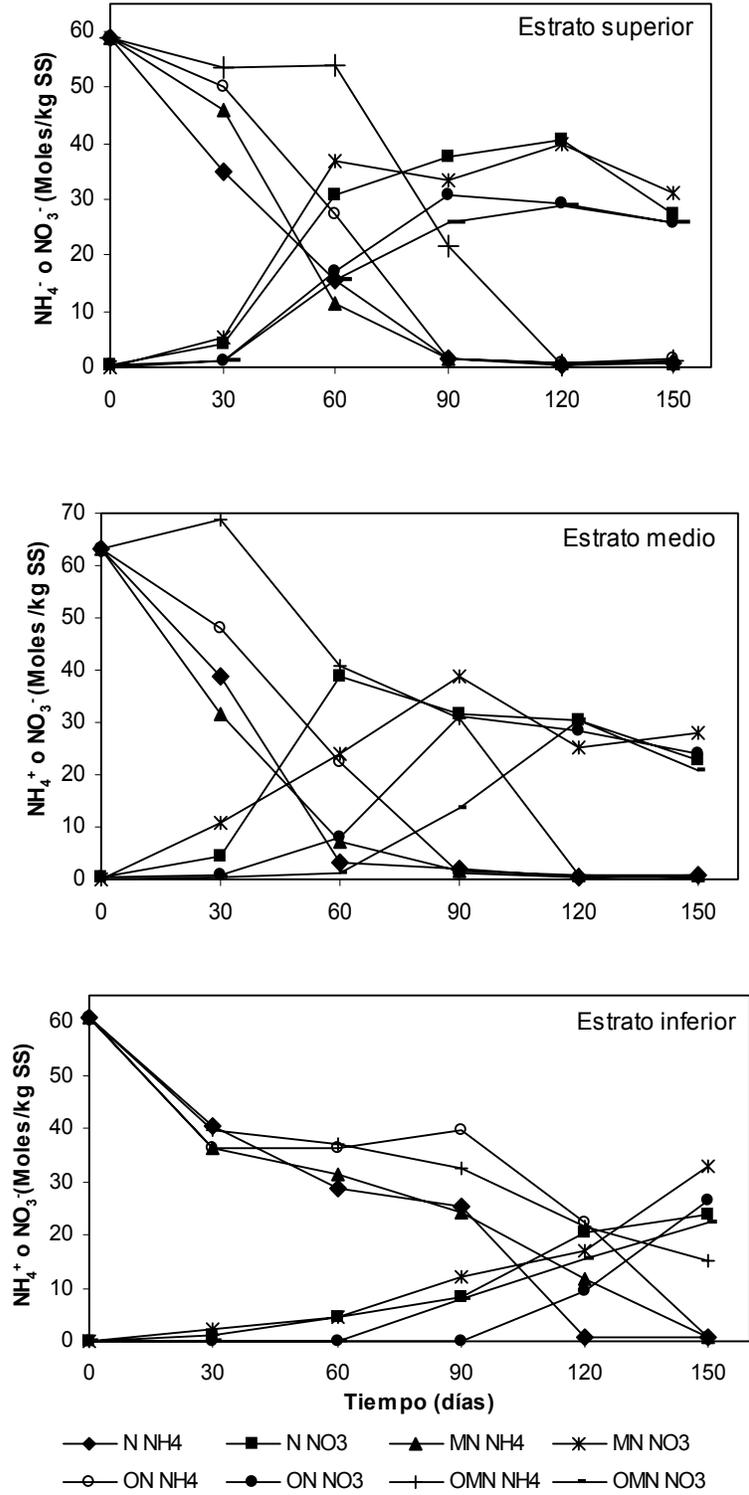


Figura 6.22. Cambio de concentración de NH₄⁺ o NO₃⁻ en las columnas de suelo

La adición de NH_4^+ fue seguida de un incremento en la concentración de NO_3^- (1,731-2,039 mg/kg SS) y disminución de NH_4^+ , lo cual indicó un *proceso de nitrificación*. Este proceso es común bajo las condiciones ensayadas (aeróbicas en suelo no saturado y pH neutro) y ha sido reportado en presencia de hidrocarburos en otros estudios (Breedvel y Briseid, 1993; Obire y Nwaubeta, 2002; Hollender *et al.*, 2003). La concentración de NH_4^+ se redujo un 27% (promedio en los 3 estratos) respecto al valor inicial, durante el primer mes. Al final de este mes se determinó un compuesto intermediario –nitritos- en concentraciones muy bajas. Las fracciones minerales de nitrógeno en el suelo son predominantemente amonio y nitratos (Maynard y Kalra, 1993; Foster, 1995).

Por otra parte, durante la oxidación de hidrocarburos, se ha encontrado una inhibición competitiva de la amonio monooxigenasa, la primera enzima del proceso de nitrificación, disminuyendo la producción de nitrato (Keener y Arp, 1994). Sin embargo, Deni y Penninckx (1999), descartan esta hipótesis y explican que la aparente no transformación total del amonio a nitrato se debe a la inmovilización del nitrógeno en forma de biomasa. De acuerdo con los resultados aquí obtenidos, la suma de la concentración de amonio y nitratos disminuyó a través del tiempo experimental por lo que se podría considerar que la fuente de nitrógeno se asimiló en biomasa. Incluso, la pérdida de nitrógeno por el proceso de *desnitrificación* (preferente bajo condiciones anaerobias) se consideró despreciable debido a que la concentración de nitrógeno total se mantuvo constante (0.10 – 0.13%) durante todo el estudio.

6.4.3.3. Actividad bacteriana anaerobia

No se detectaron subproductos de actividad anaerobia como metano y H_2S durante todo el periodo experimental.

La concentración de sulfato, obtenida en el suelo fue alta (10 000 – 40 000 mg/kg SS), debido a la adición de barita (BaSO_4) durante el proceso de perforación, el

sulfato no fue utilizado como aceptor de electrones, posiblemente debido a las condiciones redox prevalecientes en los lisímetros.

6.4.5. Comportamiento de la población microbiana aerobia en los lisímetros

La variación de la población de BHC en los estratos superior, medio e inferior, durante el tratamiento se presentan en la Figura 6.23. Las cuentas de BHC (2.7×10^6 – 1.05×10^8 UFC/g S) en los tres estratos, corresponden a valores de población típicas con alta potencial de degradación de hidrocarburos (Atlas, 1981; Bossert y Bartha, 1984). De manera general, se puede observar que la cuenta bacteriana fue mayor en los tratamientos estimulados, en comparación con el control. Todos los tratamientos y el control presentaron una disminución de la cuenta de BHC durante todo el proceso de experimentación, que acompañó la eliminación de hidrocarburos como se explicó anteriormente (sección 6.4.2).

