

Biodegradación de hidrocarburos
en suelos: Efecto de la adición de
cosubstratos gaseosos

**Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:**

M. en I.Q. ADELA IRMENE ORTIZ LOPEZ

México, D.F., Febrero, 2004.



Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Básicas e Ingeniería

**Biodegradación de hidrocarburos
en suelos: Efecto de la adición de
cosubstratos gaseosos**

Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta:

M. en I.Q. ADELA IRMENE ORTIZ LOPEZ

México, D.F., Febrero, 2004.



SERGIO
REVILLA



Casa abierta al tiempo
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Biodegradación de hidrocarburos en suelos: Efecto de la adición de cosubstratos gaseosos

Tesis que presenta

M. en I.Q. ADELA IRMENE ORTIZ LOPEZ

Para la obtención del grado de
Doctor en Ciencias

México, D.F., Febrero, 2004.



Casa abierta al tiempo
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Básicas e Ingeniería

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de tratamiento de emisiones gaseosas de la UAM-I bajo la asesoría de:

Dr. Sergio Revah M.
Dr. Richard Auria

Parte del desarrollo del modelo matemático fue realizado en el *Laboratoire de Mécanique et Génie Civil, Université Montpellier II*, Francia, bajo la dirección de:

M. Jean-Claude Bénet
M. Bruno Cousin

Los experimentos con fenantreno radioactivo fueron realizados en el *Laboratoire de Biotechnologie des Champignon Filamenteux del Institut National de la Recherche Agronomique, Marseille*, Francia, bajo la dirección de:

M. Jean-Claude Sigoillot

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgó una beca-crédito doctoral para la realización de este trabajo.

Miembros del Jurado:

Dr. Oscar Monroy Hermosillo (UAM-I)

Dr. Ernesto Favela Torres (UAM-I)

Dr. Sergio Revah Moiseev (UAM-I)

Dr. Luis Fernández Linares (IMP)

Dr. Karim Askar Acuña (UANL)

INDICE

Lista de Tablas	v
Lista de Figuras	vi
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
I. ANTECEDENTES	5
1.1. Contaminación ambiental	5
1.1.1. Contaminación con hidrocarburos.....	6
1.1.2. Contaminación con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).....	8
1.1.2.1. Exposición a los HAP y efectos en la salud	12
1.2. Técnicas de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos	13
1.2.1. Métodos fisicoquímicos	15
1.2.1.1. Inmovilización química	15
1.2.1.2. Técnicas de cubiertas y barreras	15
1.2.1.3. Vitrificación <i>in situ</i>	16
1.2.1.4. Extracción de vapor.....	16
1.2.1.5. Extracción líquida.....	17
1.2.1.6. Oxidación.....	17
1.2.1.7. Electro-remediación.....	18
1.2.1.8. Incineración.....	18
1.2.1.9. Lavado.....	18
1.2.1.10. Desorción térmica.....	19
1.2.2. Métodos de biorremediación.....	19
1.2.2.1. Atenuación natural.	21
1.2.2.2. Bioaugmentación.....	22
1.2.2.3. Bioventeo	23
1.2.2.4. Labranza	23
1.2.2.5. Bio-reactores	23
1.2.2.6. Composteo	24
1.2.2.7. Fito-remediación.....	26
1.2.2.8. Bioestimulación.....	27
1.2.2.9. Cosubstratos	27
1.2.2.10. Escalamiento de los procesos de biorremediación.....	29
1.3. Biodegradación de hidrocarburos	30
1.3.1. Biodegradación, biodisponibilidad y limitaciones	30
1.3.2. Fenantreno como modelo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	33
1.3.2.1. Características del fenantreno	33
1.3.2.2. Toxicidad	35
1.3.2.3. Degradación no biológica.....	35

1.3.2.4. Degradación microbiana	36
1.3.2.5. Mineralización y acumulación de metabolitos	40
1.3.3. Modelos matemáticos de biodegradación en suelos.....	45
1.3.3.1 Análisis de las tasas máximas de consumo de contaminante y de producción de CO ₂ mediante el modelo Gompertz	46
1.4. Antecedentes directos	50
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS	53
Objetivo general.....	53
Objetivos particulares	53
Hipótesis.....	54
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
3.1. Reactivos químicos.....	56
3.2. Suelos	56
3.2.1. Suelo UAM-I.....	56
3.2.1.1. Contaminación del suelo	56
3.2.1.2. Esterilización del suelo	57
3.2.2. Suelo INRA	58
3.2.3. Suelo Tamaulipas	58
3.2.4. Agente abultante	59
3.3. Microorganismos	59
3.3.1. Consorcio bacteriano.....	59
3.3.1.1. Aclimatación del inóculo.....	60
3.3.1.2. Cinéticas de crecimiento microbiano	60
3.3.2. Cultivo de <i>Trametes versicolor</i>	61
3.4. Experimentos	62
3.4.1 Microcosmos	62
3.4.1.1. Disolución de fenantreno.....	62
3.4.1.2. Cinéticas de consumo de fenantreno y tolueno en cultivos líquidos	63
3.4.1.3. Biodegradación de fenantreno (9- ¹⁴ C ₁₄ H ₁₀) y tolueno	64
3.4.1.4. Respiración de poblaciones microbianas.....	64
3.4.1.5. Biodegradación de ácido ftálico.....	65
3.4.2. Columnas empacadas	65
3.4.2.1. Sistema experimental	65
3.4.2.2. Biodegradación de fenantreno	68
3.4.2.3. Biodegradación de hidrocarburos	68
3.5. Análisis.....	69
3.5.1. Concentración de fenantreno.....	69
3.5.2. Producción de dióxido de carbono	69
3.5.3. Concentración de ¹⁴ C disuelto y ¹⁴ CO ₂	70

3.5.4. Concentración de tolueno	70
3.5.5. Identificación de metabolitos	71
3.5.6. Concentración de ácido ftálico.....	71
3.5.7. Cuantificación de HTP	71
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN I. Parte experimental.....	73
4.1. Biodegradación de fenantreno.....	73
4.1.1. Disolución de fenantreno	73
4.1.2. Efecto de la adición de tolueno en cinéticas de consumo de fenantreno en cultivos líquidos	75
4.1.3. Biodegradación de fenantreno en columnas empacadas.....	78
4.1.3.1. Efecto de la adición de tolueno en la biodegradación y la mineralización.	78
4.1.3.2. Productos intermediarios.....	80
4.1.3.3. Balances de carbono	83
4.1.3.4. Tasas de consumo de fenantreno y producción de CO ₂	84
4.1.3.5. Controles abióticos	86
4.1.3.6. Controles con poblaciones nativas y respiración endógena	87
4.1.3.7. Efecto de la adición de tolueno en las poblaciones microbianas	87
4.1.3.8. Reproducibilidad	90
4.1.4. Biodegradación de fenantreno (9- ¹⁴ C ₁₄ H ₁₀) y tolueno.....	91
4.1.5. Degradación de ácido ftálico.....	95
4.1.6. Conclusiones parciales	99
4.2. Degradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en columnas empacadas.....	99
4.2.1. Efecto de la adición de tolueno en la biodegradación de HTP.....	99
4.2.2. Efecto de la adición de tolueno en la mineralización de HTP	101
4.2.3. Efecto de la adición de tolueno sobre la población microbiana.....	102
4.2.4. Conclusión parcial	104
4.3. Discusión General	105
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN II. Modelado matemático	109
5.1. Descripción del sistema	109
5.2. Planteamiento del modelo	110
5.3. Hipótesis del modelo	112
5.4. Balances locales de materia	113
5.4.1. Balance de fenantreno	113
5.4.2. Balance de tolueno	114
5.4.3. Balance de ácido ftálico.....	115
5.5. Balance macroscópico.....	116
5.6. Modelo matemático simplificado	116

5.6.1. Balance de fenantreno	117
5.6.2. Balance de tolueno	118
5.6.3. Balance de ácido ftálico.....	118
5.6.4. Balance de CO ₂	119
5.6.5. Balance de biomasa.....	119
5.6.6. Constantes	120
5.6.7. Integración.....	121
5.6.8. Ajuste paramétrico	121
5.7. Conclusiones parciales	125
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	126
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
Anexo A. Rutas metabólicas de degradación de tolueno.....	139
Anexo B. Cálculos y calibraciones.....	142
Anexo B.1. Concentración de biomasa en función de la absorbancia.....	142
Anexo B.2. Curvas de calibración de controladores de flujo	142
Anexo B.3. Curva de calibración de fenantreno.....	143
Anexo B.4. Cálculos de la producción de CO ₂ y consumo de O ₂	144
Anexo B.5. Cálculos de dilución de fenantreno (9- ¹⁴ C ₁₄ H ₁₀)	144
Anexo B.6. Curva de calibración de tolueno	145
Anexo B.7. Curva de calibración de ácido ftálico.....	146
Anexo B.8. Modelo Gompertz	147
Anexo C. Diagramas de flujo de experimentos realizados.....	148
Anexo D. Resultados experimentales	152
Anexo D.1. Estándar de ácido ftálico.....	152
Anexo D.2. Estándar de fenantreno.....	153
Anexo D.3. Producción de CO ₂ durante la degradación de fenantreno en columnas empacadas	154
Anexo D.4. Producción de CO ₂ durante la degradación de HTP en columnas empacadas.....	154
Anexo E. Listado del programa	155
Anexo F. Nomenclatura	156
Anexo G. Artículos y presentaciones en congresos derivadas de esta tesis. ..	158

Lista de Tablas

Tabla 1.1. Distribución de derrames y fugas de hidrocarburos	7
Tabla 1.2. Principales fuentes y mecanismos de transporte de HAP en el ambiente	10
Tabla 1.3. HAP con interés ambiental y algunas de sus propiedades fisicoquímicas	11
Tabla 1.4. Técnicas de remediación de suelos.....	14
Tabla 1.5. Comparaciones entre las tasas de biotransformación o mineralización en laboratorio y campo	29
Tabla 1.6. Propiedades fisicoquímicas del fenantreno	33
Tabla 1.7. Microorganismos degradadores de fenantreno.....	37
Tabla 1.8. Biodegradación y mineralización de fenantreno.....	43
Tabla 1.9. Efecto de la adición de diferentes cosubstratos	51
Tabla 1.10. Características fisicoquímicas del tolueno	52
Tabla 3.1. Caracterización del suelo UAM-I	57
Tabla 3.2. Composición del medio mineral 3X.....	60
Tabla 3.3. Composición del medios de cultivo para <i>Trametes versicolor</i>	61
Tabla 4.1. Balances de carbono para cinéticas en cultivos líquidos con el consorcio bacteriano y <i>Trametes versicolor</i>	76
Tabla 4.2. Posibles compuestos asociados a picos presentes en análisis de GC-MS de muestras de suelo tratado sin adición de tolueno	81
Tabla 4.3. Balances de carbono para el fenantreno en experimentos de columnas	83
Tabla 4.4. Parámetros A, K y t_c del modelo Gompertz para el consumo de fenantreno y la producción de CO ₂ en columnas empacadas.....	85
Tabla 4.5. Mineralización y consumo de fenantreno y tolueno en experimentos de columnas para los controles con la población nativa	87
Tabla 4.6. Parámetros A, K y t_c del modelo Gompertz para la producción de CO ₂ en microcosmos para muestras finales de suelos tratados	89
Tabla 4.7. Balances de carbono ¹⁴ C en los experimentos de microcosmos	94
Tabla 4.8. Parámetros A, K y t_c del modelo Gompertz para la producción de CO ₂ para la degradación en microcosmos de ácido ftálico.....	97
Tabla 4.9. Balances de carbono para la degradación de ácido ftálico en microcosmos	98
Tabla 4.10. Mineralización de HTP iniciales en columnas empacadas	102
Tabla 4.11. Parámetros A, K y t_c del modelo Gompertz para la producción de CO ₂ en experimentos de columnas de las muestras finales	104
Tabla 5.1. Parámetros de ajuste del modelo simplificado	121

Lista de Figuras

Figura 1.1. Representación esquemática del ciclo ambiental de los HAP.....	14
Figura 1.2. Regiones K y bahía del fenantreno.....	34
Figura 1.3. Ruta metabólica de degradación de fenantreno vía naftaleno.	38
Figura 1.4. Ruta metabólica de degradación del fenantreno, vía ftalato.....	39
Figura 3.1. Diagrama de flujo de experimentos realizados	62
Figura 3.2. Esquemización del sistema experimental de columnas empacadas	67
Figura 4.1. Solubilidad de fenantreno en agua	74
Figura 4.2. Efecto de tolueno en fase gas sobre la solubilidad en medio mineral 3X de fenantreno adsorbido en suelo UAM-I.....	75
Figura 4.3. Consumo y mineralización de fenantreno y eficiencia de eliminación de tolueno en experimentos de columnas.....	79
Figura 4.4. Cromatograma y espectro de masa para una extracción de una muestra de suelo tratado en una columna sin tolueno.	80
Figura 4.5. Cromatogramas de GC-MS para extractos de suelo a 48, 100 y 190 horas de degradación de fenantreno en columnas empacadas	82
Figura 4.6. Consumo de fenantreno en columnas empacadas.....	85
Figura 4.7. Cromatograma para controles abióticos	86
Figura 4.8. Producción de CO ₂ en experimentos de microcosmos para muestras finales de suelo tratado en sistemas de columnas	89
Figura 4.9. Mineralización de fenantreno sin adición de Tolueno –vs- con adición de tolueno en experimentos en columnas empacadas.....	91
Figura 4.10. Consumo acumulado de tolueno en experimentos en microcosmos	92
Figura 4.11. Producción de ¹⁴ CO ₂ e intermediarios solubles y consumo de tolueno con el consorcio bacteriano	93
Figura 4.12. Producción de CO ₂ , productos solubles y consumo de tolueno para <i>T. versicolor</i>	95
Figura 4.13. Producción acumulada de CO ₂ en la degradación de ácido ftálico en microcosmos	96
Figura 4.14. Degradación de HTP en columnas empacadas	101
Figura 4.15. Producción de CO ₂ en experimentos de microcosmos para muestras finales de suelo tratado en sistemas de columnas.	103
Figura 4.16. Mecanismos propuestos para la degradación de hidrocarburos en un sistema con adición de cosustrato.....	106
Figura 5.1. Constituyentes del sistema.....	109
Figura 5.2. Esquemización de los procesos descritos por el modelo teórico	111
Figura 5.3. Consumo de fenantreno.....	122

Figura 5.4. Consumo de ácido ftálico.....	123
Figura 5.5. Producción de CO ₂	124
Figura 5.6. Producción de biomasa.....	125
Figura A.1. Ruta metabólica de degradación del tolueno para P. mendecina vía benzoato.....	139
Figura A.2. Ruta metabólica de degradación del tolueno para P. algaligenes vía Protocatecuato.	140
Figura A.3. Ruta metabólica de degradación del tolueno vía catecol.....	141
Figura B.1. Concentración de biomasa del consorcio bacteriano en función de la absorbancia.	142
Figura B.2. Curva de calibración de controlador másico Aalborg Mod. GFC17.	142
Figura B.3. Curva de calibración de controlador másico Matheson Mod. 8141.	143
Figura B.4. Curva de calibración de fenantreno. (HPLC, Thermo Separation Products).....	143
Figura B.5. Curva de calibración de tolueno. (GC-FID, Hewlett-Packard 5890).....	145
Figura B.6. Curva de calibración de ácido ftálico. (HPLC, Thermo Separation Products).....	146
Figura B.7. Simulación con el modelo Gompertz.....	145
Figura C.1. Diagrama de experimentos realizados con suelo INRA.....	146
Figura C.2. Diagrama de experimentos en cultivo líquido.....	147
Figura C.3. Diagrama de experimentos realizados con suelo UAM-I.....	148
Figura C.4. Diagrama de experimentos realizados con suelo Tamaulipas.....	149
Figura D.1. Cromatograma y espectro de masa del estándar de ácido ftálico.....	152
Figura D.2. Cromatograma y espectro de masa del estándar de fenantreno.....	153
Figura D.3. Producción de CO ₂ en la degradación de fenantreno en columnas empacadas.....	154
Figura D.4. Producción acumulada de CO ₂ en la degradación de HTP en columnas empacadas.....	154

RESUMEN

La degradación de hidrocarburos por microorganismos nativos representa uno de los principales mecanismos por los cuales estos contaminantes son eliminados del ambiente. Sin embargo, debido a su baja biodisponibilidad, las tasas de degradación de hidrocarburos en suelos suelen ser bajas. La baja biodisponibilidad de los hidrocarburos se atribuye principalmente a su baja solubilidad y su adsorción irreversible en la materia orgánica del suelo.

En este trabajo se estudió la estimulación de la población microbiana mediante la adición de tolueno en fase gaseosa como una fuente de carbono complementaria más fácilmente asimilable en el tratamiento de suelo contaminado con hidrocarburos. Las poblaciones probadas fueron un consorcio bacteriano y el hongo *T. versicolor* ambas fueron preadaptadas al consumo de tolueno y fenantreno. Para el tratamiento de hidrocarburos de petróleo se utilizó la población nativa de los suelos.

Dos tipos de suelos contaminados fueron estudiados. Un sistema modelo de suelo contaminado artificialmente con 1000 mg de fenantreno por kg de suelo seco. Muestras de suelo contaminado con 40,000 mg/kg_{ss} de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) provenientes de una refinería en el estado de Tamaulipas. Los suelos fueron tratados en columnas de vidrio de 0.5 L. Ambos suelos se utilizaron en mezcla con vermiculita como agente abultante inerte en una relación de peso húmedo de 80:20. Las columnas fueron alimentadas con corrientes de aire húmedo que contenían cargas de tolueno de 1 g/m³_{reactor}/h y 2.3 g/m³_{reactor}/h para el tratamiento de fenantreno y de HTP, respectivamente.

La solubilidad del tolueno es un orden de magnitud mayor que la del fenantreno, por lo que puede aportar carbono para el crecimiento y mantenimiento de las poblaciones microbianas. Por otro lado, dada su estructura química de ambos compuestos, algunas enzimas producidas en la degradación de tolueno podrían estar involucradas en la degradación del fenantreno y de algunos de los intermediarios.

Resumen

En el tratamiento de suelo contaminado con fenantreno, en 190 h, se obtuvieron eficiencias de eliminación de 100% para tolueno y más de 95% para fenantreno. Mientras que la mineralización de fenantreno se vio incrementada de 39% a 86% con la adición de tolueno como cosustrato gaseoso. En el tratamiento sin tolueno se observó la acumulación (40% del carbono inicial) de ácido ftálico, un metabolito soluble producto de la degradación de fenantreno. Experimentos en microcosmos, mostraron que la mineralización de ácido ftálico se incrementó de 20% a 80% en 45 h debido al consumo de tolueno. Experimentos en microcosmos con ^{14}C -fenantreno confirmaron los resultados observados en las columnas. Se encontró una mineralización de ^{14}C -fenantreno de 81% y 42% en 385 h en el suelo tratado con y sin tolueno, respectivamente. También se observó un incremento de ^{14}C en la fase líquida, confirmando la acumulación de intermediarios altamente solubles.

En el caso del suelo contaminado con HTP, se obtuvo una eliminación total de 99% del tolueno alimentado durante 98 días. En este período, la degradación total de HTP fue de 35% y 38% y su mineralización de 20% y 40% para las columnas control (sin tolueno) y tratados con tolueno, respectivamente.

En experimentos realizados con muestras finales de suelo tratado con y sin tolueno que consistieron en medir la respiración endógena, se observó una mayor producción de CO_2 de la población establecida en el tratamiento con tolueno. Estos resultados sugieren que las tasas de consumo más rápidas y la mineralización incrementada con el consumo simultáneo de tolueno pueden ser atribuidas a una mayor concentración de biomasa o al establecimiento de una biomasa más activa. La acumulación ácido ftálico, en el tratamiento de fenantreno sin la adición de tolueno, indica que el incremento en la mineralización puede deberse también a la activación de enzimas capaces de degradar los intermediarios cuando se adicionó tolueno.

Los resultados indican que la adición de un cosustrato gaseoso adecuado puede ser una estrategia para mejorar la mineralización de hidrocarburos en suelo. La adición de cosubstratos gaseosos a suelos contaminados, a través de un sistema de venteo, tiene las ventajas de permitir la alimentación de muy bajas concentraciones de manera homogénea en la matriz del suelo y de asegurar la eliminación completa del cosustrato.

Se plantea un modelo matemático que permite describir el efecto del tolueno como cosustrato gaseoso sobre la biodegradación de fenantreno y ácido ftálico (intermediario acumulado).

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que enfrenta la sociedad moderna es el deterioro y agotamiento de los recursos naturales. Los ecosistemas se ven alterados por una gran cantidad de sustancias químicas tóxicas generadas por diversas actividades industriales, de servicios, domésticas, urbanas y agrícolas.

En México, el deterioro en los recursos naturales y los problemas de salud que conllevan, han obligado a las autoridades a tomar algunas políticas al respecto. Estas incluyen, medidas preventivas para el cuidado de los ecosistemas y normas para regular que la emisión de contaminantes y su incorporación al medio natural se rija por la capacidad de éste último para absorberlos y neutralizarlos. Sin embargo, durante décadas enteras la ausencia de políticas ambientales permitieron la producción y utilización de sustancias cuyas consecuencias adversas potenciales no fueron comprendidas hasta mucho tiempo después, tal es el caso de muchos pesticidas que actualmente se encuentran en desuso. Por lo que, muchas de esas sustancias aún permanecen y permanecerán por largo tiempo en el ambiente constituyendo un riesgo para las poblaciones en contacto con ellas.

Es difícil precisar una definición de contaminante, se considera que son aquellos que causan abatimiento o la muerte de flora y fauna, impiden el uso del agua en industrias o ciudades y deterioran el medio ambiente, incluyendo el paisaje (Jiménez Cisneros, 2001). Los contaminantes por su origen, pueden ser clasificados en naturales y antropogénicos, es decir, los que son generados sin la intervención del hombre y los que se derivan de las actividades humanas.

Los hidrocarburos son compuestos ubicuos por lo que son considerados contaminantes naturales. Sin embargo, debido al creciente uso de combustibles fósiles en las actividades productivas, se vierten grandes cantidades de estos compuestos en agua, tierra y aire. Debido a sus características de explosividad y toxicidad los hidrocarburos aromáticos son clasificados como residuos peligrosos.

A pesar de que actualmente los procesos con conciencia ambiental están siendo impulsados, los tratamientos de restauración aún son necesarios y su estudio y mejoramiento son de amplio interés científico y ecológico.

Dentro de los tratamientos de restauración, los biológicos han demostrado ser efectivos y viables para la eliminación y control de contaminantes orgánicos. En este trabajo se estudió el efecto de un cosustrato gaseoso en el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.

I. ANTECEDENTES

1.1. Contaminación ambiental

En México, la Ley General para el Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, LGEEPA, (DOF, 1988) dice que: "Se entiende por contaminación la presencia en el ambiente de uno o mas contaminantes (materia o energía) o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico".

En el caso del agua se consideran contaminantes a los metales, cloruros, silicio, flúor, cianuros, sulfuros, sulfitos, sulfatos, materia orgánica y presencia de bacterias. Otro tipo de contaminantes son los detergentes, moléculas radioactivas, hidrocarburos, bifenilos policlorados, plaguicidas, fenoles, etc. Dependiendo del uso al que sea destinada, las concentraciones permisibles en agua de estos compuestos pueden variar. Por ejemplo, algunos de estos compuestos son necesarios para la vida acuática, sin embargo por arriba de ciertas concentraciones resultan tóxicas.

Para el aire, una definición de contaminación, es la que da la Norma francesa AFX43-001 (Jiménez-Cisneros, 2001) que dice: "Es la presencia de impurezas en el aire que pueden provocar perjuicio notable en la salud, la comodidad o los bienes humanos. Esta contaminación puede deberse a gases, vapores, partículas sólidas o líquidas e incluso radiaciones". Entre los principales contaminantes del aire se encuentran las partículas, especialmente las partículas menores a 10 μm , que afectan seriamente las vías respiratorias (Amador-Muñoz y col., 2001); gases y vapores de compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles que incluyen gases de combustión (excluyendo el CO_2) y otros como el H_2S , CS_2 , NO_x , NH_3 , etc.

En México, y especialmente en la zona metropolitana del valle de México (ZMVM) algunos de los contaminantes más abundantes emitidos al aire son propano, n- butano, tolueno, i-butano, i-pentano, acetileno, etileno, xileno, 2- metil pentano, n- hexano, terbutil-metil-éter (MTBE) y benceno (Arriaga y col., 1994).

Otro problema importante de contaminación es la generación de residuos sólidos industriales y municipales, la LGEEPA define residuo como "cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación,

producción, consumo, utilización, control o tratamiento cuya calidad no permita usarlo nuevamente en el proceso que lo generó". Algunos de estos residuos por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas son clasificados como residuos peligrosos ya que representan un peligro para la salud y el equilibrio ecológico, por lo tanto estos residuos deben ser manejados y dispuestos de manera especial.

Entre los principales residuos peligrosos generados en México se encuentran los solventes, aceites, grasas, pinturas, lacas, soldaduras (Pb-Sn), resinas, residuos ácidos y alcalinos, productos petroleros, metales pesados, adhesivos, freón, lodos, tintas, plásticos, etc. (Jiménez Cisneros, 2001).

En la ZMVM se estima que las emisiones anuales de contaminantes al aire son mayores a 3 millones de toneladas, el 85% proviene de los vehículos, el 10% de las industrias y los servicios y el 5% de contaminación natural por suelos y vegetación (INE-CENICA-JICA, 1997). Según el anuario estadístico de la SEMARNAT (SEMARNAT, 2001) del total de la superficie continental del país (1,959,248 km²) el 64% está afectada por algún tipo de contaminación y el 1.5% por contaminación química.

1.1.1. Contaminación con hidrocarburos

Debido a que el petróleo se ha encontrado en los océanos y la atmósfera desde largos períodos de tiempo geológico, los hidrocarburos son contaminantes naturales del ambiente (Connell, 1997). Por otro lado, las actividades relacionadas con los combustibles derivados del petróleo, tales como, la extracción, el refinamiento, el transporte y su consumo, contribuyen de manera importante a la contaminación por hidrocarburos, tanto por la cantidad de contaminantes vertidos como por su toxicidad.

En México, en la segunda parte de la década de los 70's, la petroquímica básica se convirtió en la actividad con mayor contribución a la contaminación. La producción de fibras sintéticas, resinas, fertilizantes, plásticos, pinturas, pigmentos y gases industriales pasaron a ser las actividades más relevantes por su impacto potencial al ambiente (Jiménez Cisneros, 2001). México es el noveno país con más

reservas probadas de petróleo crudo en el mundo, con 25,425 millones de barriles. PEMEX produce diariamente un total de 3,583,000 de barriles de petróleo crudo (promedio hasta agosto 2002) (PEMEX, 2001b). Según el informe 2002 de las auditorías ambientales de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA, 2002), en las instalaciones de PEMEX ocurrieron el 57% de las emergencias ambientales que se presentaron a nivel nacional con materiales peligrosos durante el período de 1997 al 2001. Según el mismo informe, los principales eventos de emergencia ambiental presentados durante dicho período fueron los derrames y fugas de compuestos como petróleo crudo, combustóleo, diesel, gasolina, turbosina, gas natural y amoníaco. En las instalaciones de PEMEX de los estados de Veracruz, Tabasco y Campeche ocurrieron el 88% de dichas emergencias ambientales. El informe de seguridad, salud y medio ambiente de PEMEX 2001, reporta que PEMEX generó un total de 1,250,507 toneladas de emisiones y descargas de los cuales 76.75% fueron emitidas al aire, 0.34% fueron descargadas en agua, 22.27% generaron residuos peligrosos y 0.64% fueron generadas en fugas y derrames de hidrocarburos (PEMEX, 2001a). La Tabla 1.1 presenta un desglose de las fugas y derrames reportados en dicho período.

Tabla 1.1. Distribución de derrames y fugas de hidrocarburos ^a

Derrames de hidrocarburos				Fugas de hidrocarburos	
Mar		Tierra		Aire	
Número	Volumen (barriles)	Número	Volumen (barriles)	Número	Cantidad (toneladas)
56	381	470	57653	723	90

^a(PEMEX, 2001a).

Aunque PEMEX ha obtenido 50 certificados de industria limpia, estas medidas son de reciente aplicación, después de 1988 año en que se aprobó la LGEEPA. Específicamente para la generación de sustancias tóxicas existe la Norma Oficial Mexicana NOM-052-ECOL-1993 (DOF, 1993) que establece las características de dichos residuos peligrosos así como los criterios de toxicidad para clasificar a un residuo como peligroso. Mientras que, la norma oficial mexicana NOM-117-ECOL-1998 (DOF, 1998), establece las especificaciones de protección ambiental para la

instalación y mantenimiento mayor de los sistemas para el transporte y distribución de hidrocarburos y petroquímicos en estado líquido y gaseoso, que se realicen en derechos de vía terrestres existentes, ubicados en zonas agrícolas, ganaderas y eriales.

1.1.2. Contaminación con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

La familia de los HAP consiste en moléculas que contienen carbono e hidrógeno únicamente, generalmente son sólidos. Están formados por 2 o más anillos aromáticos. Los HAP son particularmente considerados como contaminantes comunes de sedimentos y suelos.

La formación de HAP se lleva a cabo en atmósferas donde prevalecen las condiciones de oxígeno insuficientes para la combustión, la cantidad de HAP formada depende de la temperatura y de la naturaleza del material orgánico quemado. Sin embargo, sin importar el tipo de material, a temperaturas definidas se forma proporciones similares de HAP. También provienen de la formación geológica de los combustibles fósiles. En la combustión del petróleo y carbón algunos HAP son liberados sin cambios en emisiones y algunos son transformados en otros HAP. Los mecanismos de formación durante la combustión incompleta de materia orgánica han sido ampliamente estudiados. Dos reacciones están involucradas, la pirólisis y la pirosíntesis. A altas temperaturas, los compuestos orgánicos son parcialmente fragmentados a moléculas más pequeñas e inestables liberando energía (pirólisis). Estos fragmentos, principalmente radicales, se recombinan para formar hidrocarburos aromáticos que son moléculas más grandes y relativamente estables (pirosíntesis) (Kanaly y Harayama, 2000).

La presencia de HAP en aguas superficiales indica la presencia de una fuente de contaminación (generalmente puntual) ya que, dada su baja solubilidad y su afinidad a quedarse adsorbidas en las partículas suspendidas, las concentraciones de HAP en agua no son altas. El nivel de HAP en aguas no contaminadas está en un rango de 0 a 5 ng/L. En agua potable, los HAP más comúnmente detectados son fluorantreno, fenantreno, pireno y antraceno, siendo el más persistente el fluorantreno (OMS, 1998). La principal fuente de contaminación del agua potable con

HAP son los recubrimientos utilizados contra la corrosión en las tuberías de distribución. Sin embargo, en algunos ríos localizados lejos de puntos altamente industrializados se han detectado concentraciones de hasta 50 ng/L. Estas concentraciones han sido atribuidas a la abrasión y lixiviado de la capa de alquitrán que es utilizada periódicamente para prevenir la corrosión de embarcaciones. El lixiviado de los HAP de suelos contaminados a aguas subterráneas no es considerable, debido a que los compuestos permanecen preferentemente adsorbidos en la materia orgánica del suelo. Sin embargo, en suelos altamente contaminados, los HAP pueden alcanzar las aguas superficiales, encontrándose concentraciones de hasta 10 µg/L.

Los HAP también se encuentran asociados a las partículas suspendidas menores a 10 µm que son de los principales indicadores de la contaminación atmosférica. Los HAP se encuentran en los aerosoles atmosféricos en fase vapor (HAP con dos anillos), en fase vapor-partícula (tres y cuatro anillos) y en la fase particulada (HAP con cinco o más anillos) (Amador-Muñoz y col., 2001). En ausencia de industria u otras fuentes de contaminación, los HAP en la atmósfera son emitidos por la calefacción residencial y el tráfico vehicular. Concentraciones elevadas de HAP (flourantreno, benzo[*b*]fluorantreno, pireno, indeno[1,2,3-*cd*]pireno y fenantreno) han sido observadas en agua de lluvia y especialmente en nieve y niebla (OMS, 1998). Ésto es resultado probablemente de la adsorción de los compuestos en las partículas suspendidas en el aire, que son finamente depositadas durante las precipitaciones pluviales.

La industrialización creciente de la sociedad y el amplio uso de los combustibles derivados del petróleo han provocado un incremento en la presencia ambiental de los HAP. Algunas fuentes antropogénicas de HAP son la combustión de carbón, las centrales eléctricas, quemadores abiertos, los gases de combustión de los automóviles, algunos procesos industriales y las actividades de extracción, transformación, transporte y combustión de combustibles fósiles. En países desarrollados, la calefacción residencial y el tráfico de vehículos son las principales fuentes emisoras de HAP al aire ambiental. Mientras que, para el aire en interiores, el

humo del cigarro es la principal fuente de HAP. La Tabla 1.2 muestra las principales fuentes y mecanismos de transporte de HAP en el ambiente.