En el estrato inferior la cuenta de BHC se encontró por arriba de los valores obtenidos en el estrato superior y medio (Figura 6.23). La cuenta de bacterias heterótrofas presenta una tendencia similar a la cuenta de BHC, con una correlación significativa de 0.76 (Figura 6.24).

La disminución de la población microbiana durante el tiempo de tratamiento ha sido reportada en varios estudios de biorremediación (Fiorenza y Ward, 1997; Ripp *et al.*, 2000; Obire y Nwaubeta, 2002; Thomassin *et al.*, 2002).

Los tratamientos MN y NO en el estrato superior y MN en el estrato medio presentaron un incremento de la población bacteriana en el segundo y tercer mes, lo que puede ser consecuencia de una adaptación de los microorganismos a las condiciones ambientales en los lisímetros (Nevárez-Moorillón, 2003).

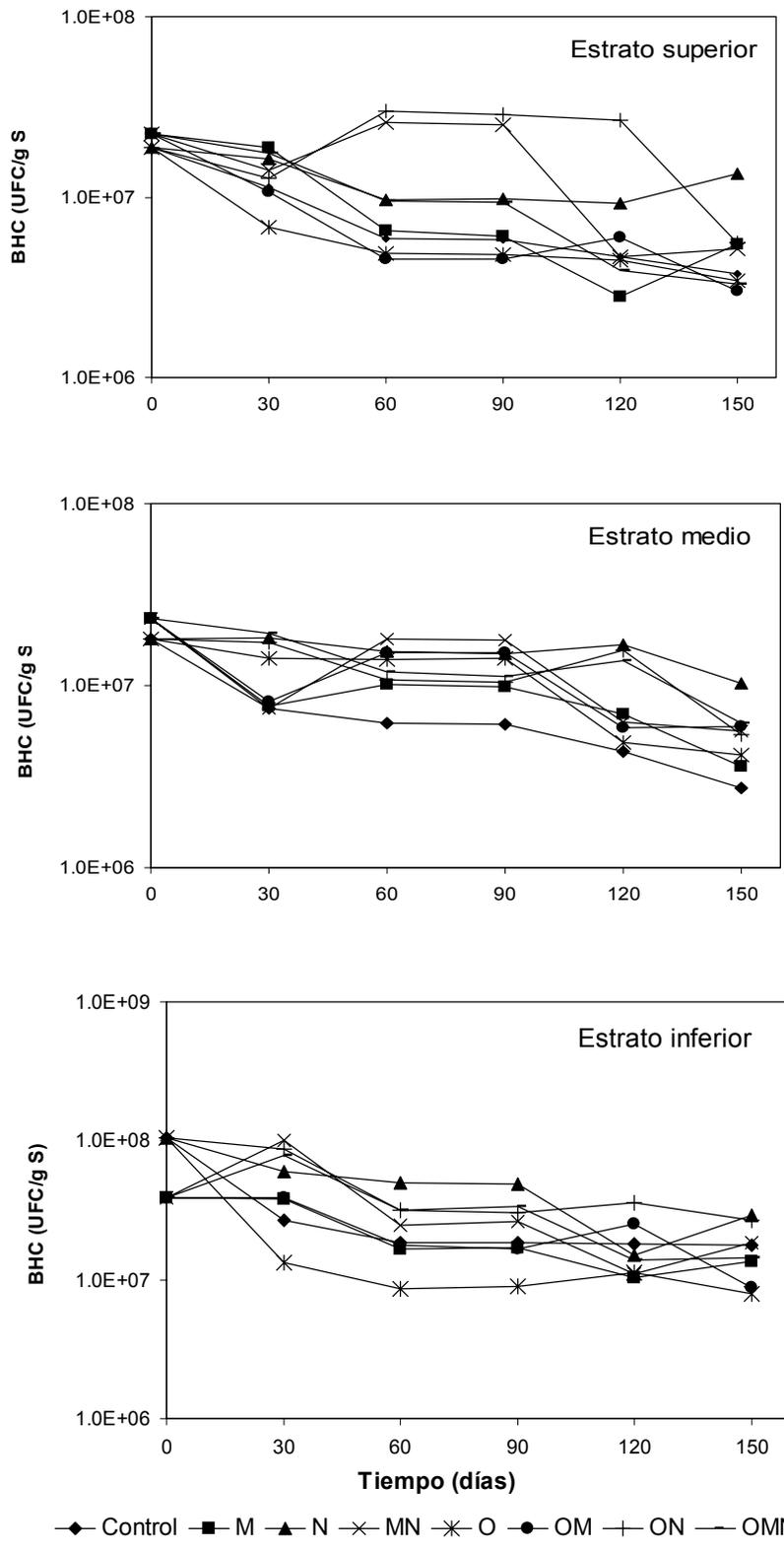


Figura 6.23. Cinética de bacterias hidrocarbonoclastas en los lisímetros

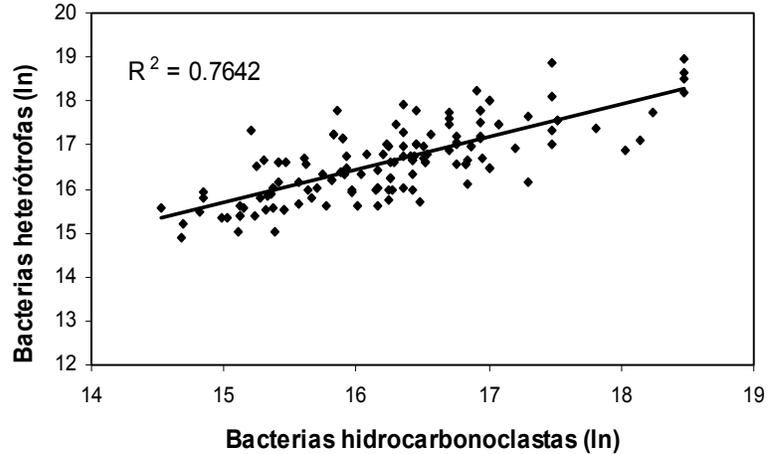


Figura 6.24. Correlación entre la cuenta de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas en los lisímetros

Como se mencionó anteriormente, no se encontró una relación entre la biodegradación de HTP y el tamaño de la población de BHC viables. Esto ha sido reportado en varios estudios (Song y Bartha, 1990; Margesin y Schinner, 2001). La explicación más simple, se atribuye a la disminución en la concentración de los hidrocarburos como principal fuente de carbono, lo cual puede limitar el crecimiento de las bacterias (Margesin y Schinner, 2001). Así, a través del periodo experimental se reduce la concentración de hidrocarburos más fácilmente biodegradables por lo que la falta de sustrato de fácil asimilación disminuye o limita el incremento de la biomasa.