En general, los HAP son lipofílicos y poseen muy bajas solubilidades en agua. La Tabla 1.3 presenta algunos de los HAP con interés ambiental más comunes y algunas de sus características. Como es de esperarse con el aumento del peso molecular y del tamaño de la molécula, la solubilidad y la presión de vapor disminuyen. El coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) mide la tendencia de un compuesto a disolverse en la grasa de la biota y otras sustancias lípidas tales como ácidos húmicos en suelos y sedimentos.

Tabla 1.2. Principales fuentes y mecanismos de transporte de HAP en el ambiente ^a

• Filtración natural de petróleo.	• Emisiones de automóviles.
• Desechos de refinerías y almacenaje de petróleo.	• Desechos del procesamiento del carbón y alquitrán de hulla.
• Desechos de cresota y otros conservadores madera.	• Combustión de combustibles fósiles (gasolina, queroseno, carbón, diesel)
• Derrames accidentales en tanques y contenedores de transporte de petróleo.	• Lluvia de cenizas y partículas atmosféricas
• Descargas de aguas municipales.	• Alimentos ahumados, al carbón o fritos.
• Humo de cigarros y tabaco.	• Incendios forestales.
• Actividades de recreación y comerciales en botes.	• Procesos de gasificación y licuefacción de hulla.
• Desechos de incineradores.	• Lodos del drenaje urbano y rural.
• Efluentes de la industria petroquímica.	

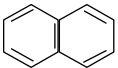
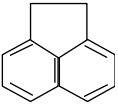
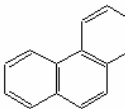
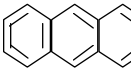
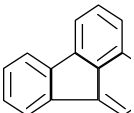
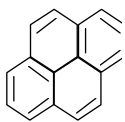
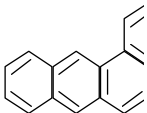
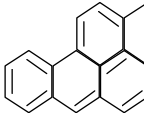
^a (Cerniglia, 1992).

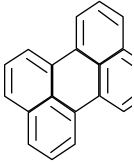
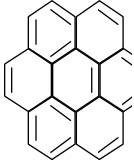
Como regla general, se puede decir que la persistencia de HAP incrementa con el aumento del tamaño de la molécula, por ejemplo, el benzopireno en un sistema acuoso se degrada mucho más lento que el naftaleno (Connell, 1997). Los HAP, químicamente, son relativamente estables, pero son solubles en lípidos y la exposición constante o intermitente a estas sustancias lipofílicas puede resultar en su acumulación en algunos organismos. Para ser eliminados los HAP deben ser convertidos en sustancias más polares, ya sea por la oxigenación directa o combinación con otros ligandos orgánicos.

Muchos de los HAP han demostrado ser fuertes agentes cancerígenos, la primera evidencia directa de su relación con el cáncer fue documentada en los años 30's. El benzo[a]pireno está clasificado como uno de los compuestos cancerígenos

más potentes conocidos. Dada su peligrosidad, es de interés primordial el estudio del tratamiento de los HAP cuando se encuentran contaminando los suelos (Connell, 1997).

Tabla 1.3. HAP con interés ambiental y algunas de sus propiedades fisicoquímicas

HAP	Estructur.	Peso Molecula	Log K _{ow} ⁱ	Solubilidad (mg/L _{H2O}) ^a	Concentració Ambiental ^b (ng/m ³)
Naftaleno C ₁₀ H ₈		128.2	3.36	31.794	0.05-0-35
Acenafteno C ₁₂ H ₁₀		154.2	3.92	39.321	0.1-6
Fenantreno C ₁₄ H ₁₀		178.2	4.57	1.292	0.04-25
Antraceno C ₁₄ H ₁₀		178.2	4.54	7.306 x 10 ⁻²	0.07-6.15
Fluorantreno C ₁₆ H ₁₀		202.3	4.90	2.610 x 10 ⁻¹	0.1-41
Pireno C ₁₆ H ₁₀		202.3	5.18	1.351 x 10 ⁻¹	0.1-35
Benzoantraceno C ₁₈ H ₁₂		228.3	5.61	1.402 x 10 ⁻²	0.5-22
Benzopireno C ₂₀ H ₁₂		252.3	6.04	3.810 x 10 ⁻³	0.1-75

Perileno C ₂₀ H ₁₂		253.3	6.04	4.027 x 10 ⁻⁴	0.1-5
Coroneno C ₂₄ H ₁₂		300.4	6.90	1.403 x 10 ⁻⁴	0.2-48

^a(Connell, 1997).

^b(US-National Research Council, 1983)

1.1.2.1. Exposición a los HAP y efectos en la salud

Dos tipos de riesgos fundamentales pueden asociarse a la existencia de sitios contaminados por HAP:

- Aquellos que resultan de la exposición de la población humana a los contaminantes, y
- Aquellos que resultan de la exposición de los ecosistemas naturales.

Debido a que los HAP en la naturaleza se encuentran en mezclas, en general, no se habla de exposición ambiental o laboral a un compuesto en particular sino de exposición a un grupo de HAP. Se considera que las principales rutas de exposición a HAP para una población son vía su inhalación del ambiente y su ingesta vía los alimentos.

Un reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1998) relaciona un aumento en la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón con la exposición a HAP debido a la quema de carbón sin ventilación. Mientras que para una serie de actividades tales como, gasificación de carbón, cocina con carbón, plantas de producción de aluminio, actividades relacionadas con asfalto, hornos de carbón, y emisiones de diesel, la OMS concluye que si bien no fue posible establecer su relación directa con aumento en el desarrollo de cáncer de pulmón, existe un riesgo incrementado debido, por lo menos en parte, a los HAP.

Los HAP han sido detectados en vegetales frescos, frutas y cereales como resultado del arrastre de HAP en el aire, particularmente en las zonas industriales o

en áreas con mucho tráfico. Los HAP también han sido encontrados en mejillones, caracoles y pescados de aguas contaminadas. También se encuentran en niveles elevados en aceites vegetales y margarinas, formados probablemente durante el procesamiento. Los HAP se forman también durante algunos métodos de preparación de alimentos, tales como, asados, hervidos, rostizados, fritos o cocidos al carbón. Los niveles más altos son detectados en carnes y pescados ahumados o asados, alrededor de 200 µg/kg. En países en vías de desarrollo, donde el uso de hornos de carbón abiertos es más frecuente para calentamiento y cocción de alimentos, se puede incrementar la exposición a los HAP.

Dependiendo de la cultura, la variedad de las dietas y métodos de preparación, la ingesta de HAP puede variar en cada país. Se considera que los principales alimentos que contribuyen a la ingesta de HAP son los cereales, aceites y grasas. Los aceites y grasas tienen niveles individuales más altos de HAP, mientras que los cereales, aunque nunca contienen altos niveles de un solo HAP, es el principal contribuyente en peso, de la ingesta total en la dieta. Las carnes y pescados ahumados, aunque contienen niveles más altos de HAP, contribuyen en menor proporción ya que son componentes menores de la dieta normal. Se estima que la cantidad de HAP ingerida por beber agua corresponde al 1% del total de HAP en la ingesta diaria, asumiendo 2 litros de agua por día (OMS, 1998).

1.2. Técnicas de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos

Dependiendo de sus propiedades físicas y químicas (*i.e.* la solubilidad y la presión de vapor) los hidrocarburos son liberados en todas las fases ambientales aire, agua y suelo. Una vez que son descargados al ambiente, existen varios mecanismos que pueden ocurrir. La Figura 1.1 muestra una representación esquemática del ciclo ambiental de los HAP. Los principales mecanismos de degradación de los HAP involucran procesos químicos, fotoquímicos o metabólicos asociados a microorganismos, en muchas situaciones, todos estos procesos pueden ocurrir juntos. La degradación microbiana es el principal proceso para la eliminación de los HAP en el ambiente (Weissenfels y col., 1992). Estos procesos están fuertemente

influenciados por factores ambientales tales como la temperatura, disponibilidad de oxígeno, poblaciones de microorganismos, etc.

El ciclo ambiental de HAP es tomado en cuenta en los tratamientos de suelos contaminados con HAP. La Tabla 1.4 enumera algunas de las técnicas existentes. En los tratamientos químicos la aplicación de un agente químico promueve la extracción de la sustancia peligrosa. Los tratamientos físicos utilizan algún proceso físico para transferir de fase al contaminante. Los métodos biológicos, en cambio, implican la degradación del contaminante por organismos vivos. Los compuestos tratados por métodos biológicos generalmente son de tipo orgánico, aunque algunos compuestos inorgánicos también pueden ser biotransformados o bioacumulados.

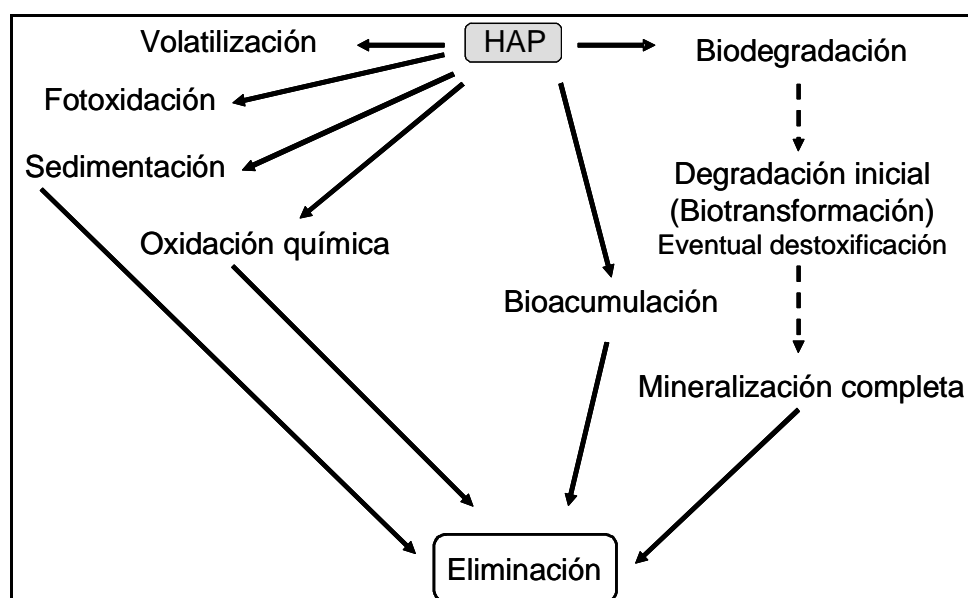


Figura 1.1. Representación esquemática del ciclo ambiental de los HAP. Adaptado de Cerniglia, 1992.

Otra clasificación importante de los tratamientos de remediación los agrupa en dos grandes grupos, *in situ*, aquellas que involucran la descontaminación del material sin ser removido del lugar donde es generado y, *ex situ*, aquellas que involucran el transporte del material contaminado al área donde será tratado.

Tabla 1.4. Técnicas de remediación de suelos

Tratamientos		
Biológicos	Químicos	Físicos
Atenuación natural	Inmovilización química	Cubiertas
Bioaugmentación	Extracción líquida	Electro-remediación
Bioventeo	Oxidación	Incineración
Labranza		Vitrificación <i>in situ</i>
Bio-reactores		Lavado de suelo
Composteo		Extracción con vapor
Fito-remediación		Desorción térmica
Bioestimulación		

1.2.1. Métodos fisicoquímicos

Basados en principios físicos y químicos, estos métodos están limitados por las condiciones hidrogeológicas del suelo. Especialmente, la heterogeneidad geológica que puede interferir con la circulación de los agentes químicos que se utilizan para extraer los contaminantes. A continuación se describen brevemente algunas de las características de estos métodos.

1.2.1.1. Inmovilización química

Consiste en la adición al suelo de compuestos, tanto solubles como insolubles que interactúan con los contaminantes inmovilizándolos. Dichos compuestos son agregados por métodos como la saturación, la solución química, por aspersion, por inyección forzada, o labranza. Este método ha sido exitoso en la reducción de movilidad de metales disminuyéndola hasta en un 95%. El costo de la inmovilización *in situ* está en un rango de 14 hasta 39 USD/ton (Hamby, 1996).

1.2.1.2. Técnicas de cubiertas y barreras

Los sistemas de cubiertas *in situ* permiten un mecanismo de estabilización mediante la reducción de la cantidad de agua que está en contacto con el material contaminante. La cubierta generalmente está compuesta por 3 capas, una capa superficial que soporta la vegetación, una capa de drenaje y una capa de venteo de gases (Hamby, 1996). Los costos de las cubiertas pueden variar entre 43 y 55 USD/m² (FRTR, 2004).

Las barreras reactivas son un método promisorio para el tratamiento de plumas de contaminación. Aunque no eliminan directamente los contaminantes

limitan la migración de plumas que emanan de la zona contaminada. Una de sus limitaciones es la vida útil de las barreras.

Otro tipo de barreras con las llamadas barreras reactivas permeables que además de interceptar la pluma de contaminantes en su superficie tiene materiales reactivos para el tratamiento de los contaminantes. Diversos materiales reactivos están siendo probados, incluyendo material biológico. Los costos de la implementación de una barrera pueden variar de 540 a 750 USD/m² dependiendo del tipo de suelo a tratar y del tipo de material de la barrera (FRTR, 2004). Los costos de operación y mantenimiento de estas tecnologías son relativamente bajos.

1.2.1.3. Vitrificación *in situ*

Es el proceso para convertir suelo en material fundido no peligroso. Este proceso consiste en calentar eléctricamente el suelo hasta temperaturas de 1600 a 2000 °C, a dichas temperaturas los contaminantes orgánicos son destruidos por pirólisis. El volumen de reducción del suelo es de entre el 20 y el 40%. Aunque este proceso permite el tratamiento simultáneo de diversos tipos de contaminantes y reduce la toxicidad, movilidad y volumen del material es un método muy caro debido al alto costo energético para alcanzar las altas temperaturas. Los costos del tratamiento pueden ir desde 375 a 425 USD/ton de suelo tratado dependiendo de los costos de la electricidad, la cantidad de agua utilizada y la profundidad requerida en el tratamiento (FRTR, 2004).

1.2.1.4. Extracción de vapor

Este método consiste en la perforación de la zona contaminada y en la aplicación de vacío para extraer el aire. El aire extraído es deshumidificado y filtrado para eliminar los compuestos volátiles que posteriormente son liberados a la atmósfera. Es efectivo en el tratamiento de zonas que contienen compuestos volátiles en suelos homogéneos y permeables. Complementado con procesos térmicos, esta tecnología se puede extender a compuestos semi-volátiles. Debido a las bajas solubilidades en agua de algunos contaminantes, éstos tienden a permanecer como líquidos orgánicos en la superficie, lo que se conoce como una fase líquida no acuosa (FLNA). Una parte de la FLNA permanecerá atrapada en los poros del suelo. La

efectividad de la extracción de vapor para eliminar contaminantes de una FLNA depende de una permeabilidad que permita la succión del aire a través de toda la zona, lo cual puede ser difícil de lograr (US-National Research Council, 1999). Los costos estimados de este tratamiento in situ varían entre 10 y 50 USD/m³ (FRTR, 2004).

1.2.1.5. Extracción líquida

Este método *ex situ* utiliza como agente extractor un gas licuado a su temperatura crítica. Típicamente se utiliza dióxido de carbono, propano, butano y algunas veces etanol. Los compuestos orgánicos, principalmente bifenilos policlorados (PCBs) y HAP, son los más apropiados para ser extraídos de suelos y lodos mediante esta técnica. La eficiencia de esta tecnología con compuestos volátiles y semi-volátiles es de 99.9%. Una desventaja es que el líquido de extracción requiere de algún procesamiento subsiguiente o confinamiento. El costo de instalación varía entre 100,000 y 1,000,000 USD. (Hamby, 1996).

1.2.1.6. Oxidación

Consiste en llevar las moléculas contaminantes a un estado más oxidado, generalmente menos tóxico. Existen varios procesos de oxidación que pueden reducir el volumen y toxicidad de los contaminantes, tales como la adición de peróxido de hidrógeno, dióxido de cloro y ozono, la fotopirólisis y la dechlorinización reactiva. Los agentes químicos utilizados pueden oxidar los contaminantes a compuestos orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, a menudo no pueden degradar completamente los contaminantes, por lo que se requiere de algún otro método de tratamiento para degradar los productos oxidados.

El peróxido de hidrógeno fácilmente oxida las moléculas orgánicas y aromáticas. La fotooxidación aprovecha que la mayoría de los compuestos absorben la energía luminosa y que dicha energía puede promover la descomposición química de las moléculas contaminantes. Por ejemplo, la luz ultravioleta puede romper muchos tipos de enlaces covalentes. Así, la fotodegradación de PCBs, dioxinas, HAP y muchos constituyentes aromáticos de las gasolinas ha sido reportada. (Hamby, 1996). Los costos de las tecnologías dependen del agente oxidante utilizado, del tipo de

contaminante y del volumen a tratar, sin embargo, los costos típicos varían entre 130 y 390 USD/m³ de suelo (Hamby, 1996).

1.2.1.7. Electro-remediación

Este método consiste en implantar electrodos en el suelo y aplicar una corriente directa. Las especies iónicas y las partículas cargadas en el agua del suelo se movilizan hacia los electrodos. En los electrodos, los contaminantes son tratados con algún método como precipitación o complejación (Hamby, 1996). Los costos estimados para un tratamiento de escala completa son de 117 USD/m³ (FRTR, 2004). Sin embargo, son poco prácticos para compuestos orgánicos, debido a la naturaleza no iónica de dichas moléculas. Para llevarla a cabo se debe adicionar algún solvente como fase móvil y las eliminaciones logradas son bajas, alrededor de 20% (Li y col., 2000).

1.2.1.8. Incineración

Existen varios tipos de incineradores, en ellos los contaminantes son volatilizados y quemados a temperaturas entre 870 y 1200 °C. A dichas temperaturas las sustancias peligrosas son destruidas de manera efectiva, reduciendo tanto su toxicidad como su volumen. En general, las mezclas de desechos producen complicaciones técnicas e incrementan el costo del proceso. Otra desventaja es la generación de emisiones gaseosas. Dependiendo del tipo de incinerador, la eficiencia requerida, los contaminantes y el volumen a tratar, los costos de estos procesos pueden variar, sin embargo, por lo general son métodos muy caros. El tratamiento de una tonelada de suelo en un incinerador puede variar entre 220 y 1,100 USD (FRTR, 2004). Los incineradores móviles pueden reducir los costos de transporte.

1.2.1.9. Lavado

Este método consiste en un proceso de reducción de volumen de un suelo contaminado. En general, este proceso está compuesto de varios pasos, el primer paso consiste en un lavado físico para remover el suelo grueso (>2 mm). Posteriormente múltiples pasos de procesos de extracción química con el fin de lavar el suelo mas fino. Estos procesos pueden consistir en calentamiento y lavados con

agua, surfactantes o aditivos. Cuando las partículas mayores a 2 mm están limpias entonces se separan, quedando únicamente las partículas mas finas, reduciendo notablemente el volumen de suelo contaminado. El costo promedio de esta tecnología, incluyendo excavación, es de alrededor de 170 USD/ton (FRTR, 2004).

1.2.1.10. Desorción térmica

La desorción térmica consiste en volatilizar los contaminantes orgánicos del suelo mediante el uso de temperaturas hasta de 400 °C. Los contaminantes extraídos pueden ser destruidos o condensados. Su eficiencia es alta, por ejemplo a 300 °C y un tiempo de residencia de 30 minutos se remueven más de 99% de los HAP y de los compuestos orgánicos. Sin embargo, los costos energéticos son altos. El costo estimado para tratar una tonelada de suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo varía entre 40 a 300 USD (FRTR, 2004).

1.2.2. Métodos de biorremediación

Los tratamientos biológicos para problemas de contaminación han demostrado ser procesos eficientes y viables. La biorremediación es la utilización de microorganismos o procesos microbianos para detoxificar y degradar contaminantes ambientales (Baker y Herson, 1994). Las técnicas de biorremediación aprovechan la capacidad de la naturaleza para transformar contaminantes, modificando las condiciones para favorecer los procesos de biodegradación.

Aunque la biorremediación es vista como una tecnología nueva, el uso de microorganismos es una práctica muy antigua en la transformación de efluentes sólidos, líquidos y gaseosos. En los tratamientos biológicos los contaminantes, generalmente, son transformados en bióxido de carbono, agua y biomasa. Los costos de operación en general son bajos, debido a que operan a condiciones ambientales. Dependiendo del volumen de suelo pueden variar entre 50 y 90 USD/m³ de suelo. Otra de sus principales ventajas con respecto a los tratamientos fisicoquímicos es que estos procesos no generan desechos.

Independientemente de si el tratamiento se realiza *in situ* o *ex situ*, la eficiencia de todas las tecnologías de biorremediación depende de combinar las poblaciones microbianas con las condiciones ambientales correctas. Es decir, tener los

microorganismos con las capacidades fisiológicas y metabólicas para llevar a cabo la degradación de los contaminantes y además, controlar o modificar los factores ambientales para optimizar el crecimiento y actividad metabólica de los microorganismos. Entre ellos, se encuentran la temperatura, los nutrientes inorgánicos (nitrógeno y fósforo principalmente), los aceptores de electrones (oxígeno, nitrato y sulfatos) y el pH (Baker y Herson, 1994).

El mecanismo más común para la degradación metabólica de HAP mediante microorganismos es el cometabolismo del HAP con algún material orgánico degradable. El proceso usualmente involucra la oxidación de los HAP para producir materiales oxidados que son subsecuentemente degradados a productos más simples, aunque no necesariamente menos tóxicos (Alexander, 1994).

Para seleccionar la estrategia de biorremediación adecuada para tratar un sitio específico se deben tomar en cuenta varios factores tales como, la caracterización del sitio, que incluye la identificación y cuantificación de los contaminantes, la determinación de los requerimientos orgánicos e inorgánicos, la identificación de los factores de seguridad; así como pruebas para determinar las tasas de degradación potenciales, límites de concentración y la degradación de posibles subproductos tóxicos.

Las rutas bioquímicas de transformación en ambientes complejos, no siempre llevan a los contaminantes a sustancias menos tóxicas que las originales. Las conversiones deben ser evaluadas en términos del alcance de la reacción y de la toxicidad de los intermediarios producidos. La biodisponibilidad de los contaminantes para los microorganismos es una característica del sistema que depende de las propiedades físicas, químicas y estructurales del contaminante y del suelo, así como de los principales mecanismos de transporte que se llevan a cabo. La bioactividad se emplea para indicar el estado de operación de los procesos microbiológicos. La biodisponibilidad y la bioactividad pueden ser utilizadas para determinar la viabilidad de una estrategia de biorremediación para un sitio específico (Blackburn y Hafker, 1993).

Entre las principales tecnologías de biorremediación de hidrocarburos se encuentran: la atenuación natural, la bioaumentación, la biofiltración, la bioestimulación, los bio-reactores, el bioventeo y el composteo.

El principal criterio en la aplicación de los procesos de biorremediación es el nivel residual de los contaminantes que deben ser alcanzadas más que el porcentaje de contaminantes que pueden ser degradados. A continuación se presentan las definiciones y características importantes de las técnicas de biorremediación más comunes.

1.2.2.1. Atenuación natural.

La definición de atenuación natural mas aceptada es la que provee la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos US-EPA (por sus siglas en inglés) que define la atenuación natural monitoreada como la confianza en los procesos (en el contexto de un enfoque de control cuidadoso y monitoreo del sitio) para lograr los objetivos de remediación del sitio específico en un tiempo acotado que sea razonable comparado con aquellos ofrecidos por otros métodos más activos. En dicha definición se entiende por monitoreo que los sitios deben ser observados hasta que sea evidente que los contaminantes han sido completamente tratados.

Los procesos de atenuación natural que actúan en dicho enfoque incluyen una variedad de procesos químicos, físicos o biológicos que actúan sin la intervención humana, bajo condiciones favorables, para reducir la masa, toxicidad, movilidad, volumen, o concentración de contaminantes en suelo o agua subterránea. Este proceso *in-situ* incluye biodegradación, dispersión, dilución, volatilización, decaimiento de radioactividad y estabilización química o biológica, transformación o destrucción de contaminantes.

Debido a que muchos procesos se involucran en la atenuación natural, la desaparición de los contaminantes no es el único criterio que tiene que ser evaluado, sino que la evaluación de los mecanismos por los cuales ocurre es también importante para la viabilidad de la atenuación natural como una estrategia.

Esta opción es aplicada cuando los riesgos que representa la contaminación no son altos y se tiene suficiente tiempo para dejar que la degradación se lleve de manera natural, cuando estas condiciones se dan, la atenuación natural puede ser el

método más barato y apropiado. En México, algunos estudios han señalado la posibilidad de usar atenuación natural en sitios contaminados con petróleo en el país (Fernández-Linares y col., 2003).

En el caso de HAP los mecanismos predominantes que afectan la atenuación natural son la biotransformación y la inmovilización, la probabilidad de éxito para esta técnica es baja debido a que dichos procesos no han sido del todo estudiados (US-National Research Council, 2000).

Los costos mas importantes de esta tecnología son los debidos a los requerimientos de monitoreo que incluyen la caracterización previa del sitio y el monitoreo, aunque también existen los costos para el modelado matemático.

1.2.2.2. Bioaumentación

Consiste en la adición de cultivos microbianos cuya efectividad en metabolizar los contaminantes a eliminar ha sido probada previamente en el laboratorio. Esta tecnología es utilizada en el tratamiento de suelos y agua cuando en el medio no existen los microorganismos adecuados o las condiciones para que la degradación se lleve a cabo.

La efectividad de la bioaumentación, también llamada inoculación, ha sido más ampliamente probada en tratamientos *ex situ*, en donde a diferencia de las inoculaciones *in situ*, las condiciones de estrés biótico pueden ser mejor controladas. Para garantizar la viabilidad de la bioaumentación se recomienda que el tamaño del inóculo debe ser mayor o al menos igual que la población nativa (Macnaughton y col., 1999). Algunas de las causas por las que la bioaumentación puede no resultar exitosa son: la limitación por nutrientes, la presencia de depredadores y parásitos, la inmovilidad de los microorganismos, el uso de otras fuentes de carbono, concentraciones del sustrato que no sostienen el crecimiento y actividad de la población (Alexander, 1994). Un estudio sobre la degradación de pireno con *Mycobacterium sp.* indicó que en la mineralización del contaminante la competencia con los microorganismos nativos es un factor importante (Cheung y Kinkle, 2001).

Esta técnica ha sido utilizada para el tratamiento de desechos de la industria del petróleo y para el tratamiento de derrames de hidrocarburos (Alexander, 1994).

Los costos típicos para este tratamiento varían entre los 30 y 100 UDS/m³ de suelo (FRTR, 2004).

1.2.2.3. Bioventeo

Es un método *in situ* de tratamiento de suelos contaminados que consiste en la oxigenación del suelo para estimular el crecimiento y actividad microbiana. Para la adición de oxígeno existen varias estrategias, la inyección, tubos perforados, recirculación de agua enriquecida en oxígeno entre otras. Cuando el oxígeno es agregado a través de aire, la humedad del flujo es importante para permitir las reacciones de biodegradación. Esta técnica es especialmente atractiva para suelos no saturados contaminados con hidrocarburos. Los costos de operación de un sistema típico de bioventeo varían entre los 10 y 70 USD/m³ de suelo (FRTR, 2004).

1.2.2.4. Labranza

Es un tratamiento en donde una capa de suelo contaminado es aplicada en un suelo no contaminado y son arados continuamente para asegurar el mezclado y la aireación, con las técnicas comunes de agricultura (Baker y Herson, 1994). Las poblaciones microbianas del suelo realizan la degradación de los contaminantes. El suelo está contenido en barreras impermeables y cuenta con un sistema de colección de biolixiviados. La principal desventaja de esta técnica es la utilización de suelo no contaminado. Este método es complementado con algunas otras técnicas como la bioaugmentación, el bioventeo o la adición de agentes abultantes. El costo de este tratamiento *ex situ* es de alrededor de 100 USD/m³ de suelo (FRTR, 2004).

1.2.2.5. Bio-reactores

Este tratamiento *ex situ*, consiste en el tratamiento de líquidos, suelos o lodos contaminados en contenedores o reactores. Las escalas de estos reactores pueden variar. El material tratado en estos reactores requiere de un tratamiento previo para una homogeneización macroscópica mediante mezclado mecánico. Algunos de los factores físico-químicos que se toman en cuenta en el diseño y operación de los reactores de lodos son: las propiedades hidrodinámicas de la biomasa suspendida, propiedades cinéticas de los microorganismos, fenómenos de superficie e

interfaciales, efectos de producción de espuma, flotación y sedimentación (Baker y Herson, 1994).

En los reactores de fase sólida el principal objetivo es acelerar los procesos y la homogeneización mediante la agitación o mezclado. El principal reto de los bio-reactores es favorecer las condiciones para el crecimiento y mantenimiento microbiano a pesar de las perturbaciones externas. Los costos para instalar una unidad de tratamiento de un área entre 9,300 y 13,900 m² varían entre 80,000 y 85,000 USD (FRTR, 2004).

1.2.2.6. Composteo

Existen varias técnicas de biorremediación *ex situ* en fase sólida, tales como las pilas de composteo, los tratamientos de fase sólida y las biopilas. El tratamiento con pilas de composteo es una tecnología de escala completa, en la cual, suelos excavados son mezclados con materiales sólidos degradables usados como agentes abultantes, y puestos en una área de tratamiento que incluye un sistema de colección de lixiviados y alguna forma de aireación. Es utilizado para reducir las concentraciones de constituyentes del petróleo en suelos (US-EPA, 1993). Debido a que se agrega materia orgánica degradable a este tratamiento también se le conoce como composteo. En el caso de suelos contaminados con petróleo algunas propuestas incluyen la adición de desechos agroindustriales como cáscaras de frutas (Roldan-Carrillo y col., 2003).

Una biopila es una pila de suelo contaminado a la que se le adicionan nutrientes y algunas veces también es microorganismos. Algunas biopilas contienen tuberías para proveer aire y agua. La adición de sólidos abultantes en estos sistemas sirve para facilitar la distribución del aire y para estimular el proceso de biodegradación. La humedad, la temperatura, los nutrientes, el suplemento de oxígeno y el pH pueden ser controlados también con el mismo fin. En general, las biopilas son cubiertas para controlar la evaporación y volatilización y para promover el calentamiento.

La biopila es un tratamiento rápido respecto a los tratamientos *in situ*. La duración de operación y mantenimiento pueden ir desde unas cuantas semanas hasta meses. Esta tecnología es apropiada para el tratamiento de suelos

contaminados con compuestos orgánicos volátiles (COV) no-halogenados e hidrocarburos de combustibles cuyas concentraciones finales requeridas varíen entre 250 y 1000 mg de HTP/kg de suelo (von Fahnestock y col., 1998). Su utilización para tratamiento de COVs halogenados, semi-COVs y pesticidas es factible con algunos de los compuestos de estos grupos pero su efectividad puede variar. Los compuestos clorados deben estar en cantidades bajas y la concentración de metales tóxicos debe de estar por debajo de 2500 mg/kg suelo. El volumen total de suelo contaminado a tratar, al menos debe ser de 200 m³. Los costos estimados para una pila de composteo estática y con agitación mecánica son de 236 USD y 290 USD, respectivamente mientras que el costo estimado del tratamiento varía entre 130 a 260 USD/m³ (FRTR, 2004).

Algunas de las ventajas de las biopilas son (von Fahnestock y col., 1998):

- Destrucción definitiva de los contaminantes,
- Diseño y construcción relativamente fáciles,
- Tiempos de biorremediación relativamente cortos,
- No requiere de confinamiento futuro del suelo tratado,
- Costo competitivo de tratamiento comparado con la desorción térmica y la labranza que son tratamientos comúnmente utilizados,
- Es una tecnología efectiva para contaminantes orgánicos que son difíciles para la desorción térmica,

Por otro lado las limitantes del tratamiento con biopilas son: (von Fahnestock y col., 1998)

- Resistencia a la degradación de HAP de 5 y 6 anillos
- Puede no ser efectivo en el tratamiento de suelos con concentraciones mayores a 50000 mg de HTP/kg. Sin embargo, durante la excavación, las concentraciones pico son reducidas, debido a que el suelo altamente contaminado es mezclado con suelo de alrededor menos contaminado.
- Inhibición del desarrollo microbiano por la presencia de concentraciones altas de metales pesados (> 2500 mg/kg).

1.2.2.7. Fito-remediación

La fito-remediación es una tecnología emergente que utiliza plantas para degradar, extraer, estabilizar o inmovilizar contaminantes (US-EPA, 2000). Puede ser aplicada in situ o ex situ, para tratamiento de suelos, sedimentos y aguas. Las plantas pueden ser usadas en remediación de suelos tanto para la mineralización de compuestos orgánicos tóxicos como para la acumulación y concentración de metales pesados y otros compuestos inorgánicos. En muchos casos la fito-remediación sirve como tratamiento final de sitios donde ya se han utilizado otras tecnologías de remediación.

Los mecanismos de la fito-remediación incluyen: a) biorremediación en la rizosfera, ésta se lleva a cabo en el suelo o en el agua que rodea las raíces de las plantas, también es conocida como fitoestimulación; b) la fitoextracción, también conocida como fitoacumulación, consiste en la captación de los contaminantes por las raíces de las plantas y la translocación/acumulación de los contaminantes en las hojas y tallos de las plantas; c) la fitodegradación consiste en el metabolismo de los contaminantes en los tejidos de las plantas y; d) la fitoestabilización es la producción de compuestos por las plantas para inmovilizar los contaminantes en la interfase de las raíces y el suelo (US-EPA, 2000).

Esta tecnología ha sido aplicada en estudios a nivel piloto y escala completa para el tratamiento de compuestos tales como hidrocarburos de petróleo, incluyendo BTEX y HAP; bifenilos policlorados; metales tales como plomo, cadmio, zinc; arsénico y pesticidas. Algunas de las ventajas de esta tecnología son sus costos, la estética y su aplicabilidad a largo término (US-EPA, 2000). El costo estimado para el tratamiento de un acre de suelo contaminado con plomo hasta una profundidad de 50 cm es de entre 60,000 a 100,000 USD es decir entre 30 y 50 USD/m³ de suelo (FRTR, 2004).

Por otro lado, algunas de las limitaciones de la fito-remediación son que solo son eficaces para tratar contaminantes que se encuentren en los primeros 3 metros de profundidad del suelo, los tiempos de tratamiento para alcanzar los límites permisibles pueden ser largos, la potencial contaminación de la vegetación y de la

cadena alimenticia y la dificultad de establecer y mantener la vegetación (GWRTAC, 1998).

1.2.2.8. Bioestimulación

Es el método de tratamiento de suelo y/o agua que puede realizarse tanto *in situ* como *ex situ*. Consiste en la estimulación de las poblaciones nativas con la adición de nutrientes. En el caso de derrames de hidrocarburos, las fuentes de carbono son altas. Sin embargo, los suelos pueden tener bajos contenidos de nitrógeno y fósforo. Es en estos casos cuando la adición de fertilizantes ha sido exitosa. Sin embargo, no todos los casos de adición de nutrientes resultan exitosos, en algunos casos la biodegradación se ve inhibida por la presencia de nitrógeno. Las causas de este fenómeno no están completamente entendidas. Una de las explicaciones posibles es que una mayor cantidad de carbono es incorporado a la biomasa en presencia de altos niveles de N, por lo que, se reduce la producción de monóxido de carbono (Alexander, 1994). Por lo tanto, lo que en realidad varía es el rendimiento de células producidas por cantidad de sustrato consumido y la tasa de producción de CO₂. Los costos estimados para este tratamiento varían entre los 30 y 100 UDS/m³ de suelo dependiendo de los compuestos adicionados (FRTR, 2004).

La bioestimulación no se restringe únicamente a la adición de nutrientes, sino a cualquier componente ajeno al sistema cuya adición al sistema produzca alteraciones capaces de mejorar la degradación de los contaminantes. Por ejemplo, la adición de surfactantes altera la solubilidad de los compuestos. La adición de un compuesto que pueda ser utilizado en un proceso de cometabolismo o como cosustrato, altera la conformación de la población microbiana (Acuna-Askar y col., 2003). En la siguiente sección se ahonda en la adición de cosustratos.

1.2.2.9. Cosustratos

Se ha reportado que la adición de fuentes de carbono más fácilmente asimilables altera substancialmente la cinética de degradación de contaminantes orgánicos (Scow y col., 1989). La degradación y la mineralización de compuestos orgánicos cuando se encuentran en bajas concentraciones pueden estar controladas por la presencia de otros compuestos orgánicos. La estimulación y la inhibición

debidas a la presencia de un segundo sustrato depende de los microorganismos, factores ambientales, la concentración y naturaleza del cosustrato y del contaminante que se quiere eliminar (Schmidt y Alexander, 1985). El efecto de la adición de fenol, glucosa y glutamato sobre la biodegradación de *p*-nitrofenol en suelos fue estudiada por Scow y col., 1989. La adición de fenol en una concentración de 10 mg/kg_{suelo} mejoró la mineralización del *p*-nitrofenol. Otras concentraciones de fenol y de otros compuestos probados no tuvieron efecto sobre la biodegradación del *p*-nitrofenol. La adición de glucosa favorece la degradación de 2,4, diclorofenoxi-acetato y del metil-paratión mientras que la anilina favoreció la mineralización de dicloroanilina (Scow y col., 1989). Para la degradación cometabólica de compuestos policlorados, como el tricloroetileno, el tolueno ha sido utilizado como cosustrato favoreciendo una degradación más rápida y completa (Fan y Scow, 1993). Inclusive se ha reportado un tratamiento de escala completa para la degradación de tricloroetileno mediante la inyección de pulsos de tolueno, este proceso se llevaba a cabo mediante cometabolismo (McCarty y col., 1998). Para favorecer la degradación de tricloroeteno, se estudiaron varios cosubstratos, tales como, pentanol, oleato de calcio y aceite de oliva, la adición de los dos primeros resultaron en un incremento de degradación del tricloroeteno (Yang y McCarty, 2002). Para pesticidas como el malatión, se reporta que es biodegradado en suelo a tasas mayores cuando el *n*-hexadecano está presente como cosustrato (Merkel y Perry, 1977). También se ha reportado que la degradación de *ter*-butil-metil-éter (MTBE) se ve afectada por la presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables (Acuna-Askar y col., 2000).

El uso de cosubstratos en biorremediación *in situ* también se ha aplicado en la formación de zonas reactivas para evitar la migración de mezclas de benceno, tolueno y xileno hacia las aguas subterráneas (Alvarez y col., 1998).

Por otro lado, se ha observado que la adición de residuos de plantas puede estimular o retrasar la tasa descomposición del humus nativo en suelos no contaminados. Se ha reportado el incremento en la mineralización de carbono y de fósforo debido a la presencia de un sustrato externo. Este cambio en la tasa de descomposición es llamado "priming" y es generalmente positivo (Stevenson, 1982). El efecto "priming" ha sido medido tanto en experimentos de campo como en laboratorio,

sin embargo, poco se ha estudiado sobre los mecanismos que intervienen (Kuzyakov y col., 2000).

1.2.2.10. Escalamiento de los procesos de biorremediación

Uno de los principales problemas que enfrentan los procesos de biorremediación es el escalamiento. La Tabla 1.5 presenta una comparación de varios reportes de degradación de diversos compuestos, para estudios de laboratorio y de degradación *in situ*, (Blackburn, 1998).

Tabla 1.5. Comparaciones entre las tasas de biotransformación o mineralización en laboratorio y campo

Aplicación de biorremediación	Contaminantes	Porcentaje de error relat entre escala laboratorio escala completa (%)
Biorremediación <i>in situ</i> activa	Gasolina y diesel	-159
	Benceno	-384 a -11900
	Tolueno	80 a -2043
Biorremediación intrínseca <i>in situ</i> , cinética de 1er. Orden	Etilbenceno	-33 a -73
	m, p-xileno	-1400 a -1438
	m-xileno	-43
	o-xileno	-1650 a -2567
Biorremediación intrínseca <i>in situ</i> , cinét de orden cero.	Tolueno	-89
	m-xileno	-64
	o-xileno	-6
Labranza	Hidrocarburos de petróleo	-390
Labranza	Combustible No.6	-192
Labranza y tratamiento <i>in situ</i> activo	Hidrocarburos de petróleo	-82
Labranza	Hidrocarburos de petróleo	-144
Labranza	Diesel	5 a 22
	HAP de 2 anillos	-50
	HAP de 3 anillos	3
	HAP de 4 a 5 anillos	13
	HAP totales	8
	Benceno	-8
Tratamiento con reactor de escurrimien	preservación de madera	Concordancia entre la cin y en punto final.
Biorremediación de derrames de petróle playas	Petróleo crudo prom. de 15 HAP	-626

(Blackburn, 1998)

Como se puede apreciar el porcentaje de error relativo entre las tasas de biodegradación en laboratorio e *in situ* es muy grande. Estas diferencias llevan a diseños de estrategias de biorremediación con errores en el tiempo estimado para la remediación del 50 al 200%. Las causas de estas grandes diferencias no son claras, sin embargo, existen varios posibles factores. Los estudios de laboratorio permiten identificar a los microorganismos responsables de la degradación y los mecanismos metabólicos de la misma. Sin embargo, las condiciones en el laboratorio y el campo no son similares ya que existen factores limitantes adicionales. El transporte de materia en un medio heterogéneo de alta complejidad, se ve afectado por la presencia de multifases, mezcla de contaminantes. Además la competencia con las poblaciones nativas, las heterogeneidades espaciales y las condiciones microambientales que pueden limitar o inhibir el desarrollo microbiano. De aquí la importancia de estudios básicos que permitan entender los procesos que ocurren en los tratamientos de biorremediación y su modelado matemático para un escalamiento exitoso de estos procesos.

1.3. Biodegradación de hidrocarburos

1.3.1. Biodegradación, biodisponibilidad y limitaciones

En el ambiente, los hidrocarburos muestran una biodegradación moderada. Sin embargo, la oxidación biológica es uno de los principales mecanismos por los cuales estos compuestos son eliminados del ambiente. Esto se debe a algunas características de los microorganismos tales como la producción de emulsificantes naturales que favorecen la solubilidad de los contaminantes y a la hidrofobicidad de su pared celular (Stucki y Alexander, 1987). Inclusive está documentada la actividad microbiana para la degradación de petróleo crudo (Bosecker y col., 1991; Phelps y col., 1994; de Jonge y col., 1997).

Ciertos hidrocarburos son recalcitrantes en condiciones ambientales, debido probablemente a la inexistencia de algunas enzimas capaces de modificar la molécula, la impermeabilidad de la célula, la inaccesibilidad de la molécula al sitio donde se encuentra la enzima que puede degradarla, que la concentración del

sustrato sea muy pequeña para inducir la activación de la enzima requerida, que la degradación deba llevarse a cabo bajo condiciones de cometabolismo o debido a factores ambientales como nutrientes, humedad, O₂, inhibidores del crecimiento, entre otros.

La biodegradación de hidrocarburos en suelos comprende una mezcla de procesos complejos que involucran la difusión de los contaminantes en la matriz porosa del suelo, adsorción en la superficie del suelo, la desorción del contaminante y la biodegradación en la biopelícula existente en la superficie de la partícula de suelo, en los macroporos así como en el agua libre y ligada.

Existen varias condiciones que se tienen que satisfacer para que se lleve a cabo exitosamente la biodegradación de un compuesto contaminante. Alexander, en 1994, menciona que se deben tener los microorganismos degradadores en las condiciones ambientales adecuadas para la proliferación de las poblaciones y la accesibilidad de los compuestos contaminantes.

Bosma y col., en 1997, citan que dos de los factores críticos que afectan la tasa de conversión durante la biodegradación son:

- La actividad intrínseca de la célula, es decir, la actividad bioquímica de los microorganismos y
- La tasa de transferencia de masa del contaminante a la célula.

La biodisponibilidad relaciona la tasa de transferencia de masa y la actividad intrínseca de las células, esta cantidad es el inverso del número de Damköhler¹. La biodisponibilidad está controlada por procesos físicos, químicos y biológicos tales como la adsorción-desorción, la difusión, la disolución y la reacción biológica. La literatura reporta que en la mayor parte de los casos el factor crítico para la degradación es la transferencia de masa. Las limitaciones en la transferencia de masa, pueden deberse a diversos factores tales como: las características de la pared de los microorganismos, la distribución espacial de contaminantes y

¹ Numero de Damköhler. $Da_1 = \frac{k_R}{k_a} = \frac{\text{Tasa de reacción}}{\text{Tasa de transferencia de masa}}$

microorganismos, las propiedades fisicoquímicas del contaminante y las características del medio poroso.

Los microorganismos activos reducen las concentraciones locales del contaminante, de los nutrientes y de los aceptores de electrones en la superficie de las células. La degradación es más eficiente cuando esta reducción en la superficie se lleva a cabo a bajas concentraciones del contaminante.

La distribución espacial de los contaminantes y los microorganismos es importante, ya que, para que la degradación se lleve a cabo, éstos deben estar en contacto. La baja movilidad de los microorganismos en los suelos hace que las distancias medias entre las microcolonias y los contaminantes sean relativamente grandes. Además, los contaminantes se difunden lentamente hacia poros extremadamente pequeños de menos de 1 μm , especialmente en los suelos contaminados durante mucho tiempo (Bosma y col., 1997). En la mayoría de los suelos del 30 al 50% del volumen total de poros está compuesto por poros de diámetros menores a 0.2 μm . La mayoría de las bacterias de los suelos tienen un tamaño entre 0.5 y 0.8 μm y ocupan poros con un diámetro promedio de 2 μm , es decir, que del 30 al 50% de los poros son inaccesibles para los microorganismos (Harms y Bosma, 1997).

Las propiedades del contaminante determinan su capacidad de sorción y desorción del suelo y por tanto su disponibilidad para los microorganismos. Algunos estudios muestran que estas interacciones pueden ser muy fuertes provocando una desorción muy lenta del contaminante (Bosma y col., 1997). La baja solubilidad del fenantreno es una de las causas de su baja biodisponibilidad. En algunos casos el fenantreno tiene respuestas inhibitorias con la membrana celular debido a su naturaleza fuertemente hidrofóbica (Stucki y Alexander, 1987).

En suelos, frecuentemente es observado que la tasa de asimilación de contaminantes orgánicos que son degradados lentamente decrece con el tiempo hasta que eventualmente el consumo es nulo después de un período muy largo (White y col., 1997; Chung y Alexander, 1999). Dado que los microorganismos degradadores de los contaminantes están presentes entonces se asume que es el contaminante el que se vuelve menos biodisponible. Este proceso se conoce como "secuestro" o

"envejecimiento" de los compuestos orgánicos. Estudios han mostraron que el secuestro de fenantreno ocurre tanto a concentraciones elevadas como a bajas concentraciones. Sin embargo, ésto puede variar de acuerdo a las propiedades del suelo (Chung y Alexander, 1998). Otros autores han encontrado evidencia de que la limitación de la tasa de degradación de HAP puede deberse a factores microbiológicos más que a problemas de biodisponibilidad a altas concentraciones de los contaminantes (Huesemann y col., 2002).

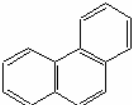
En estudios con suelos contaminados con hidrocarburos se encontró que el mecanismo que controla la biodisponibilidad de los hidrocarburos a altas concentraciones es la solubilidad de la fase líquida no acuosa (FLNA) en el suelo (de Jonge y col., 1997). Mientras que los mecanismos limitantes a bajas concentraciones son la desorción y la difusión.

1.3.2. Fenantreno como modelo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

1.3.2.1. Características del fenantreno

El fenantreno es un HAP de 3 anillos bencénicos, que como ya se mencionó, es producto de la combustión de materia orgánica en condiciones de limitación de oxígeno, de la formación geológica de los combustibles fósiles. También es generado por fuentes antropogénicas ligadas principalmente a la industria petrolera. La vida media del fenantreno en sedimentos es de 4 a 18 semanas (Connell, 1997). Parte del fenantreno liberado al ambiente es absorbido por las partículas en suspensión en la atmósfera; Sin embargo, dado que la volatilidad y solubilidad son muy bajas, su principal destino es el suelo. Algunas de las propiedades fisicoquímicas más importantes del fenantreno se muestran en la Tabla 1.6.

Tabla 1.6. Propiedades fisicoquímicas del fenantreno

Formula molecular	C ₁₄ H ₁₀
Peso Molecular (g/gmol)	178.2
Estructura	

Solubilidad (mg/L _{H2O})	1.0 ^a 1.1 ^b 1.3 ^c 1.6 ^d
Coef. Part. octanol-agua Log K _{ow}	4.57
Peso específico	1.025
Densidad	1.179 g/ml, a 25 °C
Punto de fusión:	100 °C
Punto de ebullición:	339 °C, a 760 mmHg
Volatilidad:	Presión de vapor: 0.5 mmHg, a 20 °C Densidad del vapor: 6 (Aire=1)
Soluble en	Hexano, benceno, tolueno, Tetracloruro de carbono, éter, bisulfuro de carbono.

^a (Nam y Kukor, 2000).

^b (Alexander, 1994; Connell, 1997).

^c (Cerniglia, 1992; Connell, 1997; Zhang y col., 1997; Ressler y col., 1999; Guieysse y col., 2000).

^d (Stucki y Alexander, 1987).

El fenantreno es el más simple de los HAP que tiene las regiones K y bahía y por eso es empleado como modelo para estudiar los HAP. La región de bahía se forma entre los carbonos 4 y 5, mientras que la región K se forma entre los carbonos 9 y 10 (Figura 1.2). La importancia de estas regiones estriba en el hecho de que el ataque microbiológico es específico en alguna de ellas dependiendo del microorganismo y la enzima producida.

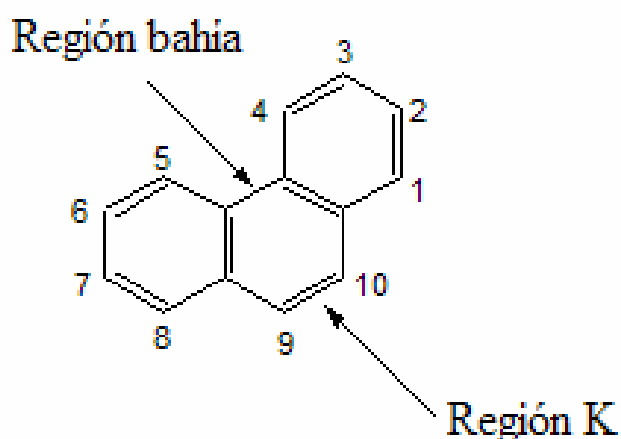


Figura 1.2. Regiones K y bahía del fenantreno.

1.3.2.2. Toxicidad

Aunque el fenantreno no ha sido clasificado como cancerígeno o mutagénico, sí se ha demostrado que es tóxico para algunas especies marinas. La concentración letal de fenantreno reportada para una microcrustácea es de 0.245 mg/L (Traczewska, 2000). La principal fuente de contacto del hombre con el fenantreno es a través de su ingestión en alimentos contaminados. En general, se considera que la biotransformación de los HAP resulta en una detoxificación de las sustancias consideradas como potencialmente peligrosas. Sin embargo, ha sido demostrado que para ciertas moléculas exógenas, incluyendo HAP, algunos metabolitos resultantes son más tóxicos que su molécula generadora. Es decir, que la biotransformación que debería generar compuestos hidrofílicos relativamente inocuos, por el contrario genera radicales libres o electrofílicos altamente reactivos. Algunos estudios proveen evidencia de incrementos en la toxicidad de suelos contaminados con HAP después de un tratamiento de bioaumentación (Cheung y Kinkle, 2001). La acumulación de metabolitos y su toxicidad será discutida en la sección 1.3.2.5.

1.3.2.3. Degradación no biológica

Como ya se mencionó entre los mecanismos de degradación del fenantreno están los químicos, fotoquímicos y biológicos. La transformación no biológica, incluye algunos tratamientos de oxidación de fenantreno con ozono (Nam y Kukor, 2000; Choi y col., 2001; Zeng y Hong, 2002). Sin embargo, estos tratamientos tienen mejores resultados en sistemas homogéneos que en heterogéneos. Por otro lado, es importante tener en cuenta que durante la ozonificación numerosos intermediarios se forman, por lo que se requiere de un tratamiento biológico posterior. También se han aplicado tratamientos de electro-remediación lográndose eliminaciones de 43% en suelo contaminado con 26 mg/kg en 150 días usando solventes como fase continua móvil (Li y col., 2000). El uso de tratamientos combinados incluye pretratamientos con solventes como acetona, etanol y tolueno (Lee y col., 2001; García-Rivero y col., 2002). Un estudio con pretratamiento con acetona reporta una mejora en la tasa de transformación de fenantreno en un 30% con un tipo de suelo, mientras que con otro suelo se observó una disminución de 11%. Mientras que para el etanol, el mismo

estudio, no reportó efectos sobre la tasa de transformación de fenantreno (Lee y col., 2001).

1.3.2.4. Degradación microbiana

La degradación biológica de fenantreno puede ser realizada por microorganismos autóctonos pero la velocidad de degradación depende fuertemente de las condiciones ambientales tales como la humedad, el pH, la temperatura, la disponibilidad de oxígeno y los tipos de microorganismos presentes.

En 1928, Tausson, reportó por primera vez el aislamiento de 3 bacterias degradadoras de fenantreno (*Bacillus phenanthrenicus bakiensis*, *Bacillus phenanthrenicus guricus* y *Bacterium phenanthrenicum*) provenientes de suelos contaminados con petróleo (Evans y col., 1965). Actualmente, una gran variedad de bacterias y hongos han sido reportados como microorganismos degradadores de fenantreno (Tabla 1.7).

Dos rutas metabólicas completas para fenantreno han sido publicadas. Una implica el metabolismo del fenantreno a través de la ruta llamada del naftaleno y la otra a través de la formación de ácido ftálico como intermediario. La ruta completa de degradación del fenantreno fue descrita por Evans y col., en 1965, para una especie de *Pseudomonas aeruginosa* extraída de suelo. La ruta completa es presentada en la Figura 1.3. En esta ruta el ácido 1-hidroxi-2-naftalato es oxidado a 1,2-didroxinaftaleno que es degradado vía la ruta del naftaleno a salicilato y sucesivamente metabolizado.

En 1976, Kiyohara y col., propusieron una ruta alternativa a la de Evans y col., a través de la formación de *o*-ftalato, utilizando una cepa de *Areomonas sp.* aislada también de suelos. La Figura 1.3 presenta la ruta completa propuesta. En esta ruta, el ácido 1-hidroxi-2-naftóico es metabolizado vía la ruta del ftalato.

En ambas rutas el ataque inicial es debido a la acción de una dioxigenasa que actúa entre el carbono que forma la región de la bahía (Figura 1.4) y el carbono aledaño. La degradación del fenantreno por hongos involucra el ataque de la región K mediante la utilización de una monoxigenasa y una hidrolasa epóxida.

Tabla 1.7. Microorganismos degradadores de fenantreno

ORGANISMOS	REFERENCIAS
Bacterias	
<i>Acidovorax delafieldii</i>	(Shuttleworth y Cerniglia, 1996; Samanta y col., 1999)
<i>Acinetobacter</i>	(Cerniglia, 1992)
<i>Aeromonas sp.</i>	(Kiyohara y col., 1976; Ghosh y Mishra, 1983)
<i>Alcaligenes denitrificans</i>	(Ghosh y Mishra, 1983; Weissenfels y col., 1990; Cerniglia, 1992)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	(Rehmann y col., 2001)
<i>Artherobacter sp.</i>	(Keuth y Hans-Jürgen, 1991; Samanta y col., 1999; Traczewska 2000; Schwartz y Scow, 2001)
<i>Artherobacter polychromogenes</i>	
<i>Artherobacter sulphureus</i>	
<i>Bacillus alvei</i>	(Traczewska, 2000)
<i>Bacillus sp.</i>	(Doddamani y Ninnekar, 2000)
<i>Beijerinckia sp.</i>	(Stucki y Alexander, 1987; Cerniglia, 1992)
<i>Brevibacterium sp.</i>	(Samanta y col., 1999)
<i>Burkholderia sp.</i>	(Bogan y col., 2001; Rehmann y col., 2001)
<i>Coryneform SAntMU3</i>	(Rehmann y col., 2001)
<i>Flavobacterium sp.</i>	(Stucki y Alexander, 1987; Cerniglia, 1992)
<i>Gordona sp. BP9</i>	(Rehmann y col., 2001)
<i>Micrococcus sp.</i>	(Ghosh y Mishra, 1983)
<i>Mycobacterium sp.</i>	
<i>Mycobacterium austroafricanum</i>	(Guerin y Jones, 1988; Cerniglia, 1992; Tiehm, 1994; Rehmann col., 2001)
<i>Mycobacterium flavescens</i>	
<i>Mycobacterium gilvum</i>	
<i>Nocardia sp.</i>	(Cerniglia, 1992)
<i>Vibrio sp.</i>	(Ghosh y Mishra, 1983)
<i>Pseudomonas sp.</i>	(Evans y col., 1965; Ghosh y Mishra, 1983; Weissenfels y col., 1990; Volkering y col., 1992; Bouchez y col., 1995; Providenti y col., 1996; Bogan y col., 1996; Deschênes y col., 1996; Grimberg y col., 1996; Dagher y col., 1997; White y col., 1997; Ortega-Calvo y Saiz-Jimenez, 1998; Chen y Aitken, 1999; Samanta y col., 1999; Smit col., 1999; Bramwell, 2000; Dean y col., 2001; Rehmann y col., 2001)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>Pseudomonas paucimobilis</i>	
<i>Pseudomonas putida</i>	
<i>Pseudomonas saccharophilla</i>	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	
<i>Rhodococcus sp.</i>	(Cerniglia, 1992; Rehmann y col., 2001)
<i>Sphingomonas sp.</i>	(Shuttleworth y Cerniglia, 1996; Dagher y col., 1997; Cuny y col., 1999; Bogan y col., 2001; Rehmann y col., 2001)
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	
<i>Streptomyces sp.</i>	(Cerniglia, 1992)
<i>Streptomyces griseus</i>	
Hongos	
<i>Trametes versicolor</i>	(Bumpus, 1989; Cerniglia, 1992; Rama y col., 2000)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	(Bumpus, 1989; Brodkorb y Legge, 1992; Qiu y col., 1992; Barci col., 1995; Bogan y col., 1996; May y col., 1997)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	(Bezalel y col., 1996; Márquez-Rocha y col., 2000)
<i>Cunninghamella elegans</i>	(Cerniglia, 1992)
Cianobacterias y algas	
<i>Oscillatoria sp.</i>	(Cerniglia, 1992)
<i>Agmenellum quadruplicatum</i>	(Cerniglia, 1992)

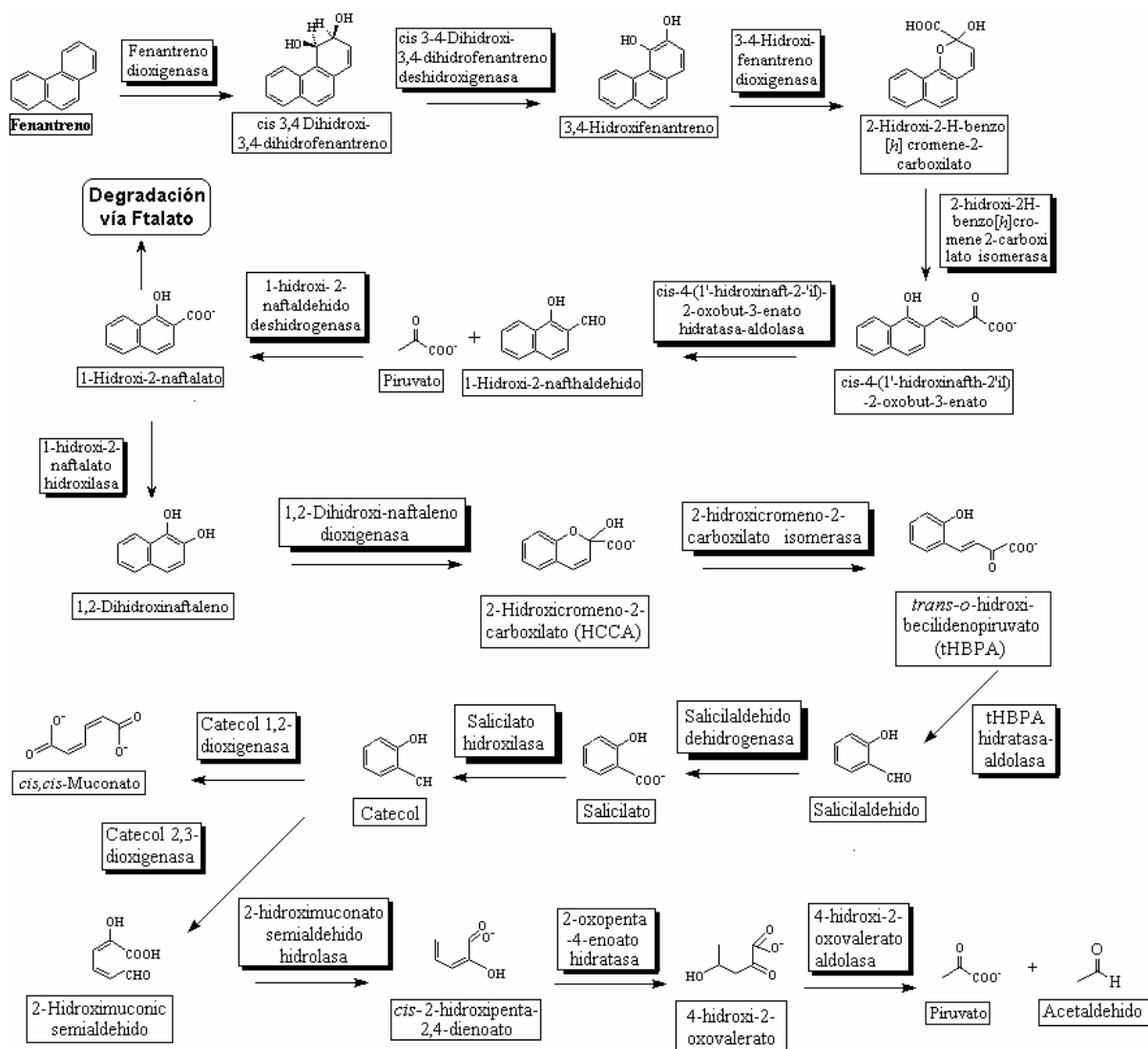


Figura 1.3. Ruta metabólica de degradación de fenantreno vía naftaleno. Tomado de la base de datos de biocatálisis/biodegradación de la Universidad de Minnesota. http://umbbd.ahc.umn.edu/pha/pha_map.html.

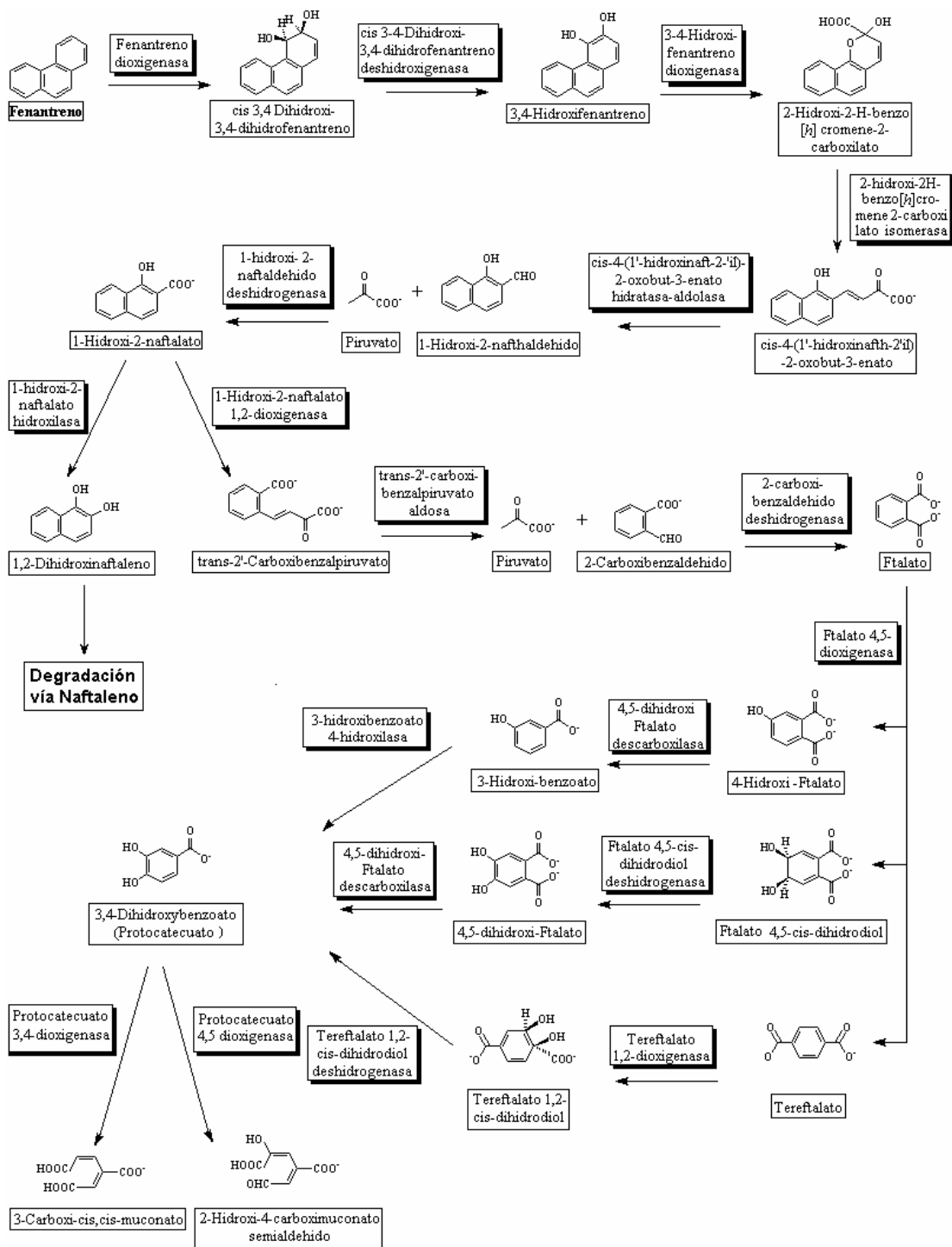
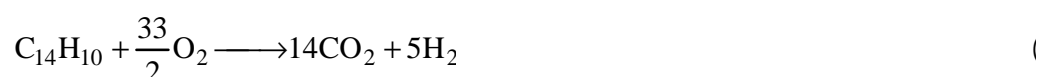


Figura 1.4. Ruta metabólica de degradación del fenantreno, vía ftalato. Tomado de la base de datos de biocatálisis/biodegradación de la Universidad de Minnesota. http://umbbd.ahc.umn.edu/pha/pha_map.html.