Thouand (1999), al estudiar la evaluación de inóculos naturalmente adaptados con crudo, como única fuente de carbono y energía, a nivel microcosmos, reportó que la adaptación implica la reducción del número de especies y selección de la población. Otros trabajos reportan que durante el proceso de biorremediación existen cambios poblacionales que favorecen la degradación de contaminantes, en otras palabras, la transformación de contaminantes induce a un aumento en la diversidad (Smith *et al.*, 1998; Macnaughton, 1999; Obire y Nwaubeta 2002). El aumento de la diversidad,

generalmente no va acompañada de un incremento del número de bacterias (Zucchi *et al.*, 2003).

El incremento de la biodegradación en este trabajo, puede estar asociado a un cambio de la composición de las poblacion; debida a la selección de especies (Smith *et al.*, 1998; Thoand 1999; Zucchi *et al.*, 2003), con incremento de la actividad microbiológica. La cuantificación e identificación de las poblaciones bacterianas de los sistemas, empleando métodos moleculares, permitiría una mejor evaluación de la composición cualitativa y cuantitativa de los microorganismos y dar una explicación mas precisa de los fenómenos de biodegradación y de los cambios poblacionales en suelos contaminados con hidrocarburos.

7. CONCLUSIONES

Pruebas a nivel microcosmos

- Se produjo un inóculo adaptado con 1.3×10^8 UFC/ml de bacterias aerobias hidrocarbonoclastas a partir de un suelo contaminado con hidrocarburos, que crecieron en medio líquido con crudo como única fuente de carbono y energía.
- El CaO_2 a una concentración de 0.1% (p/p) resultó, el mejor oxigenante químico que estimuló el crecimiento microbiológico en suelos contaminados con residuos de perforación.
- En microcosmos, la bioestimulación con nutrientes y/o inóculo, incrementaron significativamente (2 ordenes de magnitud) la cuenta de bacterias hidrocarbonoclastas en el suelo estudiado.

Estudios en lisímetros

- El transporte de hidrocarburos entre estratos de los lisímetros resultó despreciable.
- La reducción de la concentración de hidrocarburos se atribuye exclusivamente a la biodegradación.
- La fertilización (adición de **nutrientes**) fue el factor que presentó el mejor efecto sobre la biodegradación de hidrocarburos.

- Los factores y/o interacciones que estimularon significativamente la degradación de hidrocarburos por estrato, fueron:
 - a. Inóculo-**nutrientes** (73% de degradación), para el estrato superior.
 - b. Inóculo-**nutrientes**-oxigenante (71% de degradación), para el estrato medio
 - c. Todos los tratamientos con adición de **nutrientes** (49% - 60% de degradación), para el estrato inferior.
- La adición de inóculo incrementó la degradación de hidrocarburos durante el primer mes de incubación.
- El efecto de CaO_2 , como factor de estimulación de la actividad microbológica, no fue significativo en los tres estratos.
- La atenuación natural es factible como estrategia de remediación en este sitio, alcanzando una biodegradación de hidrocarburos de 40 – 48% en cinco meses.
- El empleo de columnas de suelo permite obtener información de los procesos de biodegradación o atenuación natural *ex situ* en periodos relativamente cortos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aelion, M. C., Kirtland, B. C., y Stone, P. A. 1997. Radiocarbon assessment of aerobic petroleum bioremediation in the vadose zone and groundwater at and AS/SVE Site. **Environ. Sci. Technol.** 31(12):3363-337.
- Aguilera H. N. y Domínguez V. I. 1980. Metodología de análisis fisicoquímicos de suelos. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Aguilera, H N. 1989. **Tratado de Edafología de México**, Tomo I. Facultad de Ciencias, UNAM.
- Alazard, D., Suarez, N. C. y Fernández, L. 2002. Microbiología de pozos petroleros. Curso Internacional de Microbiología Industrial, UAM-Iztapalapa.
- Alexander, M. 1994. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press. E.U.A.
- Alexander, M. 1999. **Bioremediation technologies, *in situ*, solid phase** en (Alexander, Ed). Biodegradation and Bioremediation. Academic Press. San Diego, USA.
- AOAC. 1970. 42.014: **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists. 11th ed. Washington DC.
- APHA. 1980. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. APHA-AWWA-WPCF. 15th Edition. Washington, D.C.
- Arenas, S. 1999. Aislamiento y caracterización de bacterias de ambientes contaminados por petróleo en refinería "La pampilla" UNMSN, Lima. **Tesis de licenciatura en biología**.
- Arce, O. M. 2004. Remoción de las reacciones alifáticas, policíclicas aromáticas azufradas del petróleo del suelo en cultivo sólido. **Tesis, Doctorado en Ciencias**. Centro de investigación de estudios avanzados del IPN.
- ASTM. 1998. **American society for testing and materials**. D1426-98 Standard Test Methods for Ammonia Nitrogen In Water.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiol. Rev.** 45:180-209
- Atlas y Bartha 1983. Microbial degradation of petroleum and environmental perceptive. **Microbiol. Rev.** 45(1):181-209.
- Atlas, R. M. y Bartha, R. 1998. **Microbial. Ecology**. 4a ed. The Benjamin/Cummings Publication. California.
- Blaine, M. F. 1993. **Soil microbial ecology. Applications in agricultural end environmental management**. Marcel Dekker, Inc. New York. 646pp.

- Block, R. N., Clark, T. P. y Bishop, M. 1989. **Biological treatment of soils contaminated by petroleum products**. En Kostecki, P.T. and Calabrese, E.J. (Eds.) Hydrocarbon contaminated soils and groundwater. Vol 2. Lewis Publishers, Michigan.
- Boopaty, R., Manning, J. y Kulpa, C. F. 1997. Optimisation of environmental factors for the biological treatment of trinitrotoluene-contaminated soil. **Arch. Environ. Contamin. Toxic.** 32:94-98.
- Bossert, I. y Bartha, R. 1984. **The fate of petroleum in soil ecosystems**. En Atlas, R. M. (Eds). Petroleum microbiology. Macmillan Publishing Company. New York.
- Bouchez, M, Blanchet, D. y Vandecasteele. 1995. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 43(1):156 - 164.
- Bouchez, M., Blanchet; D., y Vandecasteele. 1996. The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45(4):556-561.
- Bouyoucos, G .J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. **Agron. J.** 54(5) 464-465.
- Brady, N. C. y Weil, R. R. 1999. The nature and properties of soils. **20th edition. Practice Hall, Inc. New Jersey. 879 pp.**
- Bray, R.H. y Kurtz, L.T. 1945. **Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils**. Soil Sci. 59:**39-45**.
- Bragg. J. R., Prince, R. C., Harner, E. J. and Atlas, R. M. 1994. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. **Nature.** 368 (31): 413-418.
- Breedveld, G.D. y Briseid T. 1993. *In situ* bioremediation of creosote –contaminated soil: column experiments. En Hinchee, R., Aderson, E., Metting, D., Bluine, F y Sayles, G. (Eds). **Applied Biotechnology for Site Remediation. Bioremediation Symposium.**
- Brown, K. W., Thomas, J. C. y Aurelius, M. W. 1985. Collection and testing barrel sized undisturbed soil monoliths. **Soil Sci. Soc. Am. J.** 49:1067-1069.
- Cassidy, D. P. e Irvine, R. L. 1999. Use of calcium peroxide to provide oxygen for contaminant biodegradation in a saturated soil. **J. Hazard. Materials.** 69(1):25-39.
- Clark, F. 1965. Agar-plate method for total microbial count *In* A. Klute, ed. **Methods of soil analysis. pt. 2: Chemical and microbiological methods**, p.1460ff. Madison, Wisconsin, Soil Science Society of America.
- Corwin, D. L. 2000. Evaluation of a simple lysimeter-design modification to minimize sidewall flow. **J. Contamin Hydrol.** 42:35-49.