1.3.2.5. Mineralización y acumulación de metabolitos

La sorción de fenantreno en materia orgánica comúnmente limita su biodisponibilidad afectando también las tasas de biodegradación. Este proceso de sorción está caracterizado por una fase inicial rápida de interacción débil con la superficie de la partícula, seguida por una fase lenta controlada por la difusión intraparticular en la matriz del suelo (Grosser y col., 2000). La difusión intraparticular retardada de las moléculas adsorbidas resulta en un proceso de desorción con histéresis. La baja biodisponibilidad del fenantreno también ha sido atribuida a su localización en puntos inaccesibles para los microorganismos dentro de la matriz del suelo (White y col., 1997; Nam y Alexander, 1998). Otros estudios sugieren que la tasa de degradación puede estar limitada por la reacción biológica (Bramwell, 2000; Huesemann y col., 2002).

La biodegradación es definida como la reducción catalizada biológicamente en la complejidad de compuestos (Alexander, 1994). En el caso de compuestos orgánicos, la biodegradación frecuentemente, lleva a productos inorgánicos. Este proceso es conocido como mineralización, en el caso de los HAP los productos son H₂O, CO₂, agua y biomasa. La reacción de mineralización del fenantreno está dada por la siguiente relación estequiométrica:



La acumulación de productos intermediarios puede presentarse cuando la biodegradación no es completa. En algunas ocasiones, los productos intermediarios de la degradación biológica pueden llegar a ser más tóxicos que la molécula contaminante original. Las propiedades toxicológicas de los metabolitos son diferentes de las de los substratos. Un estudio de las propiedades de los intermediarios de la biodegradación de fenantreno, incluyendo anhídrido ftálico, ésteres del ácido 1,2-bencen-dicarboxil, ésteres del ácido ftálico mostró un aumento en la tasa de mortalidad de peces (*Lebistes reticulatus*) con los metabolitos comparado con la tasa encontrada con fenantreno (Traczewska, 2000). Ha sido sugerido que la

mineralización de compuestos con una baja solubilidad, tal es el caso del fenantreno, requiere algún tipo de adaptación fisiológica de los microorganismos (Stucki y Alexander, 1987). La lenta mineralización de fenantreno en concentraciones muy bajas también ha sido asociada a la presencia de fases líquidas no acuosas como el heptametilnonano y el di-2-etil-hexil ftalato, donde el contaminante es secuestrado (Efroymsen y Alexander, 1995). También la presencia de altas concentraciones de cobre han sido reportadas como inhibidoras de la mineralización de fenantreno y precursoras de la acumulación de metabolitos (Sokhn y col., 2001).

En la Tabla 1.8 se pueden ver algunas de las técnicas aplicadas en la biodegradación de fenantreno, se puede observar también que la degradación completa de fenantreno ha sido obtenida utilizando una gran variedad de microorganismos y tratamientos. Sin embargo, los porcentajes de mineralización obtenidos varían en el rango de 25% a 50% o incluso menores al 5%. Es importante notar que la acumulación de metabolitos solubles es comúnmente reportada en la degradación de fenantreno.

La solubilización de los HAP es atribuida a la incorporación de las moléculas hidrofóbicas en la pared celular de los microorganismos (que también son hidrofóbicas) y puede incrementarse por la adición de surfactantes (Bramwell, 2000). Sin embargo, una mayor solubilización no siempre se ve reflejada en un incremento de la biodegradación. Una posible explicación para la variabilidad y contradicción en los resultados de la adición de surfactantes es que los HAP solubilizados en la pared celular pueden no estar realmente disponibles para los microorganismos (Zhang y col., 1997; Bramwell, 2000). Algunos estudios encontraron mejoras en la biodegradación de fenantreno con la adición de surfactantes ya sea sintéticos o biosurfactantes (Guerin y Jones, 1988; Providenti y col., 1995; Grimberg y col., 1996; Cuny y col., 1999; Schippers y col., 2000). Sin embargo, también se ha reportado efectos nulos e inclusive inhibición sobre la degradación (Zhang y col., 1997; Bramwell, 2000; Chen y col., 2001; Dean y col., 2001) o problemas de toxicidad con la adición de surfactantes (Tiehm, 1994; Deschênes y col., 1996; Guha y Jaffé, 1996; Bramwell, 2000).

La bioaumentación ha sido exitosa en algunos casos en el tratamiento de suelos contaminados con fenantreno (Brodkorb y Legge, 1992; Birman y Alexander, 1996; Schwartz y Scow, 1999; Gray y col., 2000). Incluso se han planteado tratamientos de inoculaciones sucesivas que resultó en un incremento en la mineralización de altas concentraciones de fenantreno (Schwartz y Scow, 2001). Por otro lado, la limitación por nutrientes, la depredación por parásitos y el uso de otras fuentes de carbono han limitado su utilización *in situ* (Smith y col., 1999).

La mayoría de los estudios que se han realizado sobre el efecto de una segunda fuente de carbono en la degradación de fenantreno se enfocan a la degradación cometabólica en presencia de otros HAP (Guerin y Jones, 1988; Heitkamp y Cerniglia, 1988; Bouchez y col., 1996; Guha y col., 1999; Samanta y col., 1999; Smith y col., 1999; Gray y col., 2000). Sin embargo, la adición de otros compuestos ha sido poco explorada. Guerin y Jones, 1988, estudiaron en cultivos líquidos, el efecto de la adición de algunos intermediarios de la degradación de fenantreno, tales como el piruvato y succinato, encontrando que en relaciones de carbono 1:1 la presencia de piruvato favoreció la degradación del fenantreno, mientras que la presencia del succinato inhibió completamente su degradación. Por otro lado, la adición de glucosa después de 30 días de incubación mejoró la mineralización de fenantreno de 7.7% a 12.5%, en cultivos con limitación de nitrógeno con *Phanerochaete chrysosporium* (Bumpus, 1989).

Tabla 1.8. Biodegradación y mineralización de fenantreno

Referencia	Microorganismo	Fenantreno (mg/L)	% Mineralización	Condiciones/ Aportación
(Stucki y Alexander, 1988)	<i>Flavobacterium sp.</i> <i>Beijerinckia sp.</i>	1,500 2,350	40, 30 40, 33	Cultivos líquidos. 7 días. Estudio del efecto de la tasa de disolución del fenantreno en su mineralización.
(Guerin y Jones, 1988)	<i>Mycobacterium</i> (cepa BG1)	100-200	50	Cultivos líquidos. 17 días. 100-50% degradación. Bajos niveles de producción de metabolitos. Mineralización más rápida con un surfactante con un balance hidrofílico-lipofílico medio; y con la adición de piruvato (producto de la ruptura <i>meta</i>). Completa represión de la degradación con succinato (un producto de la ruptura <i>orto</i>).
(Heitkamp y Cerniglia, 1988)	<i>Bacterium</i>	0.5	50	Cultivos líquidos de mezclas de HAP. 14 días. 100% degradación. Niveles significantes de producción de metabolitos. Solo degradado por cometabolismo con otros HAP
(Keuth y Han Jürgen, 1991)	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	150	47.8	Cultivos líquidos. 26h. 100% degradación. Acumulación de metabolitos (24% del carbono) A bajas concentraciones la adición de glucosa estimuló la degradación. No observaron efecto de la temperatura sobre la degradación. A mayor concentración de fenantreno las tasas de degradación y de crecimiento fueron mayores.
(Brodkorb y Legge, 1992)	Flora nativa <i>Phanerochaete</i> <i>Chrysosporium</i>	34	20 38	Lodos. 21 días. 36-55% degradación. 21 y 24% producción de metabolitos con las 2 poblaciones. La bioaugmentación incrementó la degradación y su extensión hasta CO ₂ .
(Efroymsen y Alexander, 1990)	Cultivo enriquecido <i>Pseudomonas sp.</i>	6-1,000	3-45 3-50	Cultivos en fase líquida no acuosa (di-2 etilhexil ftalato (DEHP)). 16 días. No hubo mineralización a concentraciones bajas en DEHP. A altas concentraciones en DEHP, las tasas de mineralización fueron más altas que el caso de agua como solvente, pero la mineralización fue más lenta que en el caso de bajas concentraciones en DEHP, debido al secuestro del fenantreno en DEHP.
(Barclay y cols, 1995)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	0.6	3	Cultivo líquido. 16 días. 100% degradación. Una significativa cantidad de carbono (40%) fue cuantificado como absorbido en biomasa.
(Birman y Alexander, 1990)	Cultivo enriquecido Flora nativa <i>Bacterium</i> (cepa P3) <i>Bacterium</i> (cepa P5-2)	50	42-38 44-31 40-41 42-20	Cultivos en fase líquida no acuosa (dibutil ftalato (DP)). 110h. Los valores de mineralización para cada uno de las poblaciones en DP y en agua, respectivamente. La agitación de los cultivos incremento la degradación y la mineralización. Mejores degradaciones a 22 °C que a 28 °C. No hubo efecto con los surfactantes probados.

Referencia	Microorganismo	Fenantren (mg/L)	% Mineralización	Condiciones/ Aportación
(Deschênes y 1996)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Cepa UG2)	700 mg/kg _s	45, 45 35, 25	Microcosmos de suelo contaminado con creosota. 10 días. 100% degradación. Mineralización para las diferentes concentraciones de surfactante dodecil sulfato de sodio (SDS), 0, 10, 100, 500 µg/ml, adicionadas. Se observó un efecto inhibitorio.
(Bezalel y col. 1996)	<i>Pleurotus ostreatus</i>	20	3	Cultivo líquido. 11 días. 94% degradación. 60% se recuperó como metabolitos solubles y fenantreno restante. El 87% de los metabolitos solubles fue identificado como 2-2'-ácido difénico.
(White y col., 1997)	<i>Pseudomonas</i> (cepa R)	1.1 mg/kg _{su}	27- 0	Suelo con diferentes tamaños de agregados. 14 días. 96% degradación. Estudio de los efectos de tamaño de agregado, intemperización, contenido de materia orgánica y de regado y secado. La mineralización fue más rápida y mayor en el caso de agregados con tamaño de partícula más grande, tanto en suelos intemperizados como no intemperizados.
(May y col., 1997)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	1,150 mg/kg	38.8	Reactores por lote. 21 días. 40% degradación. Tratamiento <i>ex situ</i> para suelo contaminado con 16 HAP. 2.5% de mineralización de la mezcla.
(Smith y col., 1999)	<i>Pseudomonas</i> (cepa PD2) Consortio (4 especies gram-negativas)	2.76 µg/kg _s	12-17	Microcosmos. 250 días. 30% degradación. 2 tipos de suelo contaminado con: a. fenantreno, pireno y benzopireno, b. fenantreno, pireno, benzopireno y petróleo crudo. 25% de mineralización de la mezcla. La inoculación con las dos poblaciones a 244 días no incrementó la mineralización en ambos suelos.
(Johnson y Scott 1999)	<i>Flora nativa</i>	0.05 mg/kg _s	2-35	Microcosmos. 600h. Adición de nutrientes a 4 tipos de suelos. No observaron ningún efecto.
(Samanta y col. 1999)	<i>Artherobacter sulphureus</i> <i>Acidovorax delafieldii</i> <i>Brevibacterium sp.</i> <i>Pseudomonas sp.</i>	100	30 35 25 2	Cultivo líquidos. Mezcla con HAP. 18h. 100% degradación. Con la mezcla de las 4 poblaciones la mineralización del fenantreno fue de 25% y de la mezcla de HAP del 68%. Con <i>Artherobacter sulphureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> los niveles de producción de metabolitos fue importante hasta 90%. EL ácido ftálico fue identificado entre los intermediarios.
(Schwartz y Scott 1999)	<i>Arthrobacter</i> (cepa RP 17)	0.067 µg/kg _s	27-45	Microcosmos de suelo. 650h. Diferentes tiempos de intemperización del suelo, 6-247h. En ambos casos la tasa de mineralización se incrementó con la bioaumentación.
(Bramwell, 2000)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	50 70	Cultivos líquidos y lodos. 7-15 semanas. No se observaron efectos por la adición de surfactantes. Las tasas de mineralización obtenidas fueron de 0.04 mg/d para 7 y 15 semanas respectivamente.

Tabla 1.8. Continuación

1.3.3. Modelos matemáticos de biodegradación en suelos

Para diseñar y optimizar las técnicas de biorremediación son necesarios modelos matemáticos para describir los procesos físicos y químicos que controlan la disponibilidad, así como la biodegradación de los contaminantes.

Los modelos matemáticos utilizados para representar la biorremediación de suelos, toman en cuenta las ecuaciones generales de transporte macroscópico para los componentes en un medio poroso, es decir, balances de masa. Dichas ecuaciones representan el equilibrio y la transferencia entre las fases, mediante los mecanismos de convección, dispersión, biodegradación y producción de biomasa.

En general, se han propuesto tres tipos de modelos, de crecimiento suspendido, de biopelículas y de microagregados.

El modelo de crecimiento suspendido, considera la degradación como una función de los donadores/aceptores de electrones, es decir función del sustrato/oxígeno. En general, se supone una cinética de doble limitación por nutrientes.

En los modelos de biopelícula se asume que todos los microorganismos se encuentran formando una capa en donde ocurre la biodegradación, el contaminante que se encuentra adsorbido en la fase sólida se difunde por gradientes de concentración hacia la superficie de la biopelícula y se disuelve en ésta para ser degradado.

Los modelos de microagregados consideran que los contaminantes están uniformemente depositados en agregados del suelo y que los microorganismos están presentes en formas suspendidas y adheridos como microcolonias a las superficies sólidas. El análisis es desarrollado en coordenadas esféricas para los agregados en donde se considera equilibrio local de adsorción/desorción. En general se consideran cinéticas de Monod para la reacción biológica.

Un modelo matemático propuesto por (Chung y col., 1993) describe:

- El equilibrio de sorción-desorción local y la difusión del contaminante en los agregados porosos,

- La transferencia de masa del contaminante desde la superficie externa de los agregados esféricos al medio de reacción y
- La degradación del contaminante en el medio externo.

En dicho trabajo también se propone un criterio para determinar cuando la difusión y adsorción intrapartícula son importantes, mediante un grupo adimensional similar al módulo de Thiele. La generalización de las condiciones iniciales y del coeficiente de transferencia de masa externa son también incluidos.

Otro modelo matemático para la predicción de biodegradación y biotransformación de hidrocarburos en suelos y agua subterránea considera la degradación aerobia y anaerobia. En ese estudio, para el caso aerobio, el crecimiento microbiano y el consumo de oxígeno están acoplados en un término de biodegradación (Corapcioglu y Hossain, 1990). Otro desarrollo matemático para reactores de lodos, determina la cinética de degradación de varios HAP tomando en cuenta el consumo de oxígeno y la producción de dióxido de carbono (Tabak y col., 1994).

Por otro lado, un modelo predictivo del consumo de hidrocarburos en sistemas de lodos y de suelos propone un análisis estadístico para los hidrocarburos de petróleo, agrupados en diferentes clases basados en sus pesos moleculares. Dicho estudio reporta que la biodegradación de los hidrocarburos de petróleo depende fuertemente del tipo de hidrocarburo y de manera significativa de las otras variables estudiadas como el tipo de suelo, las concentraciones del fertilizante, la concentración de la población microbiana y el tipo de tratamiento en lodo o suelo (Huesemann, 1995).

Relativamente pocos modelos matemáticos se han realizado y los que se han desarrollado en general son inadecuados para propósitos prácticos (Blackburn, 1998). En general, se modela la desaparición del contaminante sin tomar en cuenta la producción y acumulación de metabolitos.

1.3.3.1 Análisis de las tasas máximas de consumo de contaminante y de producción de CO₂ mediante el modelo Gompertz

El modelo sigmoideal Gompertz es utilizado en biología, botánica, zoología y ecología para describir el crecimiento de plantas, árboles, microorganismos, animales

y seres humanos cuyo comportamiento se caracteriza por curvas en forma en "S", es decir, que incrementan su tasa de cambio monótonamente a partir de un punto fijo hasta alcanzar un punto de inflexión después del cual la tasa de cambio decrece hasta aproximarse asintóticamente a un valor final. Otra característica es que no son simétricas con respecto a su punto de inflexión. (Ratkowsky, 1983). Una representación gráfica del modelo Gompertz se muestra en la Figura B.7 del Anexo B.8.

El modelo Gompertz está dado por la siguiente ecuación:

$$S_c = A \cdot e^{(-B \cdot e^{-Kt})} \quad (1.2)$$

Donde, S_c y t son las variables y A , B y K son los parámetros del modelo. Derivando la Ecuación 1.2 se obtiene la tasa de cambio de la variable S_c .

$$\frac{dS_c}{dt} = K \cdot S_c \cdot B \cdot e^{-Kt} \quad (1.3)$$

El término $B \cdot e^{-Kt}$ puede escribirse en términos de S_c mediante la siguiente igualdad:

$$B \cdot e^{-Kt} = \log_e \left(\frac{A}{S_c} \right) \quad (1.4)$$

Por lo tanto la Ecuación 1.3 puede escribirse de la siguiente manera:

$$\frac{dS_c}{dt} = K \cdot S_c \cdot \log_e \left(\frac{A}{S_c} \right) \quad (1.5)$$

La segunda derivada de la Ecuación 1.2 permite identificar la velocidad de cambio de la tasa de cambio de S_c :

$$\frac{d^2S_c}{dt^2} = K \cdot A \cdot e^{(-B \cdot e^{-Kt})} \cdot (B \cdot e^{-Kt})^2 - K \cdot A \cdot e^{(-B \cdot e^{-Kt})} \cdot B \cdot e^{-Kt} \quad (1.6)$$

La Ecuación 1.6 se puede escribir en términos de la siguiente manera:

$$\frac{d^2S_c}{dt^2} = K \left(\log_e \frac{A}{S_c} - 1 \right) \frac{dS_c}{dt} \quad (1.7)$$

En el punto de inflexión de la curva dS_c/dt es máxima y la Ecuación 1.7 es cero, por tanto:

$$\log_e \frac{A}{S_c} = 1 \quad \Rightarrow S_c = A/e \quad (1.8)$$

La tasa máxima se obtiene evaluando la Ecuación 1.5 para $S_c = A/e$.

$$V_{\max} = \left. \frac{dS_c}{dt} \right|_{S_c=A/e} = K \left(\frac{A}{e} \right) \log_e \left(\frac{A}{A/e} \right) = K \frac{A}{e} = 0.368A \cdot K \quad (1.9)$$

Si t_c es el tiempo al que se alcanza el punto de inflexión y la tasa máxima de consumo (producción) entonces, el punto de inflexión tiene las coordenadas $(t_c, A/e)$. La siguiente relación de los parámetros B y K permite calcular t_c

$$t_c = \frac{(\ln B)}{K} \quad (1.10)$$

Al ser un modelo empírico, el modelo no considera la reducción en la tasa por la reducción de la concentración de sustrato. En este sentido es considerado como una relación de orden cero. Además, el valor de K (h^{-1}) es independiente de la cantidad de muestra utilizada. El ajuste de datos experimentales de consumo de sustratos con éste modelo reduce el error al tratar de ajustar con una línea. A pesar de que el modelo Gompertz no tiene un enfoque fenomenológico, es posible asociar los valores de las constantes a tasas de consumo observadas experimentalmente.

En este trabajo, el modelo Gompertz es utilizado como una herramienta matemática para ajustar los datos experimentales de la producción de CO_2 y el consumo de hidrocarburos a fin de obtener los parámetros A y K que permitan predecir un valor de tasas de producción o consumo máximas.

Así, para la ecuación 1.2, t: es el tiempo. S_c : es la concentración de hidrocarburo (mg/kg_{ss}) y está dada por la diferencia de concentraciones entre el $t=0$ y la del tiempo t. Cuando se utilizó para el ajuste de producción de CO_2 , S_c es la concentración de CO_2 (g/m^3). El parámetro A es la máxima concentración consumida o producida, cuando $t \rightarrow \infty$ el valor de A es igual a la concentración inicial de hidrocarburo (mg/kg_{ss}) o la concentración final de CO_2 . B: es un parámetro asociado a las condiciones iniciales (adimensional). El parámetro K (h^{-1}) es la tasa de consumo

de hidrocarburo o la tasa de producción de CO₂. V_{\max} es la tasa máxima de consumo de sustrato o de producción de CO₂.

Los parámetros cinéticos obtenidos del modelo Gompertz han utilizados en diversos campos. En estudios de demografía para describir la tasa de envejecimiento, la tasa mortalidad independiente de la edad, para predecir la longevidad media y el tiempo estimado para alcanzar un determinado porcentaje de mortalidad (Mueller y col., 1995; Ricklefs y Scheuerlein, 2002). En biología se utiliza para la estimación del máximo tiempo de vida de una célula (Piantanelli, 1986). El modelo Gompertz también ha sido usado para describir el crecimiento microbiano en procesos de fermentación asociando a los tres parámetros del modelo a las tres fases del crecimiento microbiano: la de aclimatación, la logarítmica y la estacionaria (Simon y Karim, 2001). Algunas aplicaciones puntuales de los parámetros del modelo Gompertz en la industria alimentaria son la determinación y monitoreo de la tasa máxima de crecimiento de *Salmonella enteritidis* (Koutsoumanis y col., 1998) y el establecimiento de ecuaciones que relacionen el crecimiento de *Aeromonas hydrophila* con variables ambientales para evitar su proliferación en ensaladas de vegetales listas para consumirse (Vescovo y col., 1997). También se utilizó exitosamente en el modelamiento del crecimiento de lactobacilos probióticos, en donde se exploró el uso de los parámetros para predecir las tasas máximas de producción y la menor fase de aclimatación con vistas a aplicaciones industriales del proceso (Juárez Tomás y col., 2002). Un estudio comparativo de modelos de crecimiento del pez *Tribolodon nakamura* concluyó que el modelo Gompertz fue el más adecuado para representar la edad de los peces en función de su longitud (Imai y col., 2002).

En biotecnología ambiental, el modelo Gompertz ha sido utilizado para describir el establecimiento de bacterias inoculadas en suelos en procesos de bioaumentación (Vandepitte y col., 1995); para describir el consumo de contaminantes y para predecir la tasa máxima de consumo en un biofiltro a partir de parámetros obtenidos en cinéticas líquidas en microcosmos (Acuña y col., 1999); y para modelar la producción de metano en un bio-reactor donde se tratan los desechos municipales sólidos (Lay y col., 1998).

1.4. Antecedentes directos

En la siguiente sección se discutirá en detalle la bioestimulación por adición de cosubstratos y se presentan algunos resultados preliminares de este trabajo.

La adición de cosubstratos gaseosos en la biorremediación de suelos, está poco documentada, generalmente las sustancias que se utilizan como bioestimulantes son sustancias fácilmente asimilables adicionadas en solución. La adición de un sustrato en forma gaseosa mediante un sistema de venteo tiene la ventaja de poder alimentar muy bajas concentraciones del sustrato de manera más homogénea en la matriz del suelo. Este tipo de sistemas trifásicos son similares a los biofiltros, en donde los microorganismos crecen sobre un soporte y desarrollan una biopelícula con el agua contenida en el sistema, los contaminantes se transportan desde la fase gas a la fase líquida donde se llevan a cabo las reacciones. El tipo de soporte es crítico para proporcionar y mantener las condiciones adecuadas para el desarrollo de las poblaciones microbianas y la eliminación de las sustancias contaminantes (Ortiz y col., 2003b). Basados en experiencias previas de biofiltración como medio de control de la contaminación de aire contaminado con compuestos orgánicos volátiles, entre otros, tolueno, xilenos, e incluso benceno utilizando diversos materiales de soporte incluyendo turba, se pensó en estudiar un sistema similar a un biofiltro en donde el soporte fuera suelo contaminado y se estimulara la población microbiana con la presencia de un sustrato gaseoso adicional.

Las primeras pruebas que se realizaron para evaluar la viabilidad del tratamiento consistieron en pruebas de biodegradación de hidrocarburos en suelos, a escala de microcosmos, adicionando diferentes fuentes de carbono como cosubstratos (Ortiz y col., 2003a). Los experimentos se realizaron en frascos de 125 ml sellados con válvulas de teflón (Mininert, VICI Precision Sampling, Inc., EU) donde se colocaron 10 g de suelo seco (ss), 10 ml de medio mineral y el cosubstrato. El suelo utilizado provenía de una zona petrolera en Minatitlán, Ver., y contenía 180 g de HTP por kg_{ss}. Se evaluó el efecto de la adición de glucosa, hexadecano, etanol, pentano y tolueno. Dichos cosubstratos fueron adicionados en una concentración de 1.5 g C/kg_{ss}. En el caso de etanol y tolueno se realizaron adiciones sucesivas cuando se medía en fase gas la desaparición completa del compuesto. La glucosa y el hexadecano solo fueron

agregados al inicio del experimento, por tanto la cantidad total adicionada fue menor comparada con los sustratos volátiles. Un resumen de los resultados obtenidos se presenta en la Tabla 1.9. La adición de glucosa, hexadecano y etanol no tuvieron efecto sobre la remoción total de los HTP. Por otra parte, la adición de tolueno y pentano incrementaron la eliminación de hidrocarburos de 20.6% a 30.9% y a 26.1% respectivamente.

Más del 90% del tolueno y etanol fueron consumidos en las primeras horas después de cada adición. El etanol es una molécula altamente soluble y biodegradable. Sin embargo, su consumo no incrementó la degradación de los HTP, debido probablemente a que siendo una molécula más oxidada, no favoreció el crecimiento de la población microbiana capaz de degradar hidrocarburos o bien se manifestó represión catabólica.

Tabla 1.9. Efecto de la adición de diferentes cosubstratos ^a

	g/kg _{ss} adicionado	HTP eliminados (%)
Controles (sin cosubstrato)		
Agua destilada		18.1
Medio mineral		20.6
Cosubstratos		
Glucosa	3.538	21.3
Hexadecano	1.648	21.9
Etanol	39.506	18.6
Pentano	10.179	26.1
Tolueno	18.896	30.9

^a (Ortiz y col., 2003a). Pruebas realizadas en microcosmos (125 ml) durante 286 días. Concentración inicial HTP 180 g_{HTP}/kg_{ss}.

Aunque estos estudios preliminares fueron realizados con mezclas de hidrocarburos, el tolueno fue seleccionado también como cosubstrato modelo para la degradación de fenantreno debido a su estructura aromática. Se ha reportado que una comunidad microbiana aclimatada al consumo de un sustrato frecuentemente resulta en la aclimatación simultánea a compuestos con una estructura similar (Alexander, 1994).

Algunas de las principales características del tolueno se encuentran en la Tabla 1.10. El tolueno es utilizado en la fabricación de explosivos y colorantes, también es utilizado como solvente para pinturas, en la industria farmacéutica, en la extracción de principios activos de plantas, en la industria de limpieza, en la composición de las gasolinas etc.

La biodegradación del tolueno, ha sido ampliamente estudiada, y por tanto, sirve como modelo para la comprensión de los mecanismos de biodegradación de los compuestos aromáticos. El tolueno es degradado tanto por bacterias como por hongos mediante procesos aerobios y anaeróbicos. (Devinny y col., 1999). La base de datos de biocatálisis/biodegradación de la Universidad de Minnesota reporta para *P. mendocina*, *P. alcaligenes* y *P. putida* las rutas metabólicas mostradas en el Anexo A.

La reacción de mineralización del tolueno es la siguiente:



Tabla 1.10. Características fisicoquímicas del tolueno ^a

Formula molecular	C ₇ H ₈
Peso Molecular (g/gmol)	92.1
Estructura	
Solubilidad (mg/L _{H2O})	515
Densidad (g/ml)	0.866
Log K _{ow}	2.69
Punto de ebullición:	110.6 °C, a 760 mmHg
Volatilidad:	Presión de vapor: 10 mmHg, a 6.4 °C 20 mmHg, a 18.4 °C 40 mmHg, a 31.8 °C Densidad del vapor: 3.14 (Aire=1)

^a(Connell, 1997).

II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

Objetivo general

Determinar el efecto de la adición de un cosustrato en fase gaseosa sobre la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando un sistema modelo de columnas empacadas.

Objetivos particulares

- Evaluar el efecto de la adición de tolueno en fase gas como cosustrato en la biodegradación y mineralización de fenantreno.
- Evaluar el efecto de la adición de tolueno gaseoso como cosustrato en la biodegradación y mineralización de hidrocarburos de petróleo.
- Desarrollar un modelo matemático que permita describir los fenómenos que se llevan a cabo durante la biodegradación.

Para alcanzar los objetivos planteados se desarrollaron actividades en 3 grandes rubros:

1. Sistemas experimentales y metodologías:
 - a) Definir el sistema de estudio modelo: suelo, agente abultante, contaminante, sistema experimental y condiciones de operación óptimas.
 - b) Caracterización del suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo.
 - c) Aclimatación de los microorganismos para degradar los contaminantes seleccionados.
 - d) Implementar y validar las metodologías de impregnación del suelo, de extracción y cuantificación de hidrocarburos, identificación y cuantificación de metabolitos.
2. Estudios de degradación:
 - a) Estudiar la biodegradación de los compuestos a nivel de microcosmos en cultivos líquidos y sistemas trifásicos (suelo, líquido y aire).

b) Estudiar dos poblaciones microbianas. Un consorcio bacteriano aclimatado previamente al consumo de fenantreno y tolueno. Una cepa del hongo *Trametes versicolor* aclimatada al consumo de fenantreno.

b) Estudiar el efecto de la adición de otro sustrato en la fase gaseosa sobre la degradación, la mineralización y la población microbiana.

3. Modelado matemático

Desarrollo de un modelo matemático para describir la biodegradación de fenantreno y el efecto de la adición de tolueno en el sistema de columnas empacadas.

Hipótesis

Las hipótesis de este trabajo sobre el efecto de la adición de bajas concentraciones de tolueno en fase gaseosa sobre la biodegradación y la mineralización de hidrocarburos son las siguientes:

a) El consumo simultáneo de mezclas de sustratos aún cuando se encuentren a bajas concentraciones.

b) El mayor crecimiento microbiano debido a la utilización del tolueno.

c) La activación de enzimas que intervienen en la degradación de los hidrocarburos o intermediarios con una estructura similar a la del cosustrato.

d) Una combinación de las anteriores.

Las poblaciones microbianas requieren de una concentración mínima de contaminante en la fase líquida que proporcione la energía para el crecimiento y las actividades de mantenimiento. Una de las limitantes de la degradación se ocasiona cuando el flux difusivo del contaminante no cubre esos requerimientos mínimos (Efroymsen y Alexander, 1995). Sin embargo, está documentado la asimilación de mezclas de fuentes de carbono, tanto naturales como xenobióticas, que son utilizadas y asimiladas por microorganismos aún cuando los compuestos se encuentren debajo de la concentración mínima (Egli, 1995). Se sugiere que esta habilidad de los microorganismos resulta de la utilización simultánea de otras fuentes de carbono que pueden soportar el crecimiento y proveer la energía necesaria para el mantenimiento.

También está reportado que los microorganismos una vez que se han aclimatado al consumo de un sustrato, rápidamente son capaces de actuar sobre moléculas análogas. (Alexander, 1994).

Por otro lado, el sistema de alimentación del cosustrato mediante un sistema de venteo permite la distribución homogénea de concentraciones muy bajas en la matriz del suelo garantizando su completa eliminación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos químicos

Se utilizaron los siguientes reactivos (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EU): cristales de fenantreno (pureza >98%), tolueno, acetato de etilo, metanol y glicerol (grado reactivo). Acetonitrilo grado HPLC. Ácido ftálico sal de monopotasio (pureza >99%). Fenantreno [$9\text{-}^{14}\text{C}_{14}\text{H}_{10}$] con una actividad específica de 10.6 mCi/mmol y una concentración de 0.95 mCi/ml_{metanol}.

3.2. Suelos

3.2.1. Suelo UAM-I

El suelo UAM-I fue colectado de un jardín de la universidad. Se tamizó el suelo hasta tener un tamaño de partícula (T_p) $0.177\text{mm} < T_p < 1\text{mm}$ y se secó a 100 °C durante 48 h. La máxima capacidad de retención de agua del suelo fue 20% en peso.