- Cox, C. D., Nivens, D. E., Ripp, S., Wong, M. M., Palumbo, A., Burlage, R. S. y Sayler, G. S. 2000. An intermediate-scale lysimeter facility for subsurface bioremediation research. **Biorem. J.** 4(1):69-79.
- Davis, S. N y De Weist, R. 1967. **Hydrogeology**. John Wiley and Sims, Inc. New York 463 pp.
- De Jonge, H., Freijer, J. I., Verstraten, J. M., Westerveld, J. y Van Der Wielen F.W.M. 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. **Environ. Sci. Technol.** 31:771-775.
- Deni, J., y Penninckx, M. J. 1999. Nitrification and autotrophic nitrifying bacteria in a hydrocarbon-polluted soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (9): 4008 - 4013.
- Demque, D. E., Biggar, K. W. y Heroux, J. A. 1997. Land treatment of diesel contaminated sand. **Can. Geotech.** 34:421-431.
- Dibble, J. T. y Bartha, R. 1979. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. **Appl. Environ. Microbiol.** 37 (4):729-739.
- D.O.F. 1993. Diario Oficial de la Federación del 5 de octubre de 1993. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-ECOL-1993, Que establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.
- D.O.F. 1998. Diario Oficial de la Federación del 15 de septiembre de 1998. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-115-ECO-1998. Que establece las especificaciones de protección ambiental que deben observarse en las actividades de perforación de pozos petroleros terrestres para exploración y producción en zonas agrícolas, ganaderas y eriales
- D.O.F. 2002. Diario Oficial de la Federación del 20 de agosto de 2002. Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-138-ECOL-2002, Que establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, la caracterización del sitio y procedimientos para la restauración.
- D.O.F. 2002a. Diario Oficial de la Federación del 31 de diciembre de 2002. NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
- D.O.F. 2003. Diario Oficial de la Federación del 20 de febrero de 2003. Aviso de prórroga de la NOM-EM-138-ECOL-2002, Que establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, publicada el 20 de agosto de 2002.
- D.O:F. 2004. Diario Oficial de la Federación del 19 de marzo de 2004. Norma Oficial Mexicana. Proy-Nom-138-SEMARNAT-2003. Que estable los limites máximos permisibles de hidrocarburos en suelo y las especificaciones para su caracterización y restauración.

- Duncan K., Jennings E., Buck P. y Wells H. 2003. Multi-species ecotoxicity assessment of petroleum-contaminated soil. **Soil and Sediment. Contam.** 12(2):181-206.
- EPA. 1993. Guide for conducting testability studies, under cerda biodegradation remedy selection. Environmental protection agency, office of solid waste and emergency y respose- EPA/540/R-93/519b.
- EPA. 1999. Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons. Environmental protection agency, office of solid waste and emergency y response- EPA/600/F-98/051.
- EPA. 2002. Exemption of oil and gas exploration and production waste regulation EPA530-K-01-004. January 2002. www.epa.gov/epaoswer
- Escalante, G. R. 2002. Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios, **Tesis UNMSN**, Lima.
- Fidler, B. y Veil, J. 2002. Interactive Website for Drilling Waste Management. Proceedings of the 9th Annual International Petroleum Environmental Conference. The Integrated Petroleum Environmental Consortium. October 22-25, 2002. Albuquerque
- Fiorenza, S. y Ward, Ch. 1997. Microbial adaptation to hydrogen peroxide and biodegradation of aromatic hydrocarbons. **J. Ind. Microbiol. Biotech.** (18):140-151.
- FMC. 2002. PermeOx Plus. Calcium Peroxide. PermeOx Plus Technical Data.doc en <http://www.fmcchemicals.com>.
- Foster, J. 1995. Soil nitrogen. En Alef, K. and Nannipieri, P. (Eds.). **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press.
- Foth, H. D. 1987. Fundamentos de la ciencia del suelo. Editorial continental, México.
- Frankenberger, Jr. W. T. 1992. The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons. En Hydrocarbon Contaminated soils and groundwater. Vol. 2. E. J. Calabrese and P. T. Kosteki (Eds). Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Frankenberger, Jr. W. T. Hillyer, M. y McFarland, B. L. 1997. Feasibility screening study for *in situ* bioremediation of heavy gas oil in refinery soils. **Proceeding of IV international symposium *in situ* and *on site* bioremediation**. New Orleans.
- Freijer, J. I. 1996. Mineralization of hydrocarbons in soils under decreasing oxygen availability. **J. Environ. Qual.** 25: 296-304.
- Führ, F., Hance, R. J., Plimmer, J. R. y Nelson, J. O., 1997. The Lysimeter Concept. Environmental behavior of pesticide. Developed from a symposium sponsored by the Division of Agrochemicals, at the 213th National Meeting of the American Chemical Society, San Francisco, California. April 13-17.

- Gary, C. D. 1993. Química analítica. Limusa. México.
- Garcia, P J. 1958. Diversos objetivos que se persigue en la perforación de pozos. IPN, Escuela superior de ingeniería y arquitectura, México. Tesis.
- Gaudy, A. F. y Gaudy, E. T. 1981. **Microbiology for environmental scientists and engineers**. McGraw Hill, Tokyo.
- Gibb, A., Chu, A., Kwong, R. y Goodman R. 2001. Bioremediation kinetics of crude oil at 5 C. **J. Environ. Eng.** September. 818-824
- Glasovskaya, M. A. y Pirkovski, Y. I. 1985. Estudio experimental complejo de los factores que realizan la autodepuración y rehabilitación de suelos contaminados con petróleo en diferentes zonas naturales. En Bobovnikova, T.I. y Nalakhou, S.G. (Eds.) Migración de sustancias contaminantes en suelos y ambientes adyacentes. 3er. Simposio Nacional de la Unión, Obninsk, Rusia, Sept. 1981, Gridrometeoizdat, Leningrado, Rusia.
- Gordon, A. H. III, DeLaune, R. D. y Patrick; Jr. W. H. 1980. Effect of estuarine sediment pH and oxidation-reduction potencial on microbial hydrocarbon degradation. **Appl. Environ. Microbiol.** 40 (2):365-369.
- Graham, D. W., Smith, V. H. y Law, K.P. 1995. Application of variable nutrient supplies to optimize hydrocarbon biodegradation. En Bioreclamation of recalcitrant organics, Hinchee, R. E., Anderson, D. B. and Batelle Press. Vol. 7.pp. 331-340E.
- Grundmann, R. y Jürgen R. 1991. Biodegradation of diesel-fuel. **Sci. Technol.** 44(14):149-150.
- Hince, E. 2002. Geovation Technologies, Inc. echince@geovation.com
- Hollender, J., Althoff, K., Mundt M. y Dot, W. 2003. Assessing the microbial activity of soil samples its nutrient limitation and toxic effects of contaminants using a simple respiration test. **Chemosphere.** 53:269-275.
- Huesemann, M. H. 1994. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils. **J. Soil Contam.** 3(3):299-318.
- Huesemann, M. H., Hausmann, T. S. y Fortman, T. J., 2002. Microbial factors rather than bioavailability limit the rate and extent of PAH biodegradation in aged crude oil contaminates model soils. **Biorem. J.** 6(4):321-336.
- Hunt, P. G., Rickard, W. E., Deneke, F. J., Koutz. y Murrman, R. P. 1973. Terrestrial oil spills in Alaska: environmental effects and recovery. En Proceedings of Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills. API. Washington, D.C. March 13-15.
- Hutchinson, S. L. Banks, M. K. y Schwab, A. P. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge; effect of inorganic fertilizer. **J. Environ. Qual.** 30:395-403.

- IMP. 2004. Atenuación natural de suelos contaminados con hidrocarburos. Proyecto D.00023. Capitulo 1. Programa de biotecnología del petróleo. México, D.F.
- Imamura, T., Kozaky, S., Kuriyama, A., Kawaguchi, M., Touge, Y, Yano, T. y Sugawa E. 1997. **Proceeding of IV internacional *in situ* and *on-site* bioremediation. Vol 4. New Orleans, Louisiana.**
- Jackson W. A. y Pardue, J. H. 1999. Potential for enhancement of biodegradation of crude oil in Louisiana salt marshes using nutrient amendments. **Water, Air, Soil Pollut.** 109(1-4):343-355.
- Janzen, H. 1993. Soluble Salts. En Carter (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis.** Canadian Society of soil Science. Lewis Publishers. Florida.
- Jones, R J., Hinsley, T. D. y Jarvis, N. J. 1998. An industry approach to the application of the lysimeter concept. 1998. ACS symposium series 699. pp.203-212.
- Johnson, J. G. y Odencrantz. J. E. 1997. Management of hydrocarbon plume using a permeable ORC@ barrier. Fourth International *In Situ* and On-Site Bioremediation Conference, April 28-May 1, New Orleans, LA, Battelle Press, Columbus, OH.
- Juma, N. G. 1998. The pedosphere and its dynamics: soil texture, structure and color, 3.3.3 Bulk density of mineral soils. En http://www.soils.rr.ualberta.ca/Pedosphere/content/section03/page03_03.cfm.
- Jury, W. A. 1986, **Vadose zone modeling of organic pollutants**, Chapter 11, Eds. S. C. Hern and S. M. Melancon, Lewis Publishers, Chelsea, MI.
- Kanaly, R., Bartha, R., Fogel, S. y Findlay, M. 1997. Biodegradation of [¹⁴C]Benzo[a]pyrene added in crude oil to uncontaminated soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 63(11):4511-4515.
- Käster, M., Breuer, M. y Mahro, B. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH's) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 64(1):359-362.
- Keener, W, K. y Arp D. J. 1994. Transformation of aromatic compounds by *Nitrosomonas europea*. **Appl. Environ. Microbiol** 60:1914-1920.
- Kirk, P, W. y Gordon, A, .S. 1988. Hydrocarbon degradation by filamentous marine higher fungi. **Mycologia.** 80:776-782.
- Leahy, J. G. y Colwell, R. R, 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbial. Rev.** 54(3):305-315.
- Leeson, A. y Hinchee, R. 1997. **Soil bioventing: Principles and Practice.** Florida. Lewis Publishers

- Loehr, R. C. 1992. Bioremediation of PAH compounds in contaminated soil. En Hydrocarbon Contaminated soils and groundwater. Vol. 2. P. T. KostECKI (Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- López, R. J. y López, M. J. 1978. El diagnóstico de suelo y plantas, **Métodos de campo y laboratorio**. 3ª Edición. Ediciones Mundo-Prensa.
- Macnaughton S., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y. J. y White, A. C. 1999. Microbial population change during bioremediation of an experimental oil spill. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(8):3566-3574.
- Margesin, R. y Schinner, F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier sking area. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(7):3127-3133.
- Maynard, C y Kalra. 1993. **Nitrate and exchangeable ammonium nitrogen**. En Carter (Ed.). Soil Sampling and Methods of Soil Analysis. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers.
- McAllister, P.M., Chiang, C. Y., Salatino, J. P., Dortch, I. J. y Williams, P. 1995. **Enhanced aerobic bioremediation of residual hydrocarbon sources**. En Intrinsic Bioremediation (Bioremediation, 3(1)) by Hinchee, R. E, Wilson, J. T and Douney, D. (Editores). Portland, Or. Battelle.
- Mills, S. A. y Frankenberger, Jr., W. T. 1994. Evaluation of phosphorus sources promoting bioremediation of diesel fuel in soil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 53(2):280 - 284.
- Mishra, S., Jyot, J., Kuhad, R. y Lal, B. 2001. Evaluation of inoculum addition to stimulate *in situ* bioremediation of oil-sludge-contaminated soil. **Appl. Environ. Microbiol.** 67(4):1675-1681.
- Mohn, W. W. y Steward, G. R. 2000. Limiting factors for hydrocarbon biodegradation at low temperature in arctic soils. **Soil Biol. Biochem.** 32:1161-1172.
- Montemagno, C., Leo, A. y Craig, J. 1993. Site characterization for the in situ bioremediation of the vadose zone. **Govt. Reports Announcements and Index.** 22.
- Müller-Markgraf, W. 1995. Degradation parameters. En Alef, K. and Nannipieri, P. (Eds.). **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. Academic Press. pp. 530-533.
- Muñoz, I. D., Mendoza, C. A., López, G. F., Soler, A. A. y Hernández, M. M. 2000. Manual de métodos analíticos de suelos. UNAM. México.
- Nevárez-Moorillón; G., Piñón-Castillo, H., Torres-Muñoz, V., Muñoz-Castellanos, L. Vélez-Sánchez, C, Espinoza, V., Riojas-González, H. y Hernández-Castillo, D. 2003. Soil contaminated with combustoleo (residual fuel no. 6) remediation strategies. V.S. Magar and M.E. Kelley (Eds.), In Situ and On-Site Bioremediation—2003.