La caracterización del suelo se realizó en el Laboratorio central de análisis de suelos de la Universidad Autónoma de Chapingo (Tabla 3.1).

3.2.1.1. Contaminación del suelo

El suelo seco se puso en capas de aproximadamente 0.5 cm de altura y se contaminó agregando por gotas una solución de fenantreno en acetona, mezclando manualmente el suelo. Se dejó 24 horas en la campana de extracción a temperatura ambiente para evaporar completamente el solvente. Una vez seco el suelo, la concentración de fenantreno fue de 1000 mg/kg de suelo seco (ss).

El suelo seco impregnado de fenantreno se colocó en frascos ámbar sellados y se dejó estabilizar por 12 meses a temperatura ambiente. Extracciones del suelo después de este período, permitieron recuperar 98% del fenantreno adicionado (ver sección 3.5.1).

Este suelo fue utilizado para los estudios de degradación de fenantreno en columnas empacadas.

Tabla 3.1. Caracterización del suelo UAM-I ^a

Parámetros	Valores	Metodología
pH		Potenciométrico relación agua suelo 1:2
Materia Orgánica (%)		Walkley y Black
Níquel (mg/kg)		Extraído con cloruro de potasio 2N y determinado por arrastre de vapor.
Fósforo (mg/kg)		Olsen
Potasio (mg/kg)		Extraído con acetato de amonio 1.0N pH 7.0 relación 1:20 y determinado por espectrofotometría de emisión de flama
Calcio (mg/kg)		Extraído en acetato de amonio 1.0N pH 7.0 relación 1:20 y determinado por espectrofotometría de absorción atómica
Mg (mg/kg)		
Hierro (mg/kg)	2	Extraído con DPTA relación 1:4 y determinado por espectrofotometría de absorción atómica
Cobre (mg/kg)		
Zinc (mg/kg)		
Manganeso (mg/kg)		
ARENA (%)	52.1	Dap. Método de la parafina.
LIMO (%)	7.4	
ARCILLA (%)	32.4	
CLASIFICACIÓN-TEXTURA	Arcilla-arena	Hidrómetro de Bouyoucos

^a Laboratorio central de análisis de suelos. Universidad Autónoma de Chapingo.

3.2.1.2. Esterilización del suelo

Los suelos, sin contaminar y contaminado, fueron esterilizados mediante irradiación gamma (γ) 2.5 mrad en el departamento del irradiador Gamma del Instituto Nacional de Investigación Nuclear (ININ). Debido a que se utilizaron inhibidores microbianos en la experimentación y en base a resultados previos y no se realizó ningún tipo de verificación de la esterilización (Acuña y col., 1999).

3.2.2. Suelo INRA

Este suelo fue donado por el Instituto Francés de Investigación Agrícola (INRA, por sus siglas en francés). Este tipo de suelo, es una arena gruesa no porosa, con un tamaño de partícula entre 3 y 5 mm. El suelo fue lavado con agua destilada, secado en estufa a 150 °C y posteriormente esterilizado por 15 min a 2 atm. La impregnación de este suelo fue realizada de manera similar a la descrita para el suelo UAM-I utilizando un isótopo de fenantreno 9-¹⁴C. El fenantreno marcado, disuelto en metanol, fue diluido con fenantreno grado reactivo para tener una concentración de 50 mg/kg_{ss} y una actividad total de 28 μCi. Los cálculos detallados de la dilución de fenantreno radioactivo con fenantreno en cristales (no radioactivo) para obtener dichas condiciones se muestran en el Anexo. B.5.

Este suelo se utilizó como un suelo modelo, dada su estructura no porosa, se asume que la distribución del contaminante es superficial. Ésto permite despreciar los problemas de transferencia de masa que se presentan en suelos porosos debido a la difusión intraparticular de los contaminantes y en aquellos con altos contenidos de materia orgánica donde la adsorción de los contaminantes es irreversible. Se utilizó en los experimentos de solubilidad de fenantreno y en las cinéticas de consumo en microcosmos.

3.2.3. Suelo Tamaulipas

Este suelo fue colectado en los alrededores de la refinería "Francisco I. Madero" en Cd. Madero, Tamaulipas y fue proporcionado para este estudio por el Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (CENICA). Después del secado a temperatura ambiente, el suelo fue tamizado para utilizar la fracción de tamaño de partícula menor a 2 mm. La composición del suelo fue 87.1% arena, 1.8% limo, 4.0% arcilla y 6.9% materia orgánica con un pH de 7.62 (Laboratorio central de la Universidad Autónoma de Chapingo). Las muestras iniciales del suelo contenían 40 g de HTP por kg de suelo seco determinados según la metodología descrita en la sección 3.5.7. La máxima capacidad de retención del agua fue de 25% en peso.

3.2.4. Agente abultante

Las características de los materiales en los que se desarrollan los microorganismos han sido reportadas como uno de los aspectos fundamentales para la efectividad de los sistemas de biorremediación (Alexander, 1994; Ortiz y col., 2003b). Entre otras características, deben proporcionar un área grande para la formación de la biopelícula y deben permitir una correcta aireación. Dadas las características del suelo la adición de un agente abultante era necesaria para garantizar una aeración eficiente para el crecimiento microbiano.

Vermiculita seca, de tamaño de partícula entre 1.9 y 3.36 mm se utilizó como agente abultante inerte. La vermiculita fue seleccionada por ser inerte, por sus características de composición y capacidad de retención de agua y de soportar el crecimiento microbiano (Ortiz y col., 2003b).

La vermiculita (AYASA, México) es de origen mineral. El análisis químico del proveedor es (%): SiO₂ 46.63; Al₂O₃ 10.70; Fe₂O₃ 5.73; FeO 0.12; MnO 0.03; TiO₂ 1.13; Cr₂O₃ 0.62; MgO 34.28; K₂O 0.06; F 0.70; H₂O huella. Las partículas de vermiculita presentan estructura con cierta regularidad geométrica y una composición homogénea, su área máxima de transferencia de es de 675 m²/m³, (Pineda y col., 2000). Su precio es de 0.08 pesos/L. La máxima capacidad de retención de agua sin presentar drenaje es de 65% de su peso húmedo (Ortiz y col., 2003b) lo que le permite actuar también como reservorio de agua en el lecho evitando la pérdida de humedad y favoreciendo la actividad microbiana. La densidad de empaque de la vermiculita húmeda (65%) es de 215 g_{vermiculita}/m³_{reactor}

3.3. Microorganismos

3.3.1. Consorcio bacteriano

Se preparó a partir de muestras de suelo de varios puntos alrededor de un sitio que ha recibido descargas de una refinería en el estado de Veracruz, México. Se hizo una mezcla de estas muestras de suelo y se suspendió en medio de cultivo mineral. La solución nutritiva se preparó con un fertilizante comercial (Triple 17, Nutrientes

Minerales de Hidalgo, México). Se utilizaron 3.74 g_{fertilizante}/L para tener una concentración de 0.63 g N/L y se ajustó el pH a 7 con una solución NaOH 1N.

3.3.1.1. Aclimatación del inóculo

Después de 30 días en agitación y a temperatura ambiente, el cultivo se decantó y filtró para eliminar la tierra y se transfirió el inóculo (10% v/v) en solución nutritiva fresca. Como fuente de carbono se añadieron 100 µl de una solución fenantreno disuelto en dimetilformamida y 100 µl tolueno líquido para tener una concentración en el cultivo de 1000 mg/L y 344 mg/L, respectivamente. Los microorganismos se cultivaron en frascos de 1L, a 150 rpm y 30 °C. Cada 20 días el inóculo fue transferido en medio nutritivo nuevo (10% v/v) y se agregaron las mismas concentraciones de fenantreno y tolueno como fuentes de carbono. Este proceso se llevó a cabo durante 7 meses.

3.3.1.2. Cinéticas de crecimiento microbiano

Para medir la tasa de crecimiento del cultivo se hicieron cinéticas de crecimiento utilizando un medio mineral 3X, pH 7, cuya composición se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Composición del medio mineral 3X^a

	g/L
KH ₂ PO ₄	0.60
K ₂ HPO ₄	2.40
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.50
CaSO ₄ ·2H ₂ O	0.15
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.03
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.00

^a (Acuña y col., 1999).

Se usaron matraces nefelométricos de cultivo de 500 ml, con 200 ml de medio mineral, 50 ml de inóculo, 1000 mg/L y 344 mg/L de fenantreno y tolueno, respectivamente. Las cinéticas se llevaron a cabo a 150 rpm y 30 °C. Se midió diariamente la absorbancia del medio en un espectrofotómetro a 450 nm (Spectronic 20D, Milton Roy Co., EU). Se sacrificaron matraces para filtrar 25 ml de medio de

cultivo usando un filtro de 0.2 μm , (Whatman, EU), lavando abundantemente para asegurar no retener cristales de fenantreno o sales minerales del medio. La muestra fue secada a 100 °C hasta peso constante. La cantidad de biomasa seca se relacionó con la absorbancia medida en la muestra. La curva de concentración de biomasa en función de la absorbancia se muestra en el Anexo B.1.

3.3.2. Cultivo de *Trametes versicolor*

La cepa del hongo *Trametes versicolor* ATCC 32745, fue donada por el Instituto Francés de Investigación Agrícola en Marsella, Francia. Esta cepa ha probado su capacidad de degradar fenantreno, y otros HAP (Rama-Mercier y col., 1998). La biomasa fue cultivada en matraces Roux, donde se colocaron 200 ml de medio de cultivo (Tabla 3.3) y 5 discos de 5mm de micelio precrecido en agar MYA2. La biomasa se desarrolló a 30 °C a la oscuridad durante 7 días. El micelio fue recolectado por filtración en gasa estéril y homogeneizado mediante ultraturrax (Janke & kunkel, IKA-WERK, EU) en 50 ml de agua destilada estéril.

Tabla 3.3. Composición del medios de cultivo para *Trametes versicolor* ^a

Composición	g/	Vitaminas	g/
Glucosa		Tiamina	
Bactopectona		Riboflavina	
Extracto de levadura		Piridoxina	
(NH ₄) ₂ SO ₄		Pantotenato de calcio	
C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂ ·2H ₂ O		Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	
Sales minerales:		Nicotinamida	
KH ₂ PO ₄		Colina	
CaCl ₂ ·2H ₂ O		Ácido fólico	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		Inositol	
Vitaminas:			

^a (Rama-Mercier y col., 1998).

3.4. Experimentos

Los experimentos realizados y el objetivo de cada uno de ellos se muestran en la Figura 3.1. En las siguientes secciones se detallan las metodologías utilizadas.

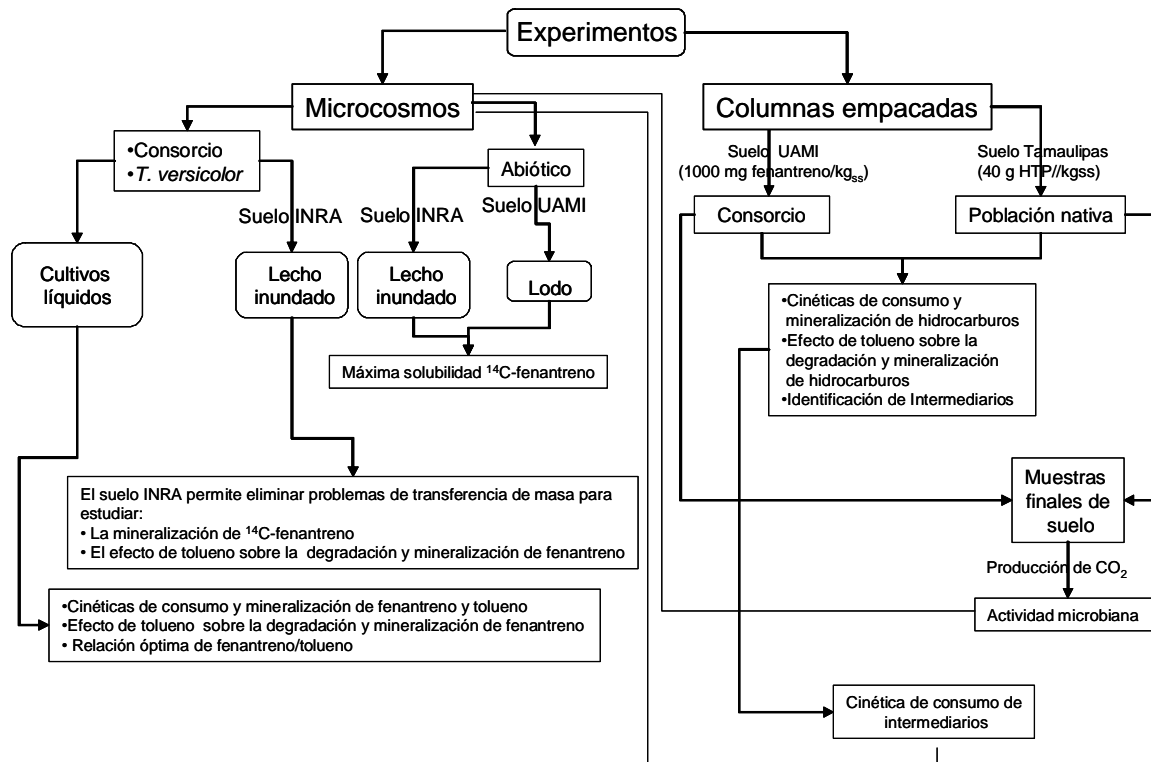


Figura 3.1. Diagrama de flujo de experimentos realizados

3.4.1 Microcosmos

3.4.1.1. Disolución de fenantreno

Un diagrama de la metodología utilizada en estos experimentos se muestra en la Figura C.1 del Anexo C. Estos experimentos se llevaron a cabo usando el isótopo irradiado de fenantreno ($9\text{-}^{14}\text{C}_{14}\text{H}_{10}$). Se utilizaron 15 g de suelo INRA a una concentración de 50 mg/kg_{SS} de fenantreno en frascos herméticos de 125 ml, impregnados con 24 horas de anticipación, y se adicionó cantidad de agua destilada necesaria para inundar el lecho de suelo (5 ml) y se colocó en agitación (150 rpm). Se tomaron muestras de 100 µl para realizar conteo de centelleo (sección 3.5.3.) cada 30 min durante las siguientes 3 horas y posteriormente mediciones diarias hasta 300 h.

Los experimentos se realizaron por triplicado. Siguiendo la misma metodología, se realizaron experimentos con el suelo UAM-I estéril y utilizando medio mineral 3X como disolvente. Además en estos experimentos se agregó tolueno líquido para obtener concentraciones en fase gas de 25 y 60 g/m³ correspondientes a concentraciones de 92.59 y 222.22 mg/L en el líquido. Considerando un coeficiente de partición adimensional de 0.27¹.

3.4.1.2. Cinéticas de consumo de fenantreno y tolueno en cultivos líquidos

Un diagrama de la metodología utilizada en estos experimentos se muestra en la Figura C.2 del Anexo C. Estos experimentos se llevaron a cabo en frascos de 125 ml sellados herméticamente con válvulas de Teflón (Mininert, VICI Precision Sampling, Inc., EU) en los que se pusieron 10 ml de medio mineral 3X y una concentración de biomasa de 0.12 mg/ml del consorcio y *T. versicolor*. Se realizaron cultivos por duplicado de 55 h de incubación y con concentraciones de fenantreno de 150 mg/L y 475 mg/L, adicionando diferentes cantidades de tolueno para tener concentraciones de 0, 15, 25, 30 y 40 g/m³ en la fase gas. En estos experimentos se evaluó la producción de CO₂ (sección 3.5.2) como medida indirecta del consumo de los contaminantes. La concentración de tolueno en fase gas fue medida de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.5.4. Se midió fenantreno residual al final de los experimentos de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.5.1. Se realizaron controles sin contaminantes para medir la respiración endógena de las poblaciones.

¹ Para tolueno, el coeficiente de partición gas-líquido, **m**, a condiciones estándar de presión y temperatura, se calcula mediante la siguiente relación:

$$m = \frac{C_{\text{gas}}}{C_{\text{líquido}}} = \frac{H}{RT} = \frac{6.7707821 \times 10^{-3} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}}{(8.21 \times 10^{-5} \text{ atm} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1})(298.3 \text{ K})} = 0.2765$$

Donde, **H** es la constante de Henry, **R** es la constante de los gases y **T** es la temperatura (Perry's chemical engineers' handbook).

3.4.1.3. Biodegradación de fenantreno ($9\text{-}^{14}\text{C}_{14}\text{H}_{10}$) y tolueno

Un diagrama de la metodología utilizada en estos experimentos se muestra en la Figura C.1 del Anexo C. En frascos de 60 ml cerrados con válvulas Mininert, se colocaron 30 g de suelo INRA impregnado previamente con 50 mg/kg de $9\text{-}^{14}\text{C}$ -fenantreno, con una actividad total de 28 μCi , se adicionaron 9 ml de medio mineral 3X y se incubaron a 150 rpm y 30 °C. Los experimentos se realizaron con los dos tipos de poblaciones microbianas, el consorcio microbiano y el cultivo de *Trametes versicolor*, se adicionaron 2.95 mg y 5 mg de biomasa, respectivamente. Se realizaron triplicados en donde se midió la producción de $^{14}\text{CO}_2$ atrapado en KOH 1N (ver 3.5.3.) así como la concentración de ^{14}C en la fase líquida (Sección 3.5.3). También se realizaron experimentos bajo las mismas condiciones y con la adición diaria de tolueno en una concentración de 32 g/m³ la concentración de tolueno fue medida de acuerdo a la sección 3.5.4.

Se realizaron controles abióticos bajo las mismas condiciones de incubación, utilizando concentraciones de fenantreno marcado ($9\text{-}^{14}\text{C}_{14}\text{H}_{10}$) de 50 mg/kg_{suelo} con una actividad total de 28 μCi en cada frasco. Se realizaron experimentos por triplicado, de donde se tomaron muestras líquidas de 15 μl periódicamente que se analizaron agregando 250 μl de líquido de centelleo (ver análisis 3.5.3).

3.4.1.4. Respiración de poblaciones microbianas

Estos experimentos (Figura C.3, Anexo C) consistieron en poner 13 g de muestras de suelo UAM-I tomadas al final de los experimentos en columnas empacadas (sección 3.4.2). Las poblaciones establecidas en el suelo después del tratamiento (con y sin la adición de tolueno) fueron adicionadas con 20 ml de agua destilada y se cultivaron a 30 °C y 150 rpm. Se utilizaron frascos de 125 ml sellados con válvulas Mininert, los experimentos se realizaron por triplicado. Como una medida indirecta de la actividad microbiana se cuantificó la producción de CO_2 de acuerdo a la metodología mostrada en la Sección (3.5.2).

3.4.1.5. Biodegradación de ácido ftálico

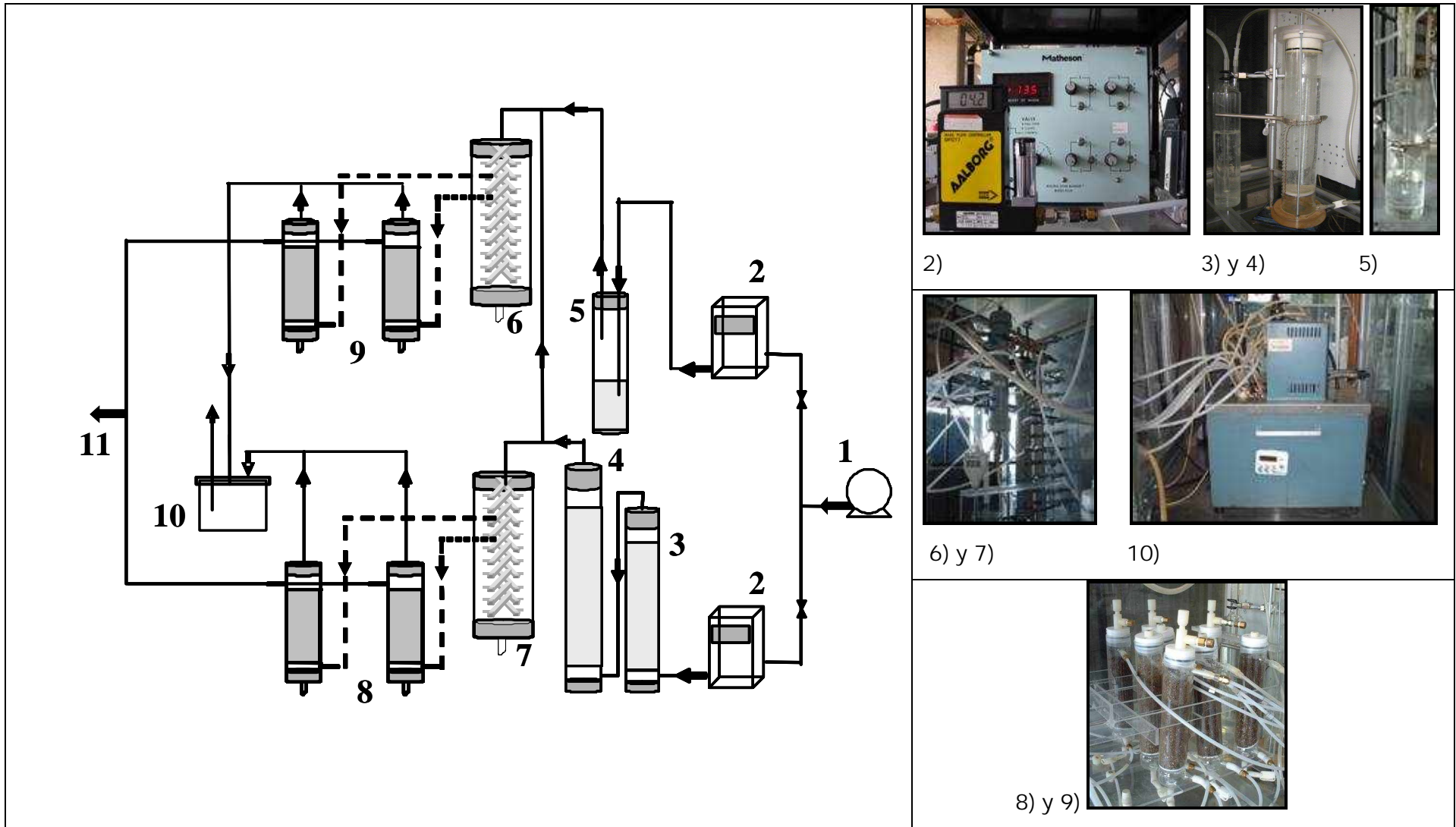
Se realizaron experimentos por triplicado en frascos herméticos de 125 ml, con 13 g de mezcla suelo y vermiculita en una proporción 80:20 en peso húmedo (Figura 3.1). La concentración de ácido ftálico fue de 1000 mg/kg_{ss}, adicionando 250 mg/kg_{ss} de tolueno. El ácido ftálico fue medido de acuerdo a la sección 3.5.6.

3.4.2. Columnas empacadas

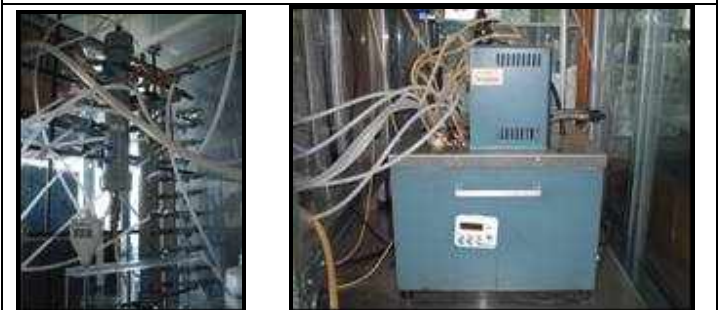
3.4.2.1. Sistema experimental

El sistema experimental se muestra en la Figura 3.2, dicho dispositivo se encuentra dentro de una cámara de acrílico de dimensiones 1.5x1.0x0.8 m, la temperatura dentro de la cámara fue controlada mediante un termostato y recirculación de aire. El aire es provisto por un compresor, y alimenta dos controladores de flujo másico (Matheson modelo 8141 rango 0-1000 SCCM, EU; Aalborg GFC17 rango 0-100 SCCM, EU). Las curvas de calibración de dichos controladores se muestran en el Anexo B.2. Los flujos de aire se fijaron dependiendo del número de columnas a tratar y de la concentración de tolueno requerida. Un flujo de aire (6 a 8 ml/min) burbujea en el evaporador de tolueno, mientras que el flujo principal de aire (150 a 200 ml/min) burbujea en un prehumidificador, que contiene una solución diluida de NaOH (0.1N) para eliminar el CO₂ de entrada en el aire, posteriormente pasa a un humidificador donde el aire se satura en agua. El aire húmedo pasa a un distribuidor de flujo provisto de válvulas de aguja, de donde son alimentadas las columnas sin tolueno, la salida del distribuidor de flujo está conectada al segundo distribuidor de flujo, donde es mezclado con la corriente de tolueno para alimentar las columnas que serán tratadas con tolueno. Las columnas de vidrio de 0.5 L cuentan con tapas herméticas de teflón. La alimentación de tolueno se realiza por la parte inferior. Los gases de salida pasan a través de tubos de 25 ml sumergido en un líquido refrigerante comercial mantenido a -10 °C ± 2, para ser condensados y se analizados posteriormente (ver 3.5.5). Las muestras gaseosas fueron tomadas en puertos provistos en las tapas, desviando la corriente gaseosa antes de pasar al condensador.

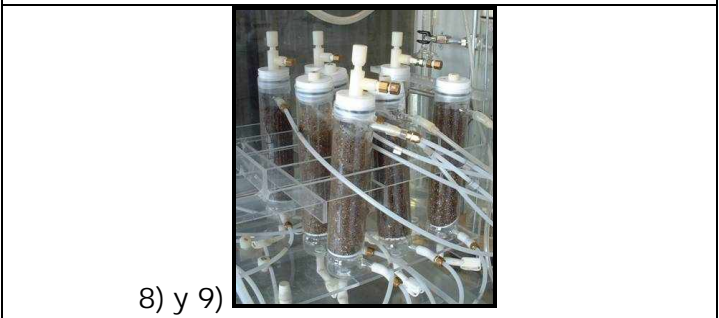
Dos parámetros de operación importantes en este tipo de sistemas relacionados con la fase gaseosa son el tiempo de residencia de lecho vacío (EBRT, por sus siglas en inglés) y la carga del contaminante. El EBRT se calcula como la relación del volumen de lecho y el flujo de aire alimentado. Mientras que, la carga de contaminante en fase gas se define como la masa de contaminante alimentado por volumen de reactor por unidad de tiempo.



2) 3) y 4) 5)



6) y 7) 10)



8) y 9)

Figura 3.2. Esquematización del sistema experimental de columnas empacadas. 1. Compresor. 2. Controladores de flujo másico. 3. humidificador y eliminador de CO₂. 4. Humidificador. 5. Evaporador de tolueno. 6. Distribuidor de flujo con vapores de tolueno. 7. Distribuidor de de aire húmedo. 8. Columnas sin tolueno. 9. Columnas tratadas con tolueno. 10. Condensador. 11. Puertos para muestras gaseosas.

3.4.2.2. Biodegradación de fenantreno

Estos experimentos se llevaron a cabo por duplicado en el sistema experimental mostrado en la Figura 3.2, utilizando el suelo de UAM-I en una mezcla 80:20 (peso húmedo) con vermiculita como agente abultante. El contenido inicial de agua en la mezcla fue de 30% (p/p), basado en las máximas capacidades de retención de cada uno. Este contenido de agua se alcanzó adicionando la cantidad apropiada de medio mineral 3X. El inóculo inicial del consorcio microbiano fue de 38 mg_{biomasa}/kg_{ss}. Las condiciones de operación fueron, 30 ± 2 °C, el tiempo de residencia de lecho vacío fue de 50 min, la carga de tolueno alimentada los reactores fue de 1 g/m³_{reactor}/h, la densidad de empaque fue de 650 kg de mezcla húmeda por m³ de reactor. Un diagrama de la metodología utilizada en estos experimentos se muestra en la Figura C.3 del Anexo C.

Se tomaron diariamente muestras gaseosas para determinar la producción de CO₂ (Sección 3.5.2.) y consumo de tolueno (Sección 3.5.4). También se tomaron muestras de suelo periódicamente para determinación de fenantreno (Sección 3.5.1.)

Como experimentos control se realizaron 3 tipos de corridas bajo las mismas condiciones experimentales con y sin la adición de tolueno por duplicado. 1) Experimentos para evaluar la degradación abiótica de fenantreno, éstos se realizaron con suelo contaminado estéril, sin inocular y adicionados con medio mineral conteniendo 1.3 g/L de azida de sodio como inhibidor microbiano. 2) Experimentos para evaluar la degradación de fenantreno por la microflora nativa. 3) Experimentos de respiración endógena. Para la evaluación de la respiración endógena de la población nativa se utilizó suelo sin contaminar y para la respiración endógena del consorcio microbiano se utilizó suelo estéril sin contaminar e inoculado.

3.4.2.3. Biodegradación de hidrocarburos

Estos experimentos se llevaron a cabo por duplicado en columnas con el suelo Tamaulipas utilizando la misma relación de agente abultante. Las condiciones de operación fueron 30 ± 2 °C, el tiempo de residencia de lecho vacío fue de 50 min, la carga de tolueno alimentada los reactores fue de 2.3 g/m³_{reactor}/h, la densidad de empaque fue de 605 kg de mezcla húmeda por m³ de reactor. Se utilizó un volumen

empacado de 0.275 L. En estos experimentos no se inoculó externamente por lo que, la actividad microbiana se debió a la microflora nativa. El contenido inicial de agua en la mezcla suelo-vermiculita fue de 33%, dicho valor se alcanzó adicionando medio mineral 3X. Un diagrama de la metodología utilizada en estos experimentos se muestra en la Figura C.4 del Anexo C.

Se tomaron muestras gaseosas diariamente para determinar producción de CO₂ (Sección 3.5.2.) y consumo de tolueno (Sección 3.5.4). También se tomaron muestras de suelo periódicamente para determinación de HTP (Sección 3.5.7.)

3.5. Análisis

3.5.1. Concentración de fenantreno

En los experimentos de columnas se tomaron muestras de 3 g de suelo por duplicado. Dichas muestras se tomaron desempacando la columna y homogenizando manualmente su contenido.

Para cuantificar el fenantreno se realizaron extracciones del suelo con acetato de etilo utilizando una relación 1:5 (p/v), las muestras eran puestas en frascos cerrados herméticamente y agitados durante 12 h. El suelo fue separado por decantación y el extracto fue centrifugado a 8000 rpm durante 10 min.

La cuantificación de fenantreno fue realizada en 20 µl en un cromatógrafo de líquidos (HPLC) (Thermo Separation Products, Alemania) con detector UV a 254 nm. Se utilizó una columna 300x3.10 mm (Bondclone 10 µm C18, Phenomenex Inc., EU) a una temperatura de 40 °C. La fase móvil fue una mezcla de acetonitrilo:agua (60:40, v/v) a una tasa de 1.5 ml/min. La curva de calibración utilizada se muestra en el Anexo B.3.

3.5.2. Producción de dióxido de carbono

Se utilizó un cromatógrafo de gases (Gow Mac, series 550, EU) con detector de conductividad térmica (GC-TCD). Dicho equipo está provisto con una columna CRT-1(Alltech, EU) a través de la cual la muestra es arrastrada utilizando una corriente de helio a un flujo de 65 ml/min. Las temperaturas del inyector, detector y columna fueron 30, 100 y 40 °C, respectivamente.

La columna permite separar aire, nitrógeno, dióxido de carbono y oxígeno. Las áreas son correlacionadas para calcular las cantidades de cada uno de ellos de acuerdo a las expresiones mostradas en el Anexo B.4.

En los experimentos de microcosmos, muestras gaseosas de 100 μl fueron tomados con jeringa (Serie A-2, VICI Precision Sampling, Inc., EU) de la fase gaseosa por duplicado para su análisis. Mientras que en los experimentos de columnas fueron tomadas muestras por duplicado de 500 μl a la salida de las columnas.

3.5.3. Concentración de ^{14}C disuelto y $^{14}\text{CO}_2$

En los experimentos con fenantreno marcado, se cuantificó el ^{14}C soluble en muestras de 100 μl de la fase líquida adicionada con 250 μl de líquido de centelleo.

El CO_2 producido fue capturado en una trampa que consiste en un tubo de vidrio de 2 ml en donde se colocaba 0.5 ml de KOH (1N). Para su análisis se adicionaron 0.5 ml de líquido de centelleo (LSC, Sigma-Flour™, Alemania).

Las mediciones se realizaron diariamente, los frascos eran abiertos para tomar la muestra líquida y analizar la solución de KOH. Los frascos se aireaban, la trampa se rellenaba con solución KOH fresca y los frascos eran cerrados nuevamente. Las muestras fueron analizadas en un contador de centelleo (1450 MicroBeta Plus, Perkin-Elmer, Inc., EU). Los cálculos realizados se muestran en el Anexo B.5.