Proceedings of the Seventh International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium (Orlando, FL; June 2003). Battelle Press, Columbus, OH,

- Obire, O. y Nwaubeta, O. 2002. Effects of refined petroleum hydrocarbon on soil physicochemical and bacteriological characteristics. **J. Appl. Sci. and Environ. Management.** 6(1):39-44.
- Odukuma, L. O. y Dickson, A. A. 2003. Bioremediation of a crude oil polluted tropical rain forest soil. **Global J. Environ. Sci.** 2(1):2003-2940.
- OECD. 2000. Guidance document for the performance of out-door Monolith lysimeter studies. Organization for Economic Co-operation and Development. ENV/JM/MONO(2000)8.
- Parent, L. y Caron, J. 1993. Physical Properties of Organic Soils. En Carter (Ed.). **Soil Sampling and Methods of Analysis.** Canadian Society of soil Science. Lewis Publishers. Florida.
- Pardieck, D. L. Bouwer, F. J. y Stone, A. T. 1992. Hydrogen peroxide use to increase oxidant capacity for *in situ* bioremediation of contaminated soils and aquifers: a review. **J. Contam. Hydrology.** 9:221-242.
- Parkinson, D. 1982. Filamentous fungi. pp 949-953 *In*: A.C. Page. Methods of soil analysis. **Agronomy** No. 9 Vol. 2 American, Soc. of Agro. Madison, Wisconsin. U.S.A.
- Paul, E. A. y Clark, F. E. 1989. **Soil microbiology and biochemistry.** Academic Press. San Diego.
- Pelczar, M., Reid, R. y Chan, E., 1982. **Microbiología.** 2ª edición. McGraw-Hill. México D.F.
- PEMEX. 1999. Indicadores operativos. Petróleos Mexicanos. En <http://www.pemex.com/oestadistica>
- PEMEX, 2002. Informe anual; seguridad, salud y medio ambiente. México.
- Phelps, T., Siegrist, R., Korte, D., Pickering, J., Strong G., Walker J., Morrissey, C. y Mackowski, R. 1994. Biorremediation of petroleum hydrocarbons in soil column lysimeters from Kwajalein Island. **Appl. Bioche. Biotechnol.** 45(46):835-845.
- Pope, D. 1996. Natural Attenuation of Soils. En Seminar Series on Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implementation. EPA 1625/R-96/001.
- Pope y Matthews. 1993. Bioremediation Using the Land Treatment Concept, EPA 600/R-93/164. August 1993.
- Porta, C. J., López-Acevedo, R. M. y Roquero de Laburu, C. 1994. Edafología para agricultura y el medio ambiente. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

- Pritchard, P. H., Mueller, J.G., Rogers, J. C., Kremer, F. V. y Glaser, J. A. 1992. Oil Spill bioremediation: experiences, lessons and results from the Exxon Valdez oil spill in Alaska. **Biodegradation**. 3: 315-335.
- PROFEPA. 2000. Segundo grupo de criterios de limpieza. Disposiciones y procedimientos para la caracterización y restauración de suelos contaminados. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente -Secretaría de Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca.
- Regenesis. 2002. Oxygen Release Compound. Accelerating Natural Attenuation. Case Studies. en <http://www.regenesis.com>.
- Reuter, P., Rabus, R. y Aeakerberg, H. W. 1996. Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulphate-reducing bacterias. **Nature**. 372:455-458
- Ripp, S., Nivens, Y. A., Werner C., Jarrell IV, J., Easter J. P., Cox, C. D., Burlage R. S. y Saylor G. S. 2000. Controlled field release of bioluminescent genetically engineered microorganism for bioremediation process monitoring and control. **Environ. Sci. Technol.** 34:846-853.
- Riser-Roberts, E. 1998. **Remediation of petroleum contaminated soils**. Lewis Publishers. 542 pp.
- Rogers, J. A., Tedaldi, J. D. y Kavanaugh, M. C. 1993. A screening protocol for bioremediation of contaminated soil. **Environ. Prog.** 12(2):146-156.
- Roldan, T., Rojas, N., Muños A., Zaragoza, D. y Fernández, L. 2003. Bioremediation or a drilling mud-contaminated soil using agricultural wastes. **2nd international conference of petroleum biotechnology: The development and perspectives of biotechnology applied to the oil industry Mexico**. Nov. 5-7. ISBN° 968-489-018-4.
- Rosenbeg, E y Ron, E Z. 1997. Bioemulsans: Microbial polymeric emulsifiers. **Curr. Opin. Biotechnol.** 8:313-316.
- Sadeghi, A. M., Isensee, A. R. y Shirmohammadi, A. 2000. Influence of soil texture and tillage on herbicide transport. **Chemosphere**. 41:1327-1332.
- Saval, S. 1997. Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. **Ingeniería y Ciencias Ambientales** Num. 33, julio-septiembre: 24-30.
- Saval S. 1998. Biorremediación: Alternativas para la limpieza de suelos y acuíferos de suelos contaminados con hidrocarburos. **Ingeniería y Ciencias Ambientales** No.34.
- Semple, K. T., Reid, B. J. y Fermor, T. R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. **Environ. Pollution**. 112:269-283.
- Sharabi, E. S. y Bartha, R. 1993. Testing of some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. **Appl. Environ. Microbiol.** 59(4):1201-1205.

- Sims, J. L., Sims, R. C. y Matthews, J. E., 1990. Approach to bioremediation of contaminated soil. **Hazard. Waste and Hazard. Materials**. 7(2):117-149.
- Smajstrla, A. G. 1985. A fiel lysimeter for crop water use and water stress studies in humid regions. **Soil Crop. Sci. Soc. FI. Proc**. 28:1867-1870.
- Smith, V. H., Graham, D. W. y Cleland, D. D. 1998. Application of resource-ratio theory to hydrocarbon biodegradation. **Environ. Sci. Technol**. 32(21):3386-3395.
- Song, H.-G. y Bartha, R. 1990. Bioremediation potencial of terrestrial fuel spills. **Appl. Environ. Microbiol**. 56(3):646-651.
- Song, H. G., Pedersen, P. A. y Bartha, R. 1986. Hydrocarbon mineralization in soil relative bacterial and fungal contribution. **Soil Biol. Biochem**. 18:1069-111.
- Song, H. G, Wang, X. y Bartha, R., 1990. Bioremediation potencial of terrestrial fuel spills. **Appl. Environ. Microbiol**. 56 (3):652-656.
- Sovik, A., Alfnes, E., Breedveld G., French, H., Pedersen, T. y Aagaard, P. 2002. Transport and degradation of toluene and *o*-xylene in an unsaturated soil with dipping sedimentary layers. **J. Environ. Qual**. 31:1809-1823.
- Sylvia, D. M., Fuhrmann, J. J., Hartel, P. G. y Zuberer, D. A. 1999. **Principles and applications of soil microbiology**. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Tavera, S. G., 1985. Criterios para la interpretación y aprovechamiento de los reportes de laboratorio para las áreas de asistencia técnica. Serie: Temas didácticos. Publicación No. 3. Sociedad de la Ciencia del Suelo.
- ThermoGastech. 2001a. GT Series CO₂. Operator's Manual. Thermo Gas Tech.
- ThermoGastech. 2001b. INOVA. Operator's Manual. Thermo Gas Tech.
- Thouand, B., Bauda, P., Oudot, J., Kirsch. G., Sutton, C. y Vidalle, J. F. 1999. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. **Can. J. Microbiol**. 45:106-115.
- Thomassin, L., Eriksson. M., Reimer, K. J. y Mohn, W. W., 2002. Biostimulation and bioaugmentation for *on site* treatment of weathered diesel fuel in Arctic Soil. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 59:551-556.
- Topp. G. 1993. Soil water content. En Carter (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis**. Canadian society of soil science. Lewis Publisheers. Florida.
- USEPA. Environmental Protection Agency. 1996. SW- 846 Test Methods for Evaluating Soild Waste Physical/Chemical Methods. Tercera Revisión. Washington.

- USEPA. Environmental Protection Agency. 1997. United States Environmental Protection Agency: Federal Remediation Technologies Roundtable Data Base. En <http://www.frtr.gov/>.
- USEPA. Environmental Protection Agency. 1999. Landfarming Office of Underground Storage Tanks. EPA/542/R/96/601.
- Van Deuren, J., Wang, Z. y Ledbetter, J. 1997. Remediation technologies screening matrix and reference guide. 3a Ed. *Technology innovation office, EPA*. <http://WWW.epa.gov/tio/remed.htm>.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. y Ward, O. P. 2003. Recent Advances in petroleum Microbiology. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** 67(4):503-549.
- Vázquez A. y Bautista A. 1993. Guía para la interpretación de análisis químico de suelo y agua, Depto. suelos, Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Volke, S. T. 2002. Biorremediación de suelos contaminados. **BioTecnología**. 7(1):24-39.
- Walker, J. D. y Colwell, R. R. 1976. Enumeration of petroleum-degrading microorganisms. **Appl. Environ. Microbiol.** 31(2):198-207.
- Walworth, J. L. y Reynolds, C. M. 1995. Bioremediation of a petroleum-contaminated cryic soil: effects of phosphorus, nitrogen, and temperature. **J. Soil. Contam.** 4(3):299-310.
- Walworth, J. L., Woolard, C. R., Braddock, J. F. y Reynolds, C. M. 1997. Enhancement and inhibition of soil petroleum biodegradation through the use of fertilizer nitrogen: an approach to determining optimum levels. **J. Soil Contam.** 6(5):465-480.
- Wang, X., Yu, X. y Bartha, R. 1990. Effect of bioremediation on polycyclic aromatic hydrocarbons residues in soil. **Environ. Sci. Technol.** 24:1086-1089.
- Water IC and CIA (2000). Ion Analysis Methods for IC and CIA and Practical Aspects of Capillary. Ion Analysis Theory.
- Widdel, R. y Rabus, R. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated aromatic hydrocarbons. **Curr. Opi. Biotechnol.** 12:259-276.
- Zamudio, M. R. y Islas, S. E. 2000. Propuesta para la reclasificación de peligrosidad en recortes de perforación contaminados con hidrocarburo. XII congresos Latinoamericano de perforación. 22 pp.
- Zapien, E. B. 2004. Efecto del contenido de humedad y la adición de nutrientes en la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en suelo. **Tesis de licenciatura ingeniería ambiental**. IPN.
- Zegarra, H. 2000. Optimización de la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta. **Tesis de Maestría**.

Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ingeniería. División de Estudios de Posgrado.

Zucchi, M., Angiolini, L., Borin, S., Brusetti, L., Dietrich, N., Gigliotti, C., Barbieri, P., Sorlini, C. y Daffonchio, D. 2003. Response of bacterial community during bioremediation of an oil-polluted soil. **J. Appl. Microbiol.** 94:248-257.

ANEXO A. MÉTODOS ANALÍTICOS

Determinación de hidrocarburos totales del petróleo

Los hidrocarburos se extrajeron mediante el método modificado de **agitación y centrifugación** utilizando diclorometano como disolvente (Arce, 2004). La cuantificación de HTP se realizó por “**cromatografía de gases con detector de ionización de flama**” (método EPA-8015 M, USEPA, 1996). Utilizando un equipo Agilent 6850 serie GC System, operando bajo las siguientes condiciones: columna capilar DB-1, fase estacionaria dimetil silicona, 30 m x 0.53 mm ID, 0.25 µm, que utiliza helio como gas acarreador a una velocidad de flujo 1.5 ml/min. La temperatura del inyector y detector se mantuvo a 250 °C. El horno operó con una rampa de temperatura; 45°C por 3 min, 45-100°C a 20°C/min, 100–290°C a 10°C/min, y 290°C por 5 min.

Cuenta en placa para bacterias heterotróficas totales e hidrocarbonoclastas

El crecimiento microbiano se determinó por la técnica de cuenta en placa (Clark, 1965; Parkinson, 1982). 1 ml de muestra en medio líquido (ó 1 g de suelo húmedo), a la que se realizaron diluciones sucesivas en tubos con solución salina (0.85% de NaCl) estéril, una vez obtenida las diluciones necesarias. Se adicionó 100 µl de la dilución apropiada que se depositaron en cada caja de petri conteniendo medio mineral para BHC y medio para BHT (Tabla A.1 y A.2), esparciendo el inóculo con una varilla de vidrio. Para las BHC se utilizó hidrocarburo crudo estéril, como única fuente de carbono y energía impregnado en la contratapa. Las BHC se incubaron a 30°C por 7 días y BHT a 30°C por 48 h.