3.5.4. Concentración de tolueno

La concentración de tolueno en la fase gaseosa, fue medida con un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama (GC-FID) (Hewlett-Packard 5890, EU) equipado con una columna de 5 m (Megabore HP-1, EU). Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron 120, 180 y 210 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Como gas acarreador fue utilizado nitrógeno (35 ml/min). Se realizaron curvas de calibración de tolueno en rangos de 0-1.1 g/m^3 y de 0-5 g/m^3 que se muestran en el Anexo B.6.

En los experimentos de microcosmos se tomaron muestras de 100 μl por duplicado de la fase gaseosa. En los experimentos de columnas las concentraciones de entrada y salida fueron medidos tomando muestras gaseosas de 500 μl en jeringa (Serie A-2, VICI Precision Sampling, Inc., EU), dichas mediciones fueron realizadas por duplicado.

3.5.5. Identificación de metabolitos

La búsqueda de metabolitos de la degradación de fenantreno se realizó en dos tipos de muestras. Por un lado, los metabolitos volátiles solubles en agua fueron analizados en los condensados de la salida de aire de las columnas. Las otras muestras fueron preparadas de una extracción del suelo en agua 1:1(p/v). A los dos tipos de muestras se les realizó una extracción en acetato de etilo 1:1 (v/v). Se usó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectro de masas GC-MS (Hewlett-Packard 5972, EU) se analizaron 5 µl de los extractos en acetato de etilo. La columna utilizada fue una 30,000x0.53 mm (HP-5 MS, EU). La temperatura del inyector fue de 300 °C y la del detector de 310 °C. Se utilizó el siguiente programa de temperaturas para el horno, 10 °C/min de 160 a 260 °C y 5 min a la temperatura final. El gas acarreador fue helio y el rango de masa analizado fue de 20 a 300 z/m a 70 eV. Los compuestos fueron identificados mediante la biblioteca nbs75k (HP G1034C MS Chem-Station, EU).

3.5.6. Concentración de ácido ftálico

El ácido ftálico fue cuantificado mediante HPLC en el mismo equipo y condiciones descritas anteriormente (sección 3.5.1). Se utilizó una fase móvil compuesta por agua:metanol:glicerol (83:12:5 v) a un flujo de 1.3 ml/min. El ácido ftálico fue extraído del suelo utilizando una relación 1:1 en agua. La curva de calibración se muestra en el Anexo B.7.

3.5.7. Cuantificación de HTP

La cuantificación de hidrocarburos totales de petróleo se realizó de acuerdo al método EPA-3540C (US-EPA, 1995). Consistió en realizar una extracción Soxhlet utilizando diclorometano como solvente. Las muestras de 5 g se secaron en un desecador a temperatura ambiente y fueron posteriormente adicionadas con 5 g de Na₂SO₄ (sulfato de sodio anhidro). La extracción Soxhlet se realizó durante 5 h. El diclorometano se elimina en un rotavapor. La cantidad de hidrocarburos extraídos se calcula por gravimetría.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN I. Parte experimental

En el presente capítulo se presentan los resultados experimentales de las cinéticas de degradación de fenantreno como molécula modelo de HAP, de suelo contaminado con HTP, así como el efecto del tolueno como cosustrato gaseoso en su degradación y mineralización.

4.1. Biodegradación de fenantreno

4.1.1. Disolución de fenantreno

Los primeros experimentos se realizaron en microcosmos abióticos (ver sección 3.4.1.1) para determinar la solubilidad de fenantreno en agua, utilizando fenantreno marcado (^{14}C) depositado en la superficie del suelo INRA. La concentración en suelo utilizada de 50 mg/kg_{ss}, correspondería a una concentración de fenantreno en líquido de 150 mg/L.

En la Figura 4.1 se muestra las concentraciones de fenantreno medidas en agua. Los datos fueron ajustados con un modelo clásico de solubilidad (Perry's Chemical Engineers' handbook)

$$c = c_{\infty} (1 - e^{-\lambda t})$$

Donde: c_{∞} = solubilidad máxima. λ es una constante y t es el tiempo. La solubilidad máxima encontrada con el ajuste fue de 1.053 ± 0.106 mg/L, este valor está dentro de los valores reportados en la literatura (desde 1.1 hasta 1.6 mg/L, Tabla 1.6). El fenantreno que no se solubiliza se queda depositado sobre los gránulos de arena o como cristales en la fase líquida. El acercamiento en la Figura 4.1 muestra que un valor muy cercano a la solubilidad máxima es alcanzado en las primeras 5 horas de contacto.

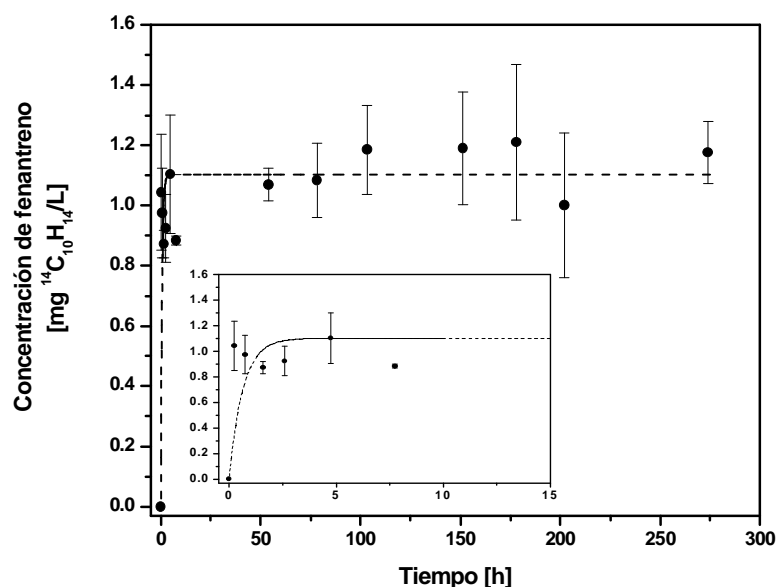


Figura 4.1. Solubilidad de fenantreno en agua. (●) Concentración de fenantreno en la fase líquida. (---) ajuste. $R^2=0.945$. Concentración inicial de fenantreno en suelo de 50 mg/kg_{ss}. La barra de error representa la desviación estándar de 3 réplicas.

En la Figura 4.2 se muestra la solubilidad de fenantreno en medio mineral 3X y el efecto de la adición de tolueno. Para estos experimentos se utilizó el suelo UAM-I. En este caso, el equilibrio se alcanzó hasta las 50 horas y el valor máximo de solubilidad fue ligeramente superior a la encontrada con agua (Figura 4.1), aunque sigue estando dentro del rango reportado por la literatura. El ajuste arrojó valores de solubilidad máxima de 1.239 ± 0.0412 mg/L. A las 175 horas se adicionó tolueno para tener una concentración de 25 g/m³ en la fase gas, observándose una ligera disminución en la concentración de fenantreno. A las 275 h se agregó nuevamente tolueno para tener una concentración de tolueno en fase gas de 60 g/m³, manteniéndose la concentración del fenantreno en fase líquida dentro del rango del error experimental.

Los resultados obtenidos en estos experimentos abióticos permitieron establecer la solubilidad máxima de fenantreno en agua y en medio mineral. Las concentraciones de tolueno de 25 y 60 g/m³ en fase gas (verificadas por cromatografía) corresponden a una concentración al equilibrio con la fase líquida de

92.6 y 222.2 mg/L, utilizando un coeficiente de partición de 0.27¹. Es decir que, las concentraciones de tolueno fueron muy superiores a las concentraciones de fenantreno en el líquido. Los resultados muestran que a pesar de que el fenantreno es altamente soluble en tolueno la solubilidad del fenantreno en la fase acuosa no se vio afectada por la presencia del tolueno a las concentraciones probadas.

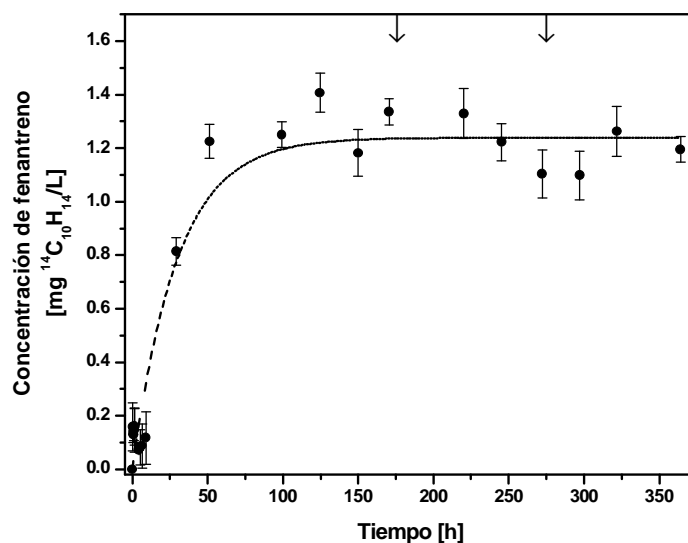


Figura 4.2. Efecto de tolueno en fase gas sobre la solubilidad en medio mineral 3X de fenantreno adsorbido en suelo UAM-I. (●) Concentración de fenantreno en la fase líquida. (i) Adición de tolueno. (---) ajuste. $R^2=0.975$. Concentración inicial de fenantreno 100 mg/kg_{ss}. Concentración de tolueno en fase gas (g/m³), de 0 a 175h=0; de 175 a 274h=25; de 274-365h=60. La barra de error representa la desviación estándar de 3 réplicas.

4.1.2. Efecto de la adición de tolueno en cinéticas de consumo de fenantreno en cultivos líquidos

La metodología seguida en estos experimentos está descrita en la sección 3.4.1.2. Dos tipos de poblaciones microbianas fueron usadas. Un consorcio bacteriano y el hongo *T. versicolor*. Las cinéticas se llevaron a cabo durante 55 horas. Se realizaron experimentos utilizando fenantreno y tolueno con relaciones de carbono entre 0 y 2.0 (p/p). Dichas relaciones están calculadas en base a las aportaciones totales de carbono de cada uno de los sustratos. Las relaciones en el líquido, que es

¹ Ver definición en sección 3.4.1.1

donde se asume ocurren las bio-reacciones, se muestran en la Tabla 4.1. Dicha tabla presenta los balances de carbono bajo las diferentes condiciones experimentales probadas con el consorcio bacteriano y con *T. versicolor*. El consumo de tolueno fue completo en todos los casos con el consorcio y la mineralización (*i.e.*, conversión a CO₂) fue de alrededor de 90%. En los cultivos con *T. versicolor* se consumió el 79% de tolueno y 61% se mineralizó. Para el fenantreno, en los casos donde se adicionaron las dos fuentes de carbono, para evitar una sobrestimación, la mineralización se calculó asumiendo la mineralización completa del tolueno. Así, los porcentajes en estos casos fueron calculados en base al fenantreno, restando el carbono proveniente del consumo de tolueno y de la respiración endógena.

La respiración endógena del consorcio fue evaluada en la ausencia de tolueno y fenantreno, la cantidad de carbono recuperada como CO₂ fue de alrededor de 13% mientras que para *T. versicolor* fue de 9%.

Para los experimentos con fenantreno y/o tolueno, los valores residuales corresponden a la cantidad de carbono no cuantificada como CO₂, y puede ser atribuido a substratos no consumido, el incorporado a biomasa o a metabolitos.

Se observó que la adición de tolueno afectó el consumo y la mineralización de fenantreno. Para el caso del consorcio, dicho consumo se vio favorecido con las relaciones de carbono de 2.0 y de 1.0 mientras que a relaciones menores se observó un efecto inhibitorio. El consumo de fenantreno por *T. versicolor* también se vio inhibido por la presencia de tolueno. Con ambas poblaciones, el fenantreno como única fuente de carbono fue mineralizado en alrededor de 50%. Para el consorcio bacteriano a una relación de carbono de 1.0 se observó una mineralización de fenantreno de más de 92% (Tabla 4.1), este valor fue muy superior al obtenido con las otras relaciones probadas. Para la relación de 2.0 la mineralización disminuyó a 67%. Para los casos donde la cantidad de tolueno fue mayor (relaciones 0.4 y 0.6) se observó una inhibición en la mineralización. La inhibición del consumo de compuestos orgánicos recalcitrantes en presencia de concentraciones altas de substratos más fácilmente asimilables ha sido reportada (Scow y col., 1989).

Tabla 4.1. Balances de carbono para cinéticas de consumo de fenantreno en cultivos líquidos con el consorcio bacteriano y *Trametes versicolor*

	Relación Carbono (Fen/Tol)	Entradas			Salidas	
		Tol C _g [C _L] ^a (g/m ³) [mg/	Fer (mg/	Mineralización (%)	Fenantreno (%)	Residual ^b (%)
Consorcio Bacteriano						
Tolueno		30 [111.1	—	89.83 ±	—	10.17 ±
		40 [148.1	—	90.98 ±	—	9.02 ±
Fenantreno		—	150	54.61 ±	13.82 ±	31.57 ±
	2.0	25 [92.59]	475	67.43 ±	16.15 ±	16.42 ±
Fenantreno	1.0	15 [55.55]	150	92.53 ±	ND	7.47 ±
+ Tolueno	0.6	25 [92.59]	150	15.36 ± 3.91	26.89 ±	57.75 ±
	0.4	40 [148.15]	150	11.32 ±	29.71 ±	58.97 ±
Control Endó		—	—	13.87 ±	—	86.13 ±
<i>T. versicolor</i>						
Tolueno		40 [148.1	—	61.86 ± 1	—	38.14 ± 1.6
Fenantreno		—	150	52.21 ±	29.55 ± 1.84	18.24 ±
Fenantreno + Tolueno	1.0	15 [55.55]	150	22.92 ± 6.04	57.25 ± 3.09	19.83 ± 4.6
Control Endó		—	—	9.29 ±	—	90.71 ±

CL^a es la concentración al equilibrio en la fase líquida (coef. de partición= 0.27). ND- No detectado. ^a
 Calculada en peso de carbono entre fenantreno/tolueno. ^b Balance. ^c Restando la espiración endógena. ^d
 Porcentajes calculados para el fenantreno asumiendo mineralización completa del tolueno y restando la respiración
 endógena. ^e Calculado con respecto a la mineralización de 1.5 mg de carbono. ^f Incluye el 21.37% de tolueno no
 consumido. El error representa la desviación estándar de 4 réplicas.

Estos experimentos mostraron que efectivamente el consorcio era capaz de utilizar de manera simultánea las dos fuentes de carbono, tal como se había planteado en las hipótesis. De igual manera se observó que la cantidad de cosubstrato a adicionar juega un papel importante ya que el efecto positivo sobre la mineralización se dio solo con relaciones de fenantreno/tolueno altas, es decir que las concentraciones de tolueno a adicionar deben ser bajas.

T. versicolor eliminó el 65% del tolueno y 61% fue mineralizado en 57 h. Este valor es comparable a la mineralización de tolueno reportada con la misma cepa de *T.*

versicolor en un sistema de biofiltración (García y col., 2001). Cuando fue adicionado tolueno como fuente de carbono adicional en una relación de carbono 1 a 1, la mineralización de fenantreno se vio inhibida y únicamente el 22% fue recuperado como CO₂. Un estudio en cultivos líquidos con la misma cepa de *T. versicolor*, reportó una degradación de fenantreno del 93% pero únicamente una mineralización de 0.5%, estos autores atribuyeron la baja mineralización a la pérdida de metabolitos volátiles ya que el sistema no era hermético. (Rama-Mercier y col., 1998; Rama y col., 2000).

4.1.3. Biodegradación de fenantreno en columnas empacadas.

4.1.3.1. Efecto de la adición de tolueno en la biodegradación y la mineralización

Se estudió el efecto de la adición de tolueno en la degradación del fenantreno por el consorcio bacteriano, utilizando el sistema de columnas empacadas. Los experimentos fueron realizados por duplicado en columnas, durante 190 h, manteniendo una alimentación de tolueno de 1 g/m³_{reactor}/h.

La cinética de consumo de fenantreno y su mineralización en las columnas control y en presencia de tolueno son mostradas en la Figura 4.3 a) y b) respectivamente. La población mostró un período corto de aclimatación, 24 h, para el consumo de tolueno (Figura 4.3 b), posteriormente se observó un consumo completo que se mantuvo a lo largo del experimento. Este consumo corresponde a 1 g/m³_{reactor}/h. De acuerdo a los resultados de solubilidad de fenantreno, a estas concentraciones de tolueno no existe efecto sobre la solubilidad del fenantreno. En las columnas sin tolueno, la mineralización de fenantreno, evaluada a partir de la producción de CO₂, fue detectada hasta después de 80 h. Por otro lado, en las columnas adicionadas con tolueno, después de 50 horas, el 80% del fenantreno había sido transformado y el 10% mineralizado. En ambos casos, la determinación de fenantreno en el suelo tratado después de 190h, mostraron consumo completo.

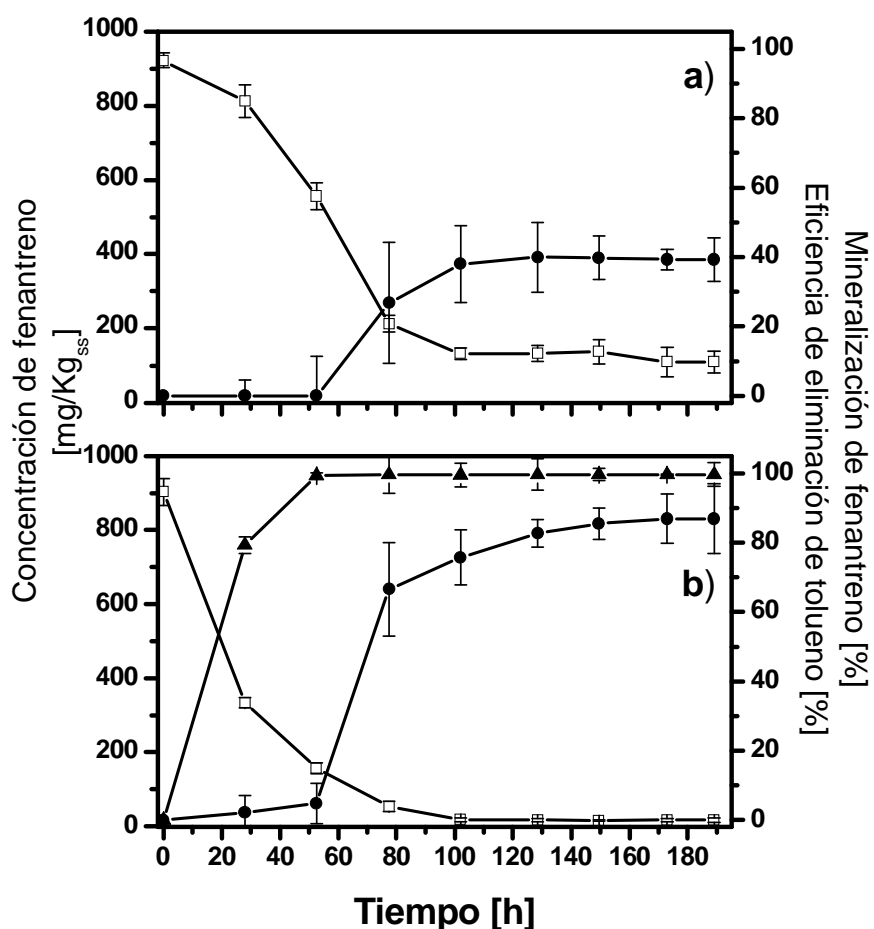


Figura 4.3. Consumo y mineralización de fenantreno y eficiencia de eliminación de tolueno en experimentos de columnas. a) Sin tolueno. b) Con Tolueno. (□) Concentración de fenantreno. (●) Mineralización de fenantreno. (▲) Eficiencia de eliminación de tolueno. Fenantreno inicial 1000 mg/kg_{ss}. Tolueno total adicionado 375 mg/kg_{ss}. La barra de error representa la desviación estándar de 4 réplicas.

Respecto a la cantidad de tolueno adicionada a las columnas hay que tomar en cuenta que debido a su consumo la concentración del tolueno a lo largo del reactor es variable. La concentración máxima de tolueno es en la entrada al reactor, en este punto, la fase gas contenía una concentración de tolueno de 0.42 g/m³ que equivale a una concentración de tolueno en el líquido al equilibrio de 1.55 mg/L (utilizando un coeficiente de partición de 0.27), es decir, que en la entrada al reactor la concentración de tolueno en fase líquida era del mismo orden de magnitud que la máxima solubilidad de fenantreno en agua. Al final del experimento la relación en peso de carbono fenantreno-tolueno fue de 2.5.

4.1.3.2. Productos intermediarios

La Figura 4.4 muestra el cromatograma y el espectro de masas de una muestra tomada a las 100 h de la columna de control, es decir, sin la adición de tolueno como cosubstrato.

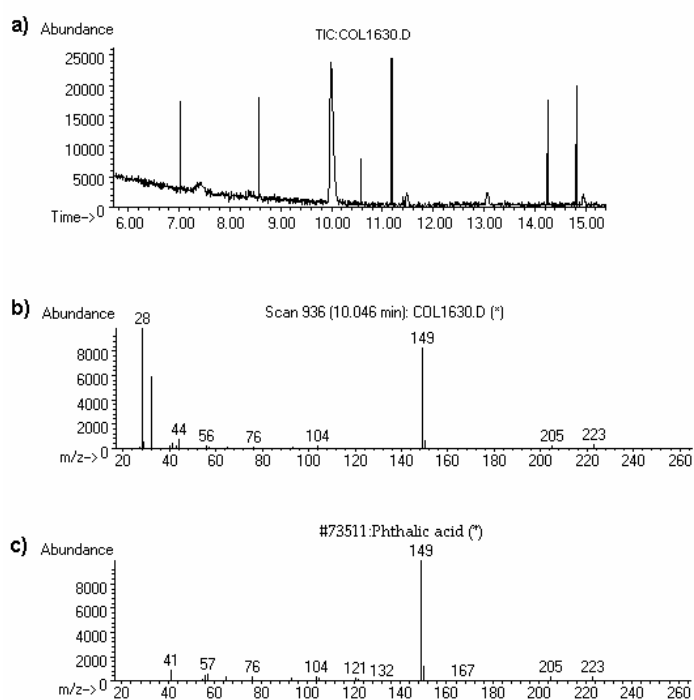


Figura 4.4. Cromatograma y espectros de masas para la extracción de una muestra de suelo tratado en una columna sin tolueno. a) Cromatograma. b) Espectro de masa. c) Espectro de masa de la biblioteca NBS75k.L. Porcentaje de identificación de 90%.

Un pico a los 10.046 min. fue observado y mediante el espectro de masas de la muestra y la comparación con la biblioteca se identificó al compuesto como ácido ftálico con un porcentaje de certidumbre del 90%. Para comprobar la identificación del intermediario, se preparó y analizó un estándar de ácido ftálico. El cromatograma y espectro de masas se muestran en el Anexo D.1.

Además del ácido ftálico, en las diferentes muestras, se observó la presencia de otros picos en bajas concentraciones, por lo que no fue posible identificarlos. La Tabla 4.2 muestra los tiempos de residencia a los que se observaron algunos picos y los compuestos a los cuales se les asoció, en la biblioteca de espectros de masas con la que cuenta el equipo. Como se puede ver el porcentaje de certidumbre de la

identificación del compuesto es muy baja, a excepción del ácido ftálico. Los otros posibles compuestos no están implicados en las rutas metabólicas ni vía ftalato ni vía naftaleno (Figuras 1.3 y 1.4).

Tabla 4.2. Posibles compuestos asociados a picos presentes en análisis de GC-MS de muestras de suelo tratado sin adición de tolueno

Tiempo de residencia (min)	Compuesto	% Identificación
6.136	Propinadamina	27
6.218	(Tetrahidroxyciclopentadienona) tricarbonyl	32
8.273	Hexatriacotano	43
9.183	2-Hexyl-1-decanol	72
9.252	Ácido dodecanodioico	53
10.032	Dibutil-ftalato	74
10.046	Ácido ftálico	88
10.047	Bis(2-metoxi etil) ftalato	38
10.239	Hexadecano	50
11.239	Dotriacontano	33

^a Biblioteca GC-MS, NBS75k.L (HP)

La Figura 4.5 muestra los resultados obtenidos en el cromatógrafo acoplado a espectro de masas (GC-MS) de extractos de muestras de suelo. Se realizaron extracciones a las 48, 100 y 190 horas. Se observó la aparición del ácido ftálico y su acumulación en las columnas control.

A las 48 horas, el fenantreno no había sido completamente consumido, mientras que el ácido ftálico era 3 veces más abundante en las columnas sin tolueno; después de 100 horas, el ácido ftálico continuó acumulándose y a este tiempo ya era 10 veces más abundante comparado con las columnas con tolueno. El fenantreno ya no fue detectado, confirmando el 90% de consumo detectado mediante HPLC (Figura 4.3). El cromatograma y espectro de masas de un estándar de fenantreno se muestra en el Anexo D.2. A las 190 horas, el ácido ftálico se mantuvo constante, en las columnas con tolueno. En el caso del control sin tolueno, la abundancia de éste

disminuyó un 20%, sin embargo este valor era constante desde las 120 horas (cromatograma no mostrado) y se mantuvo constante hasta las 190 horas.

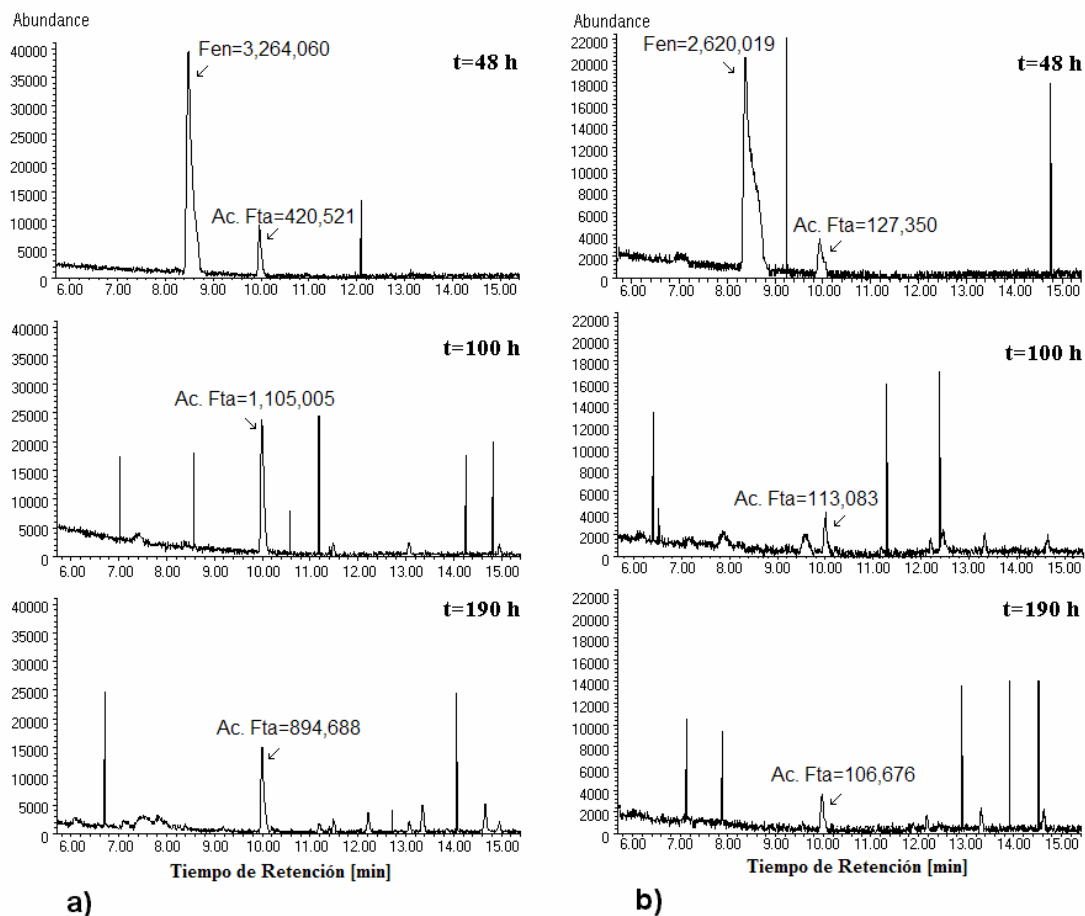


Figura 4.5. Cromatogramas de GC-MS para extractos de suelo a 48,100 y 190 horas de degradación de fenantreno en columnas empacadas. a) Sin adición de tolueno. b) Adicionando tolueno. Fen = área de fenantreno (Tiempo de residencia = 8.57 min). Ac. Fta= área de ácido ftálico (Tiempo de residencia = 10.047 min).

Otros estudios han reportado la acumulación de otros intermediarios en la degradación de fenantreno, por ejemplo el ácido 2-2'-difénico (Bezalel y col., 1996). Para otros HAP, como el naftaleno, se ha reportado que la acumulación de naftoquinona, como producto intermediario de la biodegradación, se incrementó cuando la disponibilidad del naftaleno aumentó (Kazunga y Aiken, 2000).

4.1.3.3. Balances de carbono

La producción de CO₂ en las columnas empacadas fue integrada, para calcular el porcentaje de fenantreno mineralizado. La gráfica que muestra la producción de CO₂ en función del tiempo se muestra en el Anexo D.3. El CO₂ producido por la respiración endógena fue restado para realizar los cálculos de mineralización del fenantreno. De igual manera la producción de CO₂ debida al consumo de tolueno fue tomada en cuenta. En las columnas donde solo se adicionó tolueno se cuantificó una mineralización del 79%. En trabajos de biofiltración de tolueno los balances de carbono muestran un porcentaje de mineralización de 44.5% y 80% utilizando turba y vermiculita como soporte respectivamente, (Morales y col., 1998; Pineda y col., 2000). En biofiltración de mezclas de benceno, tolueno y xileno, se encontró una mineralización entre 51% y 88% para varios soportes (Ortiz y col., 2003b). En otro estudio, (Zhang y Bouwer, 1997) de biodegradación de mezclas de tolueno, benceno, y naftaleno en microcosmos con lodos, reporta una mineralización del tolueno de 58.4%. Sin embargo, en el presente trabajo, en el cálculo de la mineralización de fenantreno se asumió mineralización completa del tolueno para no sobre estimar dichos valores y poder hacer una comparación objetiva con los controles que no fueron adicionados con tolueno.

El balance de carbono para el fenantreno se muestra en la Tabla 4.3. Los resultados obtenidos fueron el 90% y 98% del fenantreno consumido en las columnas control y en las que se adicionó tolueno, respectivamente. La mineralización se vio incrementada de 39% hasta 87% con la presencia y consumo simultáneo de tolueno.

Tabla 4.3. Balances de carbono para el fenantreno en experimentos de columnas
% C recuperado como

	Fenantreno Residual	CO ₂ (Mineralización)	Metabolitos (Ácido ftálico)	Biomasa y ot
Sin tolueno	10.25 ± 0.22	39.29 ± 1.70	38.49 ± 1.92	8.37 ± 3.39
Con tolueno	2.22 ± 1.00	86.84 ± 6.15	4.06 ± 1.17	6.88 ± 6.33

Valores integrados para 190 h. Los resultados fueron corregidos restando la producción de CO₂ debido a la degradación de tolueno y la respiración endógena. Fenantreno inicial 1000 mg/kg_{ss}. Tolueno total adicionado 375 mg/kg_{ss}. El error representa la desviación estándar de 4 réplicas para fenantreno residual y CO₂ y de 3 réplicas para ácido ftálico.

El principal intermediario identificado, el ácido ftálico, cuantificó el 40% del carbono cuando no se adicionó tolueno. Esta cantidad tomó en cuenta tanto el ácido ftálico condensado de la fase gas (2%) como el que permaneció solubilizado en la fase acuosa (98%). En el caso de las columnas tratadas con tolueno el ácido ftálico solo cuantificó el 2%. La cantidad faltante para cerrar el balance, aproximadamente el 8%, fue atribuido a biomasa y otros intermediarios, este valor es comparable al 13.8% encontrado como biomasa en la degradación de HAP con un consorcio bacteriano (Ressler y col., 1999).

La acumulación del 40% de carbono como ácido ftálico es comparable con el porcentaje de metabolitos solubles de la degradación de fenantreno reportado por Barclay y col. en 1995. Otros valores reportados son 28% para *Pleurotus ostreatus* (Bezalel y col., 1996), 24% para *arthrobacter polychromogenes* (Keuth y Hans-Jürgen, 1991), 14% para *pseudomonas* (Bouchez y col., 1996) y 7.5% con un cultivo mixto bacteriano (Tiehm, 1994). En otro estudio, (Bumpus, 1989), se encontró que la composición de los intermediarios acumulados después de la degradación de mezclas de HAP era 91% de metabolitos solubles de fenantreno.