Tabla A.1. Composición del medio mineral para bacterias hidrocarbonoclastas

Componentes	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	0.4
K ₂ HPO ₄	1.6
NH ₄ Cl	1.5
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.17
NaSO ₄ 7H ₂ O	1.5
CaCl ₂	0.045
Solución mineral estéril	1.0 ml
Agar noble	15.0

Tabla A.2. Composición de la solución mineral

Componentes	Concentración (g/L)
MgCl ₂	5.1
MnCl ₂	0.66
NaCl	1.0
FeCl ₃ 6H ₂ O	1.0
CaCl ₂ H ₂ O	0.1
CuCl ₂	0.01
ZnCl ₂	0.08
AlCl ₃	0.05
H ₃ Bo ₃	0.01
NaMo ₄ 2H ₂ O	0.04

Humedad

Se determinó por el método gravimétrico, por secado en horno a 105°C calculándose la diferencia atribuida a la pérdida de agua hasta obtener peso constante (Topp, 1993).

pH

El pH del suelo se realizó por el método potenciométrico (USEPA, 1996), a partir de una solución suelo-agua 1:2, con 30 minutos de agitación y 60 minutos de reposo. Empleando un equipo ORION modelo 720A.

Carbón orgánico total

La concentración de COT en muestras de suelo, se obtuvo mediante la combustión catalítica de muestras a 900°C (EPA 9060, USEPA, 1996). Empleando un analizador de carbono –Shimadzu- modelo TOC 5000A.

Nitratos y nitritos

La extracción de nitratos y nitritos se realizó con KCl 1M y su determinación por electroforesis capilar, utilizando un equipo; “water capillary ion analyzer”, modelo Wat153-02TP, condiciones del equipo: 15 kV con fuente de poder negativa, UV indirecta a 254 nm columna.

Sulfatos

La extracción de sulfatos se realizó con NaHCO₃ 0.5M y cuantificación por electroforesis capilar, utilizando un equipo; “water capillary ion analyzer”, modelo Wat153-02TP, condiciones del equipo: 15 kV con fuente de poder negativa, UV indirecta a 254 nm columna.

Fósforo disponible

El Método Bray (Bray y Kurtz, 1945; citado en Muñoz *et al.*, 2000), fue utilizado para evaluar el fósforo disponible en suelo. El fósforo fue extraído con una solución de NH₄F en medio ácido y cuantificado en un espectrofotómetro a 640nm (Espectrofotómetro HACH – DR/2000).

Nitrógeno amoniacal

La extracción del nitrógeno amoniacal se obtuvo con KCl 1M y su cuantificación por el método potenciométrico ión selectivo ASTM D1426-98 (ASTM.1998).

Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica se realizó por el método del conductímetro (Janzen,1993) a partir de una solución suelo-agua 1:2. Empleando un equipo ORION modelo 720A.

Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto se midió a partir de una solución de 200g/L por el método del electrodo (APHA, 1980), con un electrodo con sensor de cátodo de platino y un microprocesador HANNA Instruments®.

Medición de gases

La determinación de O₂ y CO₂ en pruebas a nivel microcosmos, se tomaron 2 ml del espacio gaseoso, que fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Gow-Mac serie 580, con una columna CTR 1 y un detector de conductividad térmica, empleando a helio como gas acarreador con un flujo de 65 ml/min, inyector 40°C detector 100°C y temperatura de la columna 40°C.

La determinación de O₂ y CO₂ en los lisímetros se realizó con un analizador portátil con detector de infrarrojo, electroquímico, compensación catalítica y conductividad térmica INOVA y GT-CO₂ marca Gastech (ThermoGastech 2001a y b).

Densidad aparente

La densidad aparente se calculó a través del peso de un volumen conocido de suelo, por el método volumétrico o de probeta (Muñoz *et al.*, 2000).

Densidad real o de partícula

La densidad real se realizó en el laboratorio de fertilidad de suelos, Colegio de Posgraduados, Chapingo México, por diferencia de volúmenes relacionados a su peso, a través del método del picnómetro (Aguilera y Domínguez, 1980, citado en Muñoz *et al.*, 2000).

Textura

La textura del suelo se realizó en el laboratorio de fertilidad de suelos, Colegio de Posgraduados, Chapingo México, por el método del hidrómetro de Bouyoucos (1962), basado en el cálculo de la velocidad de sedimentación de las partículas.

Nitrógeno total

La determinación de nitrógeno se realizó en el laboratorio de fertilidad de suelos, Colegio de Posgraduados, Chapingo México, por el método Micro-Kjeldahl, AOAC (1970).

Materia orgánica

La materia orgánica se realizó en el laboratorio de fertilidad de suelos, Colegio de Posgraduados, Chapingo México. Se cuantificó por el método de Walkley-Black citado en López y López (1978), mediante la oxidación con dicromato de potasio (K_2CrO_7) a 150°C y se determinó por titulación con sulfato ferroso, el dicromato de potasio gastado.

Iztapalapa, D.F. a 4 de Mayo del 2005

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

ESTUDIO DE LA ESTIMULACIÓN BIOLÓGICA PARA EL TRATAMIENTO DE RESIDUOS DE PERFORACIÓN PETROLERA EMPLEANDO LISÍMETROS

que presentó

ROBERTO RAFAEL RÍOS VÁZQUEZ

COMITÉ TUTORIAL

Director: Dr. Luis Carlos Fernández Linares
Instituto Mexicano del Petróleo

Asesor: Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Asesor: Dra. Norma G. Rojas Avelízapa
Instituto Mexicano del Petróleo

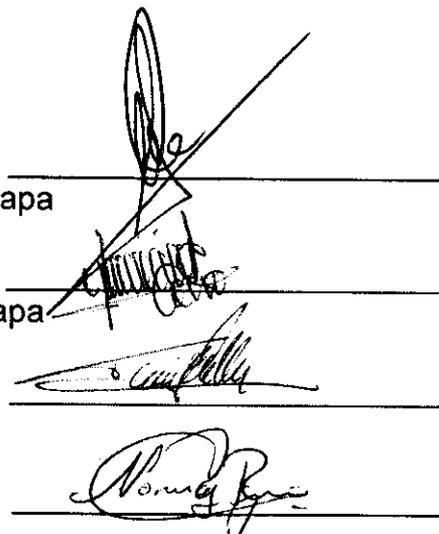
JURADO:

Presidente: Dr. Ernesto Favela Torres
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Secretario: Dr. Octavio Loera Corral
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Vocal: Dra. Tania Volke Sepúlveda
Instituto Nacional de Ecología

Vocal: Dra. Norma G. Rojas Avelízapa
Instituto Mexicano del Petróleo



The image shows four handwritten signatures, each placed above a horizontal line. The signatures are written in black ink and appear to be cursive. The first signature is the most prominent and is written over the line for the President of the Jury. The other three signatures are smaller and less distinct, corresponding to the Secretary and two vocal members of the Jury.