Por otro lado, también han sido reportados bajos niveles de acumulación de intermediarios en la degradación de fenantreno utilizando *Mycobacterium*, cepa BG1, ésto fue atribuido a una alta regulación de la síntesis enzimática de ese microorganismo (Guerin y Jones, 1988). La presencia de naftaleno aún en bajas concentraciones ha sido reportado como inhibidor de la degradación de fenantreno (Shuttleworth y Cerniglia, 1996).

4.1.3.4. Tasas de consumo de fenantreno y producción de CO₂

La Figura 4.6 muestra el consumo de fenantreno para los dos tratamientos. Se observa claramente mayor consumo durante las primeras horas en el tratamiento del suelo adicionado con tolueno, comparado con los controles sin tolueno. Los datos fueron ajustados con el modelo Gompertz y los valores de los parámetros se muestran en la Tabla 4.4.

El consumo de fenantreno y la producción de CO₂ (Figura 4.6 y Figura D.3 Anexo D) fueron ajustados con el modelo Gompertz y los valores encontrados se

muestran en la Tabla 4.4. En las columnas con tolueno la tasa máxima de producción de CO₂ fue 1.5 veces mayor, mientras que la tasa máxima de consumo de fenantreno fue 1.3 veces mayor comparada con las columnas control sin tolueno. Estas velocidades máximas y el tiempo al cual se presenta la máxima tasa de consumo o producción, t_c , fueron calculadas de acuerdo a lo descrito en la sección 1.3.3. La combinación de una tasa de consumo más alta (K) y un mayor consumo máximo (A).

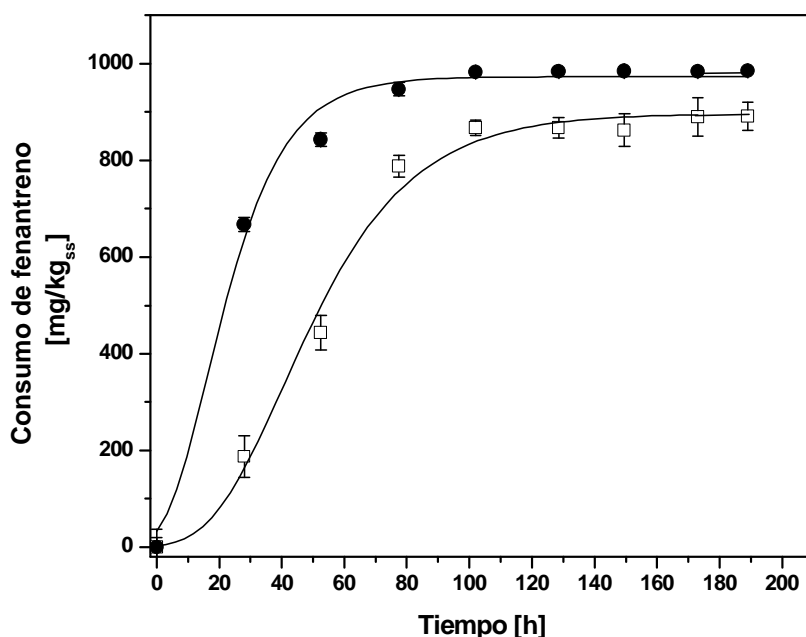


Figura 4.6. Consumo de fenantreno en columnas empacadas. (□) Sin tolueno. $R^2=0.98$. (●) Con tolueno. $R^2=0.99$. (—) Ajuste con el modelo Gompertz. Fenantreno inicial 1000 mg/kg_{ss}. Tolueno total adicionado 375 mg/kg_{ss}. La barra de error representa la desviación estándar de 4 réplicas.

Tabla 4.4. Parámetros A , K y t_c del modelo Gompertz para el consumo de fenantreno y la producción de CO₂ en columnas empacadas

	A	K	R^2	$V_{max}=0.368A$	t_c
Consumo de fenantreno	(mg/kg _{ss})	(h ⁻¹)	(-)	(mg/kg _{ss} /h)	(h)
Sin tolueno	897.02	0.044	0.98	14.52	40.21
Con tolueno	977.97	0.058	0.99	20.87	13.26
Producción de CO ₂	(g/m ³ _{reacto}	(h ⁻¹)	(-)	(g/m ³ _{reactor} /h)	(h)

Sin tolueno	562.13	0.079	0.99	16.34	66.73
Con tolueno	1632.29	0.043	0.99	25.83	65.74

R^2 es el coeficiente de correlación

4.1.3.5. Controles abióticos

En los controles abióticos (sección 3.4.2.2) el 96% del fenantreno fue recuperado de las columnas sin tolueno. El 4% faltante, se encuentra dentro del rango de eficiencia de la extracción. Y se confirmó con las muestras en GC-MS (Figura 4.7) donde no se detectó producción de intermediarios. El área cuantificada de fenantreno para la muestra final fue 3.3% menor que la muestra inicial. Tampoco se detectó producción de CO_2 .

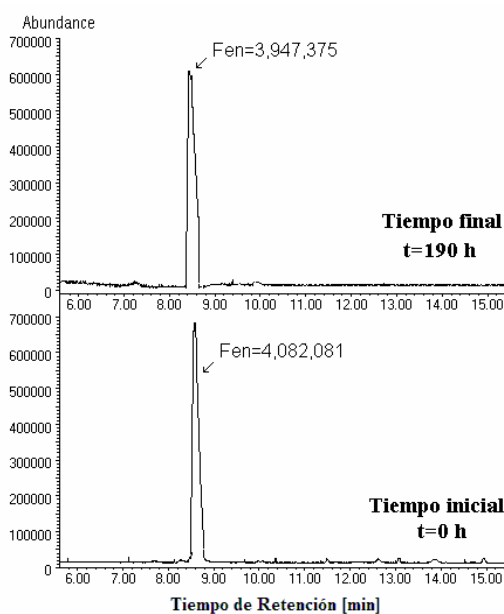


Figura 4.7. Cromatograma para controles abióticos. Fen=fenantreno.

Algunos estudios reportan transformaciones químicas abióticas de HAP con el tiempo y a bajos contenidos de humedad (Lotfabad y col., 1996). En el control abiótico, con tierra estéril, las pérdidas observadas se encontraron dentro del rango de confiabilidad del método de extracción.

4.1.3.6. Controles con poblaciones nativas y respiración endógena

Estos experimentos evaluaron la capacidad de la población nativa para degradar fenantreno y tolueno. El suelo UAM-I, fue contaminado artificialmente y presumiblemente no había estado en contacto con los contaminantes. Después de 190 horas de experimentación se integraron los valores de CO₂ producido por la población nativa para hacer un balance de carbono en el sistema. Los resultados son mostrados en la Tabla 4.5. La población nativa transformó 38% y mineralizó 12% con la adición de tolueno. La degradación de tolueno se inició solo después de 160 horas, así el consumo del tolueno como única fuente de carbono fue del 42%. En el caso del suelo no tratado con tolueno no se detectó producción de CO₂, ésto pudo ser debido a la sensibilidad del equipo o bien a que no hubo degradación y que el 7% del fenantreno que no se recuperó posiblemente fueron pérdidas de extracción.

Por otro lado, se evaluaron las respiraciones endógenas del consorcio microbiano y de la población nativa (sección 3.4.2.2) representaron el 16% y 22% (calculados en base a 1.5 mg de carbono) respectivamente.

Tabla 4.5. Mineralización y consumo de fenantreno y tolueno en experimentos de columnas para los controles con la población nativa

Carbono (%)	Tolueno		Fenantreno	
	Sin tolueno		Con tolueno	
Consumo	42.95 ± 1.5	7 ± 1.22	38 ± 2.31	
Mineralización	31.74 ± 2.8	—	12.03 ± 0.92	

Valores integrados para el tiempo final de 190 h. Fenantreno inicial de 1000 mg/kg_{ss}. Tolueno total adicionado 375 mg/kg_{ss}. ^a Para el consorcio bacteriano. ^b Porcentajes calculados para fenantreno asumiendo mineralización completa de tolueno y restando la respiración endógena. ^c Porcentaje calculado con respecto al fenantreno. ^d No existen duplicados. El error representa la desviación estándar de 4 réplicas.

4.1.3.7. Efecto de la adición de tolueno en las poblaciones microbianas

Con el fin de establecer una diferenciación cuantitativa entre las poblaciones establecidas a lo largo del tratamiento del suelo contaminado con fenantreno en

columnas (4.1.3.1), se tomaron muestras finales de suelo de las columnas inoculadas con el consorcio bacteriano, tratadas sin y con tolueno (Poblaciones I y II) y muestras de suelo tratado con tolueno pero que no fue inoculado (Población III). Estos experimentos se realizaron de acuerdo a las condiciones descritas en la sección 3.4.1.3. La respiración de las poblaciones fue tomada como una mediada indirecta de la actividad microbiana (Hund y Schenk, 1994).

Los resultados para los 3 tipos de muestras se muestran en la Figura 4.8. Se puede observar una diferenciación en la respiración de las poblaciones que provenían de diferentes tratamientos. La Población III mostró una menor producción de CO₂ que las otras dos poblaciones. Por otro lado, la Población II, proveniente de las columnas tratadas con tolueno, mostró una mayor producción de CO₂, esto puede deberse a la presencia de más biomasa o mayor actividad microbiana. La medición de la producción de CO₂ no permite determinar diferenciar entre esas dos posibilidades. Por otro lado, si la biomasa presente fue mayor indicaría que la consideración de la mineralización total de tolueno en los cálculos de mineralización de fenantreno no es cierta y que parte del tolueno se está utilizando para la producción de biomasa. Es decir, que el efecto sobre la mineralización de fenantreno es aún mayor debido a la presencia de tolueno. Sin embargo, como no se determinó la cantidad de tolueno que es aprovechada para la formación de biomasa, se dejó la consideración para los cálculos.

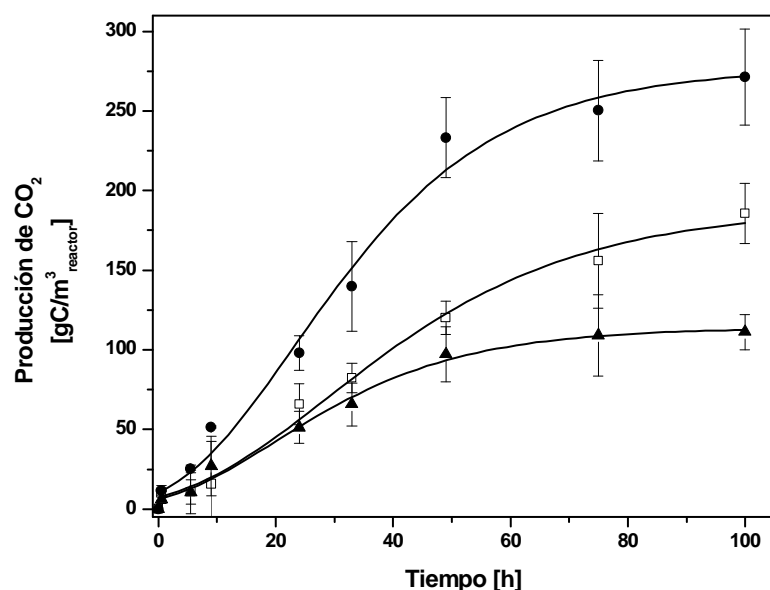


Figura 4.8. Producción de CO_2 en experimentos de microcosmos para muestras finales de suelo tratado en sistemas de columnas. (□) Población I: muestras de columnas sin tolueno. (●) Población II: muestras de columnas tratadas con tolueno. (▲) Población III: muestras de columnas tratadas con tolueno y sin inoculación inicial. (—) Ajuste con modelo Gompertz. La barra de error representa la desviación estándar de 6 réplicas.

La producción de CO_2 fue ajustada con el modelo de crecimiento Gompertz (Sección 1.3.3.1), el ajuste se muestra en la Figura 4.8, mientras que los valores de los parámetros del modelo se muestran en la Tabla 4.6. El consorcio bacteriano al final del experimento se comportó de manera distinta, dependiendo del tratamiento que recibió, es decir, de la adición o ausencia de tolueno. Para la Población II, que había sido tratada con tolueno, se obtuvo una velocidad máxima de producción de CO_2 , 45% mayor que para la población que no había sido tratada con tolueno (población I). Mientras que velocidad máxima de producción de la población nativa tratada con tolueno (población III), fue 54% inferior que la de la población II. Con estos resultados podemos distinguir una mayor actividad microbiana en aquellas muestras provenientes del tratamiento de tolueno.

Tabla 4.6. Parámetros A, K y t_c del modelo Gompertz para la producción de CO_2 en microcosmos para muestras finales de suelos tratados

	A	K	R^2	$V_{\max}=0.368A\bar{t}$	t_c
Producción de CO_2	(g/m ³)	(h ⁻¹)	(-)	(g/m ³ /h)	(h)

Población I	189.39	0.041	0.95	2.87	28.74
Población II	276.97	0.052	0.95	5.30	23.11
Población III	113.91	0.055	0.95	2.30	19.68

Población I: Muestras de columnas inoculadas con el consorcio bacteriano y tratadas sin tolueno.
 Población II: Muestras de columnas inoculadas con el consorcio bacteriano y tratadas con tolueno.
 Población III: Muestras de columnas sin inoculación inicial y tratadas con tolueno.
 R^2 es el coeficiente de correlación.

Es importante resaltar que un incremento en la población microbiana, no necesariamente significa un incremento en la mineralización de fenantreno. Un estudio de bioestimulación para la degradación de fenantreno no observó efectos sobre la mineralización debido a que los compuestos utilizados, surfactantes, metabolitos y suplementos orgánicos e inorgánicos, favorecieron el establecimiento de heterótrofos y no de las poblaciones degradadoras de fenantreno (Carmichael y Pffaender, 1997). En este caso, podemos afirmar que el tolueno incrementó la presencia de biomasa activa, es decir, capaz de degradar fenantreno y ácido ftálico. Además de una biomasa activa incrementada, es posible también que se la producción de enzimas capaces de degradar tanto fenantreno como intermediarios se favoreció. Esta hipótesis se discutirá mas adelante en la sección de degradación del ácido ftálico (4.1.5.)

4.1.3.8. Reproducibilidad

El experimento de columnas se repitió en cuatros ocasiones, obteniéndose resultados cualitativos muy similares, es decir, mayor mineralización en la presencia de tolueno. Sin embargo, a nivel cuantitativo, los valores de mineralización variaron desde 13% hasta 39% en los controles sin tolueno y desde 54% hasta 86% con la adición de tolueno. Los resultados estadísticos de estas réplicas se muestran en la Figura 4.9 para 7 días de experimentación. La mineralización promedio sin tolueno fue de 22% y con la adición de tolueno el promedio de mineralización fue de 62%. En el experimento 2, en el que se obtuvieron los porcentajes más bajos de mineralización de fenantreno, se observó que la humedad de las columnas bajó considerablemente de 30% inicial hasta 18%, debido a una falla en el sistema de humidificación.

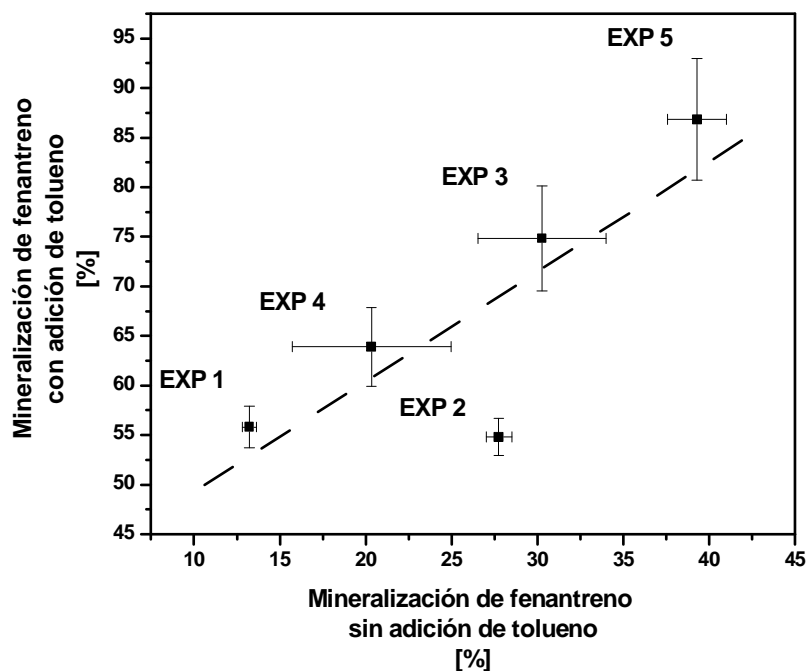


Figura 4.9. Mineralización de fenantreno sin adición de Tolueno –vs- con adición de tolueno en experimentos en columnas empacadas. Correlación $y = 38.20389 + 1.10927(X)$. $R^2=0.809$. La barra de error representa la desviación estándar de 4 réplicas.

En la Figura 4.9 se observan los porcentajes de mineralización para las columnas controles y las adicionadas con tolueno. El Experimento 2, se comportó de manera muy diferente con respecto a las otras repeticiones, debido a esto la correlación encontrada tiene un ajuste del 0.809. Eliminado los valores de este experimento se obtiene una correlación con un ajuste de 0.999.

4.1.4. Biodegradación de fenantreno ($9\text{-}^{14}\text{C}_{14}\text{H}_{10}$) y tolueno

Estos experimentos en microcosmos fueron realizados de acuerdo a la metodología descrita en la sección 3.4.1.3 y los resultados obtenidos se muestran a continuación. La Figura 4.10 muestra el consumo acumulado de tolueno para ambas poblaciones. La población fúngica no consumió tolueno durante las primeras 50 horas y globalmente consumió el 60% del tolueno alimentado. Mientras que, la población del consorcio consumió el tolueno mas rápida y eficientemente, eliminando más del 90% del tolueno alimentado.

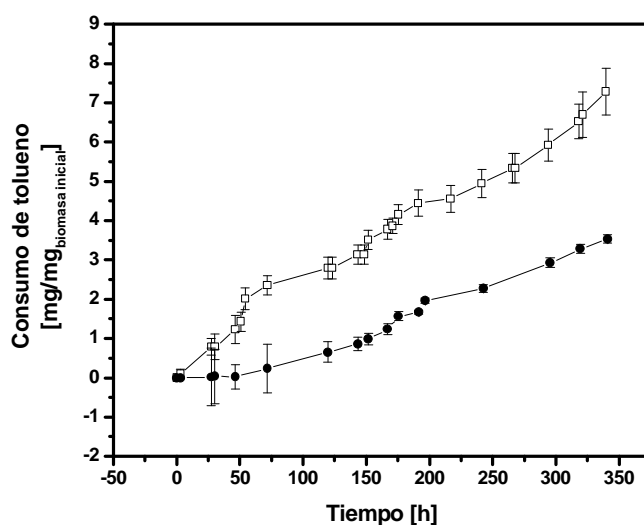


Figura 4.10. Consumo acumulado de tolueno en experimentos en microcosmos. (●) *T. versicolor*. (□) Consorcio. Valores normalizados por miligramo de biomasa inicial. Cantidad de tolueno adicionado (normalizada a la biomasa inicial): 7.11 mg/mg_{biomasa} para el consorcio y 4.2 mg/mg_{biomasa} para *T. versicolor*. La barra de error representa la desviación estándar de 6 réplicas.

La conversión del fenantreno marcado ($9\text{-}^{14}\text{C}_{14}\text{H}_{10}$) en subproductos solubles, así como su mineralización con el consorcio microbiano, son mostradas en la Figura 4.11. La cantidad de CO_2 producido fue el doble con tolueno, Figura 4.11 b, comparado con el control sin tolueno, Figura 4.11 a. La cantidad total de ^{14}C en la fase líquida permaneció constante en 0.1 mg en los experimentos con tolueno. Mientras que en los experimentos control, el ^{14}C soluble empezó a incrementarse después de 175 h, indicando una acumulación de subproductos solubles (Figura 4.11 a). El valor máximo de ^{14}C soluble (0.27 mg) corresponden a una concentración en la fase líquida de 30 mg/L, este valor es 30 veces mayor que la máxima solubilidad del fenantreno en agua, lo cual indica la presencia de compuestos altamente solubles. No se identificaron los compuestos solubles, pero debido a que el ácido ftálico es altamente soluble (6.25 g/L) es posible pensar que estuviera presente. El 83% del ^{14}C inicial fue recuperado como $^{14}\text{CO}_2$ con la adición de tolueno y 45% en el caso del control como se muestra en la Tabla 4.7.

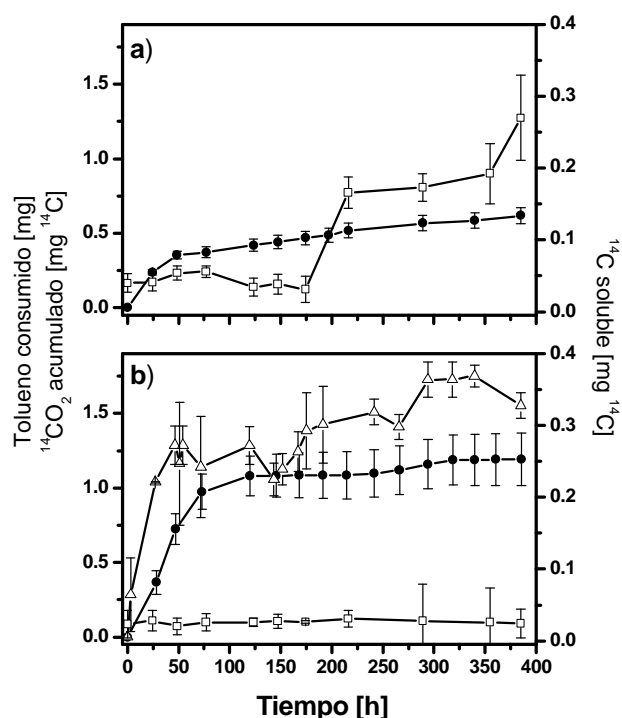


Figura 4.11. Producción de $^{14}\text{CO}_2$ e intermediarios solubles y consumo de tolueno con el consorcio bacteriano. a) Sin tolueno b) Con tolueno. (●) Producción acumulada de $^{14}\text{CO}_2$. (□) Producción de ^{14}C soluble. (Δ) Consumo de tolueno. La barra de error representa la desviación estándar de 3 réplicas.

En el caso de las cinéticas con *T. versicolor*, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.12 y en la Tabla 4.7. Respecto a la producción de CO_2 se observó una fase de adaptación de la población de alrededor 150 h en ambos casos, con y sin la adición del tolueno como cosubstrato. Sin embargo, al final del experimento la mineralización fue superior para el control, indicando una posible inhibición debido a la presencia del tolueno. Este consumo fue parcial durante las primeras 175 horas y completo entre las 175 y 385 horas de la cinética. Sin embargo, este consumo de tolueno favoreció la acumulación de productos solubles. La cantidad de ^{14}C en la fase líquida alcanzó un valor final de 0.38 mg fue superior al encontrado en el caso del consorcio bacteriano. En general, los resultados obtenidos con el cultivo puro fueron poco alentadores. Las capacidades enzimáticas de un microorganismo son más específicas y por ende más limitadas que aquellas encontradas en un consorcio. Sin embargo, las tasas de consumo debido a esa especificidad son mayores para contaminantes específicos (García-Peña y col., 2001).

Ha sido reportado que los consorcios bacterianos pueden llevar a cabo una degradación más completa que la que se logra con cultivos puros, debido probablemente a que los consorcios pueden degradar los metabolitos que en el cultivo puro se acumulan. (Kazunga y Aiken, 2000). Un estudio de la degradación de fenantreno como única fuente de carbono y en mezcla con HAP con cultivos puros y consorcios, mostró mejores resultados con consorcios bacterianos para la degradación y mineralización, posiblemente debido a que existían en el consorcio tanto cepas que compensaron los efectos inhibitorios por competencia como cepas capaces de degradar los potenciales metabolitos inhibitorios (Shuttleworth y Cerniglia, 1996; Bouchez y col., 1999). Los tratamientos de suelos utilizando consorcios son ampliamente preferidos a los cultivos puros, por las condiciones de esterilidad que requiere mantener un cultivo puro y por la versatilidad que se puede obtener con los consorcios para degradar mezclas de compuestos.

Dados los resultados obtenidos con la cepa fúngica, donde no se observó un efecto positivo en la degradación de fenantreno con la adición de tolueno, se decidió no estudiar esta población a nivel de columnas empacadas. Por otro lado, la experimentación en las columnas con la alimentación continua de aire en condiciones no estériles implicaría algún tipo de control para evitar contaminaciones y mantener mayoritariamente la población fúngica.

Tabla 4.7. Balances de carbono ^{14}C en los experimentos de microcosmos
% ^{14}C recuperado como

	Soluble	$^{14}\text{CO}_2$ (Mineralización)	Biomasa y fenantreno soluble
<i>Consortio Bacteriano</i>			
Sin Tolueno	18.88 ±	45.91 ±	35.21 ±
Con Tolueno	2.66 ±	83.79 ±	13.55 ±
<i>Trametes Versicolor</i>			
Sin Tolueno	5.61 ± 0.97	49.11 ±	45.28 ±
Con Tolueno	34.13 ±	28.39 ±	37.48 ±

Valores integrados para el tiempo final de 385 h. Fenantreno ^{14}C inicial de 50 mg/kg_{ss}. Tolueno total adicionado 21 mg. El error representa la desviación estándar de 3 réplicas.

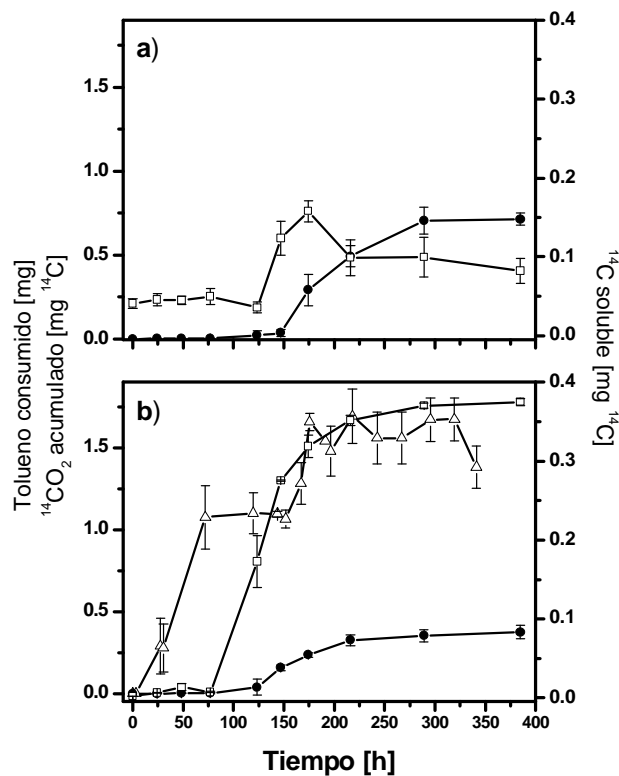


Figura 4.12. Producción de CO_2 , productos solubles y consumo de tolueno para *T. versicolor*. a) Sin tolueno b) Con tolueno. (●) Producción acumulada de $^{14}\text{CO}_2$. (□) Producción de ^{14}C soluble. (Δ) Consumo de tolueno. La barra de error representa la desviación estándar de 3 réplicas.

4.1.5. Degradación de ácido ftálico

En la sección 1.3.2.4., se han mostrado las rutas completas de degradación del fenantreno. De acuerdo a la identificación y cuantificación del ácido ftálico se puede afirmar que el consorcio sigue mayoritariamente la ruta del o-ftalato (Kiyohara y col., 1976). *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes sp.* y *Micrococcus sp.* han sido reportados como degradadores de fenantreno por esta misma vía (Doddamani y Ninnekar, 2000). Después de identificar al ácido ftálico como el principal intermediario de la degradación de fenantreno, se realizaron cinéticas de consumo de dicho compuesto en microcosmos, en donde se estudió el efecto de la adición de tolueno en su consumo y mineralización.

La Figura 4.13 muestra la producción acumulada de CO_2 en la degradación de ácido ftálico. En el caso de la adición de tolueno, se cuantificó más del doble. En la Figura 4.13 se muestra el ajuste de la producción de CO_2 utilizando el modelo Gompertz. Mientras que los valores de los parámetros del modelo se encuentran en la Tabla 4.8.

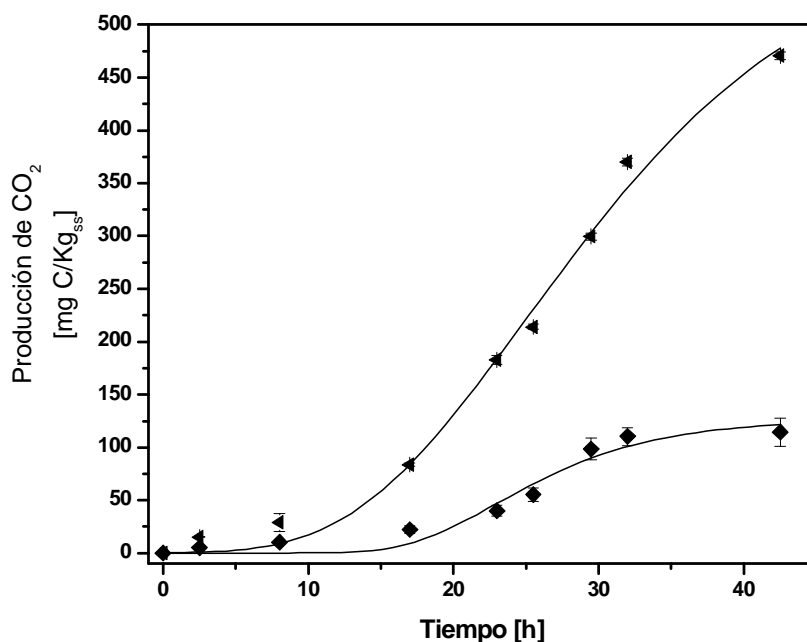


Figura 4.13. Producción de CO_2 en la degradación de ácido ftálico en microcosmos. (◆) Sin tolueno. (▲) Con tolueno, corregido por la producción debida al consumo de tolueno. Concentraciones iniciales de ácido ftálico y tolueno de $1000 \text{ mg/kg}_{\text{ss}}$ y $250 \text{ mg/kg}_{\text{ss}}$, respectivamente. (—) Ajuste con modelo Gompertz. La barra de error representa la desviación estándar de 3 réplicas.

Los parámetros del modelo Gompertz muestran que la velocidad máxima de producción de CO_2 es 2.5 veces mayor cuando se adiciona tolueno comparado con los controles sin tolueno (Tabla 4.8).

Después de 50 horas, el consorcio degradó únicamente 30% del ácido ftálico en el control sin tolueno, mientras que en la presencia de tolueno, se degradó más del 90% del ácido ftálico. Por su parte, la mineralización del ácido ftálico se vio incrementada de un 19% a un 81% con la adición de tolueno en la fase gas. El consumo de tolueno fue del 99%. Como en todos los demás cálculos se asumió mineralización completa. El balance de carbono muestra que un 12% y 14% del

carbono no fue cuantificado y se atribuye nuevamente a biomasa e intermediarios. Tabla 4.9.

Tabla 4.8. Parámetros A, K y t_c del modelo Gompertz para la producción de CO₂ para la degradación en microcosmos de ácido ftálico

	A	K	R ²	Vmax=0.368A	t _c
Producción de CO ₂	(mgC/kg _{ss})	(h ⁻¹)	(-)	(mgC/kg _{ss} /h)	(h)
Sin tolueno	126.67	0.163	0.96	7.59	22.96
Con tolueno	598.91	0.085	0.96	18.73	25.35

R² es el coeficiente de correlación.

La diferencia en las tasas de degradación y mineralización de ácido ftálico, con y sin la presencia de tolueno, puede explicarse en términos del desarrollo de diferentes poblaciones microbianas debido a la presencia de tolueno y que las capacidades intrínsecas de dichas poblaciones para la degradación del ácido ftálico son diferentes. Por otro lado, es posible también que la degradación del ácido ftálico se lleve a cabo mediante procesos de cometabolismo con algún intermediario de la degradación del tolueno. La otra hipótesis sobre el efecto del tolueno en la degradación del ácido ftálico es en términos de las actividades enzimáticas de las poblaciones microbianas.

Puesto que los metabolitos tienen una composición química y un efecto toxicológico diferentes a las del compuesto contaminante original que los produce, es importante mencionar que el ácido ftálico muestra una resistencia moderada a ser biodegradado en la naturaleza. Para el caso de biodegradación de suelos contaminados con mezclas de HAP, también ha sido reportado incrementos en la mutagenicidad y toxicidad y han sido explicados por la presencia y acumulación de metabolitos (Kazunga y Aiken, 2000). Un estudio de la degradación de HAP con un consorcio bacteriano (Ressler y col., 1999), explica la reducida mineralización de HAP y acumulación de metabolitos como resultado de la reacción de dichas moléculas con la materia orgánica disuelta y su posterior enlace irreversible con la materia orgánica particulada en donde no son viables para el ataque microbiano. Por otro lado, tres

cepas de *Sphingomonas* fueron reportadas como incapaces de crecer en salicilato o ftalato, a pesar de crecer en fenantreno (Bogan y col., 2001). En el caso del coco Gram negativo cepa B156 su incapacidad enzimática para transformar el ftalato fue atribuida a una barrera impermeable que impide el contacto apropiado con las enzimas intracelulares o con la ausencia de dichas enzimas (Barnsley, 1983).

Tabla 4.9. Balances de carbono para la degradación de ácido ftálico en microcosmos
% C recuperado como

	Ácido ftálico Residual	CO ₂ (Mineralización)	Biomasa y otros
Sin tolueno	68.12 ± 0.32	19.88 ±	12.00 ± 4.47
Con tolueno	3.50 ± 0.37	81.68 ±	14.82 ± 2.82

Valores integrados para 50 h. Los resultados fueron corregidos restando la producción de CO₂ debido a la degradación de tolueno y la respiración endógena. Concentraciones iniciales de ácido ftálico y tolueno de 1000 mg/kg_{ss} y 250 mg/kg_{ss}, respectivamente. El error representa la desviación estándar de 3 réplicas.

Un estudio de la degradación de fenantreno concluyó que el protecuato producido a partir de *o*-ftalato es degradado por el rompimiento del anillo en las posiciones 4,5 y que esta ruta es inducible ya que las células crecidas en glucosa no tienen esta actividad enzimática. (Doddamani y Ninnekar, 2000).

En un estudio de la actividad de la enzima tolueno-*orto*-monoxigenasa (TOM) de *Burkholderia cepacia* expresada en *Escherichia coli* para analizar su capacidad de oxidar HAP de 3 anillos, se comprobó la intervención de TOM en la degradación de dichos compuestos ya que el organismo modificado fue capaz de degradar 3 veces más rápidamente fenantreno y otros HAP que la cepa sin modificación (Canada y col., 2002). La TOM interviene en la conversión de tolueno a metil-catecol, en la oxidación de naftaleno, fenantreno, tricloroetileno, dicloroetileno, cloruro de vinilo y mezclas de compuestos alifáticos clorados (Canada y col., 2002). Basados en ese reporte es posible pensar que la TOM haya sido activada en las columnas adicionadas con tolueno y sea una de las enzimas responsables de la degradación de ácido.

Otra estudio describe la activación de monoxigenasas para degradación de propano con *Arthrobacter sp.*, utilizando *o*-ftalato como cosubstrato (Merkel y Perry, 1977). El mismo estudio reporta al *n*-heptano como un cosubstrato que favorece la

co-oxidación de malatión debido a que el ataque inicial del cosustrato es realizada por una oxigenasa molecular y por el contrario la glucosa no favoreció la degradación y mineralización debido a que su ruta metabólica no involucra dicha enzima. Sin embargo, se requieren experimentos para determinación de actividades enzimáticas para poder concluir al respecto.

4.1.6. Conclusiones parciales

Los resultados con el consorcio bacteriano mostraron que el fenantreno fue consumido más rápidamente y mayormente mineralizado cuando se adicionó tolueno.

En experimentos de columnas empacadas en 190 h, se observó que la degradación de fenantreno no fue completa, acumulándose el 38% del carbono como un intermediario, el ácido ftálico, y mineralizando 39%. El tratamiento propuesto con adición de tolueno como cosustrato gaseoso, permitió el consumo más rápido de fenantreno (la tasa máxima de consumo de fenantreno fue 40% más alta). Pero el principal efecto del tolueno fue sobre la mineralización, incrementándola de 39% hasta 86%. Los análisis de las poblaciones establecidas al final de los experimentos, los experimentos con el isótopo ^{14}C y las cinéticas de degradación de ácido ftálico, permiten afirmar que estos efectos se debieron a la presencia de una población microbiana mas activa, es decir, una mayor capacidad de degradar el fenantreno y los metabolitos solubles (ácido ftálico). El efecto del tolueno, también puede ser debido a un incremento en la actividad enzimática debido a la utilización simultánea de los dos sustratos.

4.2. Degradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en columnas empacadas

4.2.1. Efecto de la adición de tolueno en la biodegradación de HTP

El tolueno fue también probado como cosustrato en los experimentos con suelo contaminado con hidrocarburos. Estos experimentos fueron realizados en el mismo sistema experimental de columnas empacadas. Se tomaron muestras de los reactores a los 20, 62 y 98 días. Después de 24 h, la degradación de tolueno fue superior al 99% y se mantuvo en ese nivel durante el resto del experimento. Este

porcentaje de eliminación corresponde a una capacidad de eliminación de tolueno de $2.3 \text{ g/m}^3_{\text{reactor}}/\text{h}$. En la Figura 4.14 se muestran los porcentajes de eliminación de HTP. Después de 20 días, no se observó una diferencia significativa en la degradación de los HTP en el control y la columna alimentada con tolueno. Después de 2 meses, 34% y 24% de hidrocarburos habían sido eliminados en la columna con tolueno y la columna control, respectivamente. Para el tiempo final, 3 meses, la columna adicionada con tolueno había eliminado 38% mientras que el control 35% de los HTP iniciales. La tasa de degradación obtenida como cantidad de HTP/kg eliminados por día es de $155 \text{ mg}_{\text{HTP}}/\text{kg}_{\text{ss}}/\text{d}$ es superior a las máximas tasas reportadas de 83 mg/kg/d y 0.2 mg/kg/d para diferentes tipos de suelos y concentraciones iniciales de HTP para tratamientos en mesocosmos y con atenuación natural, respectivamente (Salanitro y col., 1997; Toumi y col., 2003) pero inferior al reportado para un sistema de co-composteo para la remediación de suelo contaminado con hidrocarburos que reportó una eliminación alrededor de 50% (concentración inicial 47.8 g/kg) en 150 horas (Aguilera Vázquez, 1998).

El efecto de la adición de tolueno sobre la degradación de los hidrocarburos del suelo, puede ser atribuido, al igual que en el caso del fenantreno, a un incremento de biomasa en el sistema o a la activación de microorganismos o enzimas capaces de degradar los hidrocarburos o sus intermediarios. Sin embargo, los resultados sugieren que después de 3 meses, la tasa de reacción no era el proceso limitante sino que el proceso completo estaba limitado por transferencia de masa. Es posible también que al final del experimento los compuestos que quedaran fueran los más recalcitrantes. Un reporte de la biodegradación de HTP concluyó que el principal factor que afecta la extensión y tasa de la degradación es el tipo de contaminantes contenidos en la matriz del suelo (Huesemann, 1995). Mientras que, otras variables experimentales como la composición y tamaño de partícula del suelo, la adición de nutrientes y la cantidad de agua en el tratamiento no mostraron efectos significativos en la tasa y extensión de degradación de HTP (Huesemann, 1995). También está documentado (Bosecker y col., 1991) que durante la biodegradación de hidrocarburos de petróleo, las propiedades físicas del sistema, como la viscosidad, la densidad y el peso molecular se ven alterados afectando la tasa de degradación.

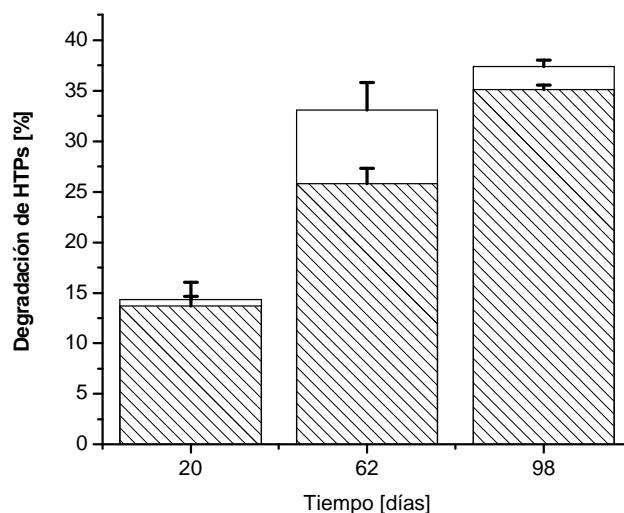


Figura 4.14. Degradación de HTP en columnas empacadas. (▨) Sin tolueno. (□) Con tolueno. Concentración inicial de HTP de 40 gHTP/kg_{ss}. La barra de error representa la desviación estándar de 4 réplicas.

4.2.2. Efecto de la adición de tolueno en la mineralización de HTP

La mineralización de los HTP, en estos experimentos se muestra en la Tabla 4.10. La producción de CO₂ de este experimento se muestra en el Anexo D.4. La cantidad de CO₂ producida por la degradación del tolueno fue tomada en cuenta para el cálculo de la mineralización de los HTP. Los valores integrados hasta 20 días, muestran una mineralización mayor para el control, esta diferencia puede ser atribuida a que, dado que no se utilizó inoculación, la población microbiana nativa requirió un período de adaptación al consumo del tolueno. Después de 62 días, la mineralización seguía siendo ligeramente superior en el control que en las columnas adicionadas con tolueno. Sin embargo, al día 98, tiempo final, 42% y 30% de los HTP iniciales fueron transformados en CO₂ con y sin la adición de tolueno, respectivamente. Estos valores son superiores a los reportados por un sistema de lodos con un pre-tratamiento con tolueno como solvente, se degradó 45.5% de los HTP iniciales y se mineralizó únicamente el 8% (García-Rivero y col., 2002).

Puesto que la degradación total de HTP fue similar a las 98 h, para las columnas tratadas sin tolueno y las columnas adicionadas, se puede afirmar que

después de un período de adaptación hubo una mayor transformación de los intermediarios cuando se degradó simultáneamente tolueno.

Tabla 4.10. Mineralización de HTP iniciales en columnas empacadas

	% Mineralización		
	20 días	62 días	98 días
Sin tolueno	13.08 ± 2.02	29.42 ± 1.12	30.81 ± 1.09
Con tolueno	9.93 ± 1.12	27.14 ± 1.7 ^c	42.83 ± 1.28 ^a

Valores integrados para 20, 62 y 98 días. Se asume que 90% de los HTP es carbono. Tolueno total adicionado en los 98 días fue 1.82 g. ^a Asumiendo mineralización completa del tolueno. El error representa la desviación estándar de 4 réplicas.

4.2.3. Efecto de la adición de tolueno sobre la población microbiana.

Durante la degradación de mezcla de HAP han sido reportados cambios en las poblaciones microbianas (Huesemann y col., 2002). Ese estudio concluye que en la fase inicial del tratamiento los HAP biodisponibles son consumidos, después la tasa de degradación disminuye significativamente y el proceso empieza a ser controlado por el transporte de masa hacia la fase líquida. La etapa de control por transporte continúa hasta que la fuente de carbono y energía, es decir los contaminantes, es tan pequeña que no puede sostener crecimiento y mantenimiento celular. Cuando el flux de contaminante está por debajo del umbral crítico, la población degradadora de HAP disminuirá lentamente hasta desaparecer completamente. Un estudio sobre la estructura y diversidad de la comunidad bacteriana dominante en el tratamiento de biorremediación de petróleo demostró que ésta cambia significativamente por la presencia de contaminantes y nutrientes (Macnaughton y col., 1999).

En la Figura 4.15 se muestra una clara diferenciación en las dos poblaciones establecidas al final del tratamiento. La mayor actividad, evaluada a partir de la producción de CO₂, indica la presencia de más biomasa en el tratamiento con tolueno.

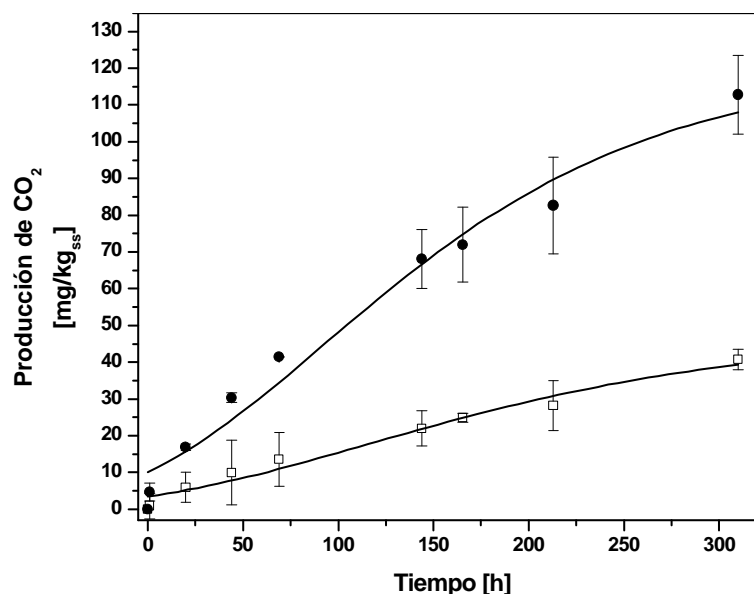


Figura 4.15. Producción de CO₂ en experimentos de microcosmos para muestras finales de suelo tratado en sistemas de columnas. (□) Población I: muestras de columnas sin tolueno. (●) Población II: muestras de columnas tratadas con tolueno. (—) Ajuste con modelo Gompertz. La barra de error representa la desviación estándar de 6 réplicas.

Los resultados obtenidos en la degradación de HTP y su mineralización pueden ser explicados mediante los siguientes mecanismos, el establecimiento de una población activa capaz de consumir los HTP iniciales biodisponibles y los intermediarios producidos; cuando los compuestos biodisponibles fueron agotados el proceso estaba controlado por transporte; Para el caso de la adición de tolueno la población microbiana fue mayor y durante esta última etapa dicha población fue mantenida por el consumo de tolueno. También es factible pensar que dada la variedad de compuestos presentes, tanto hidrocarburos iniciales como los compuestos intermediarios las relaciones de cometabolismo pudieron ser importantes para la degradación de los intermediarios y compuestos que inicialmente no estaban biodisponibles.

Los datos arrojados por el ajuste con el modelo Gompertz, para las muestras finales de suelo tratado se muestran en la Tabla 4.11. La tasa de producción máxima de CO₂ fue más del triple cuando se adicionó tolueno. Este resultado indica que la cantidad de biomasa presente en el sistema fue significativamente superior cuando se

adicionó tolueno. Sin embargo, ésto no se vio reflejado directamente en una diferencia igualmente significativa en la degradación o en la mineralización. Debido, probablemente, a que los microorganismos desarrollados no eran los indicados para degradar los compuestos biodisponibles como está documentado en la literatura (Merkel y Perry, 1977). La otra posible explicación, como ya se discutió, puede ser debida a una limitación por transporte.

Tabla 4.11. Parámetros A, t_c y K del modelo Gompertz para la producción de CO_2 en experimentos de columnas de las muestras finales

	A	K	R^2	$V_{\max}=0.368Af$	t_c
Producción de CO_2	($\text{mg}/\text{kg}_{\text{ss}}$)	(h^{-1})	(-)	($\text{mg}/\text{kg}_{\text{ss}}/\text{h}$)	(h)
Sin tolueno	47.71	0.0084	0.97	0.15	114.4
Con tolueno	121.20	0.0099	0.98	0.44	91.92

R^2 es el coeficiente de correlación.

4.2.4. Conclusión parcial

La degradación de HTP en el sistema de tratamiento propuesto con la adición de tolueno como cosustrato gaseoso, permitió degradar el 38% de HTP mientras que en el control sin tolueno se degradó el 35% en 98 días. Por otro lado, la mineralización fue 50% mayor para el tratamiento con tolueno. Con el método de cuantificación total de hidrocarburos por extracción utilizado no es posible establecer diferencias en los compuestos presentes al final del tratamiento. Sin embargo, la mayor mineralización con la presencia de tolueno hace suponer que efectivamente existe una diferencia cualitativa entre ambos tratamientos. El hecho de que, después de 3 meses, se observara una mayor presencia de microorganismos cuando se adicionó tolueno no permite explicar las eliminaciones similares para ambos tratamientos. Por un lado, puede deberse a limitaciones intrínsecas de la población, que aunque mas abundante, no tenía las capacidades de degradar los hidrocarburos restantes. Además, es posible que al final del experimento los compuestos que quedan fueran los más recalcitrantes. Estudios durante la restauración en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo han demostrado que los cambios en la composición de los hidrocarburos durante la degradación son importantes y que

algunas fracciones permanecen inalterables aún después de largos tiempos de tratamiento (Salanitro y col., 1997). Por otro lado, es posible que el proceso completo se encontrara controlado por transferencia de masa y no por la tasa de reacción.

4.3. Discusión General

La tasa y extensión de la biodegradación de hidrocarburos, son afectadas por numerosos factores. La naturaleza hidrofóbica de los hidrocarburos favorece que preferencialmente se queden adsorbidos en la materia orgánica del suelo y por ende las concentraciones en la fase líquida son bajas. Esta característica afecta las tasas de degradación, ya que es en la fase líquida donde se lleva a cabo el ataque microbiano. A los problemas de biodisponibilidad, se suman las capacidades intrínsecas de los microorganismos para degradar los contaminantes. Algunos estudios han demostrado que el incremento en la disponibilidad de los HAP en la fase acuosa por la adición de surfactantes no incrementa la biodegradación de los contaminantes (Dean y col., 2001). Lo anterior indica que el problema de la degradación no es necesariamente debido a limitaciones en el transporte sino que puede deberse a la reacción biológica.

La degradación incompleta de hidrocarburos, resulta en la acumulación de metabolitos que pueden ser aún más tóxicos que las moléculas contaminantes que los generan. Algunas propuestas para resolver este problema es la adición de microorganismos capaces de degradar dichos metabolitos (Kazunga y Aiken, 2000). Sin embargo, la bioaumentación enfrenta otros problemas como son la adaptación de los microorganismos y la competencia con las poblaciones nativas.

La adición de un cosustrato gaseoso como estrategia para mejorar la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos fue evaluada en esta tesis. Los resultados presentados y discutidos permiten esquematizar los mecanismos que intervienen en el proceso tal como se muestra en la Figura 4.16. Los hidrocarburos se encuentran adsorbidos en la matriz de suelo y se disuelven en la fase líquida quedando biodisponibles para los microorganismos. Las primeras reacciones de biodegradación generan intermediarios que pueden ser volátiles o permanecer disueltos en la fase líquida y ser eventualmente mineralizados. Cuando

se adiciona el cosustrato, en este caso el tolueno, éste supe aporta una fuente de carbono extra que puede ser utilizada para el mantenimiento o incluso en la producción de biomasa. Los resultados obtenidos muestran que si la biomasa favorecida es la adecuada, se puede propiciar un mayor consumo de hidrocarburos y de los intermediarios solubles producidos. A su vez, este mayor consumo de hidrocarburos resulta en un mayor gradiente de concentración entre los compuestos adsorbidos y la fase líquida, favoreciendo el transporte de éstos a la fase líquida. Por otro lado, el consumo de los intermediarios, permite que la degradación se extienda y evita problemas de inhibición por la presencia de dichos compuestos. Otro posible efecto del cosustrato son las relaciones de cometabolismo entre el tolueno y los hidrocarburos; entre los hidrocarburos y los intermediarios y; entre el tolueno y los intermediarios. El cosustrato también puede afectar los coeficientes de partición de los contaminantes. Sin embargo, en el caso de fenantreno no se observó ningún efecto sobre su solubilización del fenantreno ya que las concentraciones de tolueno utilizadas fueron muy bajas.

El planteamiento de ecuaciones matemáticas que describan las relaciones entre los mecanismos permite representar de manera efectiva el efecto del cosustrato en la degradación de los contaminantes y predecir el comportamiento del sistema. En el siguiente capítulo se plantea un modelo matemático para el proceso de biodegradación con cosustrato.

En el caso de la utilización de tolueno, su efecto se verá limitado a los compuestos en cuyas reacciones de degradación intervengan microorganismos degradadores de tolueno o enzimas producidas durante su degradación. Es posible pensar que un compuesto con una estructura química diferente a la del tolueno favorecerá la degradación de otro grupo de compuestos. Siguiendo esta lógica, es posible proponer un sistema de tratamiento donde se adicionaran diferentes moléculas, ya sea en forma simultánea o consecutiva, para aumentar la degradación y extensión de diferentes grupos de hidrocarburos.

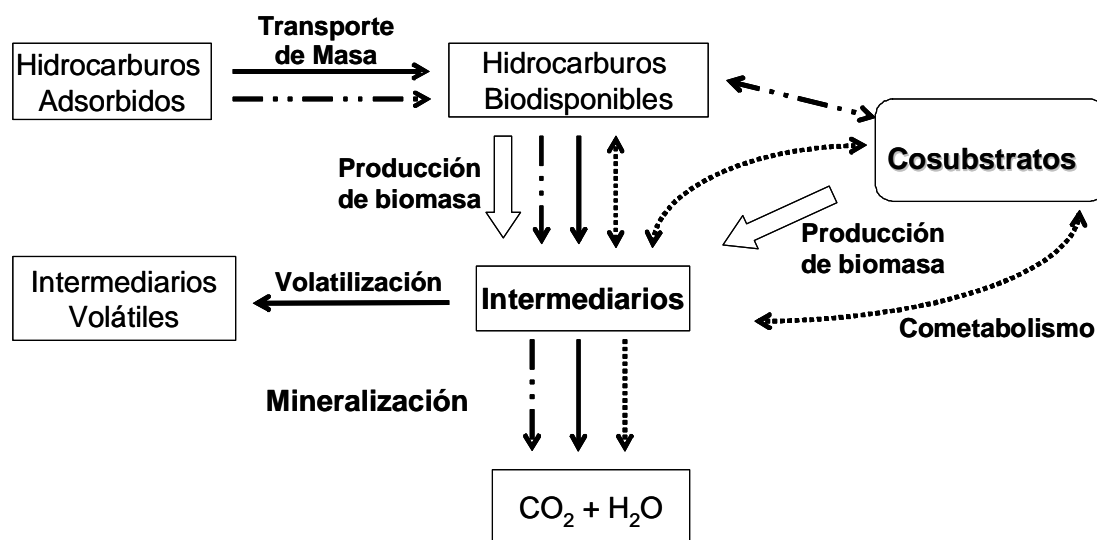


Figura 4.16. Mecanismos propuestos para la degradación de hidrocarburos en un sistema con adición de cosubstrato. \longrightarrow Ruta normal. \dashrightarrow Efecto del cosubstrato. $\cdots\cdots\rightarrow$ Efectos cometabólicos.

Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con adición de un cosubstrato gaseoso es una estrategia efectiva para favorecer la biodegradación en suelos de hidrocarburos y posiblemente otros contaminantes. Una evaluación de la combinación de biopilas y biofiltros para tratar suelos contaminados con hidrocarburos (Lie y col., 1994) concluye que este tratamiento integrado resultaría seguro, no generaría desechos líquidos y estima que el costo aproximado del proceso sería entre 50 y 90 USD por metro cúbico de suelo tratado.

Para poner en perspectiva la viabilidad del proceso se debe tomar en cuenta varios aspectos, uno de ellos sería las tasas de eliminación de contaminantes. En este trabajo, para fenantreno se tuvo una tasa eliminación de $4.16 \text{ g/m}^3_{\text{reactor}}/\text{h}$. Dicho valor se calculó a partir de la tasa de consumo de fenantreno (Tabla 4.4). Las tasas de eliminación reportados en la literatura para fenantreno en diferentes reactores y con diferentes tratamientos muestran los siguientes valores expresadas en cantidad de contaminante eliminado por volumen de reactor por unidad de tiempo ($\text{g/m}^3_{\text{reactor}}/\text{h}$). Para tratamientos de electro-remediación, usando solvente como fase móvil, 0.016 (Li y col., 2000); Para un reactor empacado donde el fenantreno es alimentado en fase

líquida, 0.08 (Guieysse y col., 2000); para cultivos líquidos adicionando surfactantes, 0.46 (Guerin y Jones, 1988); en un reactor bifásico, 0.47 (Guieysse y col., 2001); para reactores de lodos donde el suelo fue pre-tratado con acetona, 4.125 (Lee y col., 2001); Como se aprecia los resultados obtenidos son superiores a los reportados y solo es comparable al obtenido con pre-tratamiento con acetona. Sin embargo, las cantidades de los químicos adicionados a los tratamientos también es un parámetro interesante para compararlos, tanto desde el punto de vista económico como ambiental. En el trabajo reportado por Lee y col., 2001, se adicionaron 118.925 g_{acetona} por gramo de fenantreno eliminado mientras que en este trabajo utilizando tolueno como cosustrato se adicionaron 0.375 g_{tol} por gramo de fenantreno eliminado. Además, el tolueno adicionado fue completamente eliminado sin provocar desechos contaminantes. Algunos tratamientos de oxidación de fenantreno con ozono adicionaron 16, 41 y 55 g_{ozono} para eliminar un gramo de fenantreno (Nam y Kukor, 2000; Choi y col., 2001; Zeng y Hong, 2002). Estudios con surfactantes reportan la adición 1g de Tween 60 para eliminar 1 gramo de fenantreno.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN II. Modelado matemático

En este capítulo se plantea un modelo teórico de difusión-reacción de los sustratos dentro de la biopelícula para la comprensión y descripción del problema. Para hacer una interpretación matemática de las cinéticas obtenidas en los experimentos en columnas para la degradación de fenantreno y el efecto del tolueno como cosustrato gaseoso se resolvió una simplificación del modelo teórico. Se presentan los resultados obtenidos con este modelo simplificado.

5.1. Descripción del sistema

El sistema de estudio es heterogéneo y consta de tres fases tal como lo muestra la Figura 5.1. Una fase gaseosa móvil saturada en agua que proporciona el O_2 necesario para la actividad microbiana. La fase gaseosa también contiene el sustrato adicional, metabolitos volátiles, CO_2 y nitrógeno. La fase líquida, está compuesta por el agua del sistema, en esta fase se encuentran los nutrientes inorgánicos y los microorganismos. Los contaminantes y el oxígeno se deberán transportar hasta la fase líquida para que se efectúe la degradación. Eventualmente la fase líquida puede contener metabolitos solubles. La fase sólida está constituida por las partículas de suelo contaminado, que a su vez está formado por materia orgánica, arena y arcilla y otros componentes. El contaminante se encuentra adsorbido en el suelo. Las partículas de material o agente abultante también forman parte de la fase sólida.

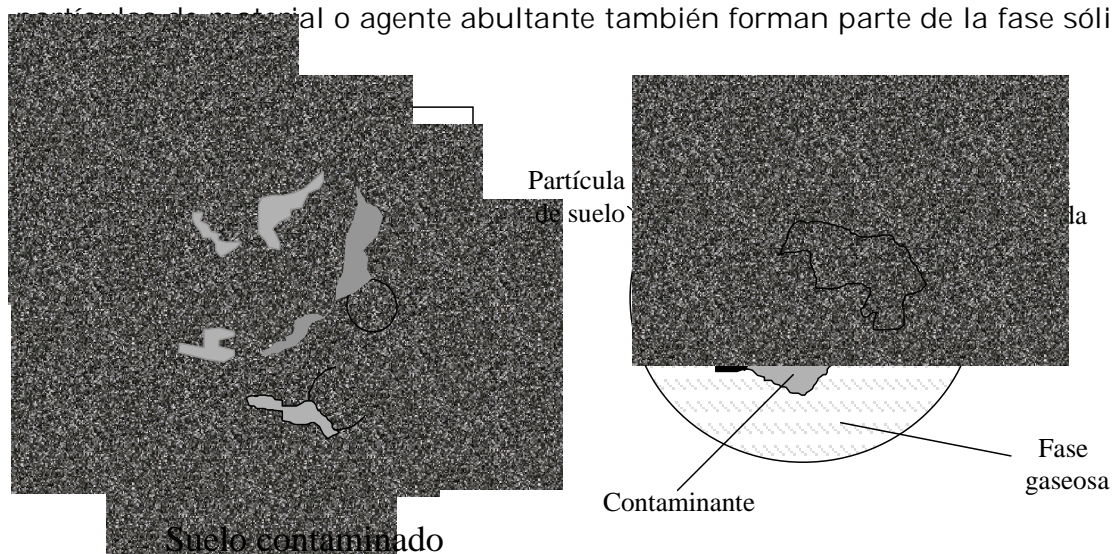


Figura 5.1. Constituyentes del sistema.

Una serie de fenómenos se llevan a cabo dentro del sistema multifásico; éstos se pueden agrupar en tres grandes grupos relacionados con los cambios de fase de los contaminantes (*i.e* volatilización, disolución), con el transporte de materia (*i.e* difusión, adsorción, desorción) y con las reacciones biológicas.

La distribución de los contaminantes orgánicos en el suelo puede ser afectada tanto por factores cinéticos como por el equilibrio termodinámico. Los procesos cinéticos incluyen flujo a través de canales y poros en la estructura sólida, difusión hacia poros cerrados y materia orgánica y degradación por reacciones biológicas y abióticas. La adsorción de los contaminantes en el suelo es crucial para su disponibilidad para los microorganismos. La capacidad del suelo para retener los contaminantes depende de la adsorción en las superficies minerales y la proporción de materia orgánica del suelo. A bajos contenidos de humedad, los sólidos tienen altas capacidades de sorción de los contaminantes con isothermas no-lineales características de adsorciones multicapa, mientras que en suelos saturados con agua relaciones lineales son observadas (Willumsen y col., 1997).

El fenantreno y el antraceno, a altas concentraciones en el suelo, pueden estar en forma cristalina en la matriz sólida o como gotas líquidas formando una fase diferente dentro de la fase sólida (Willumsen y col., 1997). En suelos compactos, la biodegradación ocurre en las fases de agua libre y las fronteras, la mayor contribución se debe a los microorganismos inmovilizados en el suelo, mientras que los microorganismos suspendidos en agua es pequeña debido al bajo contenido de agua. Se ha demostrado (Grimberg y col., 1996) que algunas especies como *Pseudomonas stutzeri P16*, no interactúan con el fenantreno en cristales y únicamente son capaces de degradar el fenantreno solubilizado. En esta tesis se considera que el contaminante que se encuentra sorbido en la fase sólida, se difunde por gradientes de concentración hacia la superficie de las células donde se lleva a cabo su degradación en la biopelícula formada en la fase líquida.

5.2. Planteamiento del modelo

Una primera aproximación al modelamiento matemático para el sistema de degradación de suelos contaminados con hidrocarburos con la adición de cosustrato

gaseoso se plantea a continuación. Este modelo teórico describe de manera local el transporte y degradación del fenantreno, ácido ftálico y del tolueno dentro de una biopelícula. Debido a la complejidad del sistema éste modelo plantea de manera idealizada los fenómenos, tal como se muestra en la Figura 5.2.

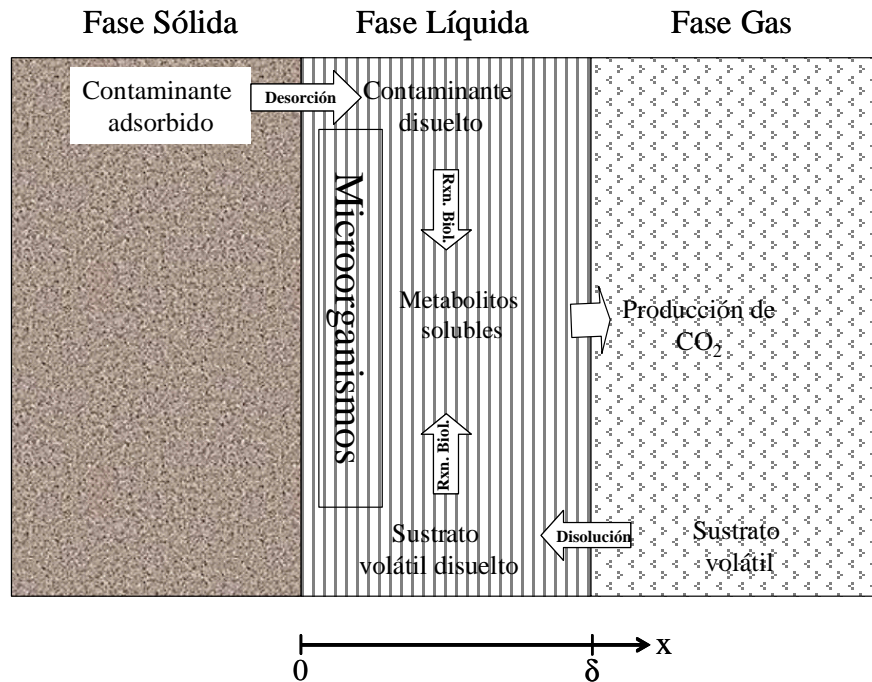


Figura 5.2. Esquematación de los procesos descritos por el modelo teórico.

El modelo toma en cuenta la difusión y disolución de los contaminantes dentro de la biopelícula, así como, las reacciones biológicas de degradación.

Los fenómenos descritos por el modelo son los siguientes:

A. A nivel físico-químico:

- La disolución y difusión de fenantreno en la fase líquida
- La disolución y difusión de tolueno en la fase líquida

B. A nivel biológico:

- La transformación de fenantreno en ácido ftálico
- El consumo de ácido ftálico
- La degradación de tolueno

5.3. Hipótesis del modelo

Las consideraciones del modelo son:

1. Se utilizan coordenadas planas.
2. La biodegradación se lleva a cabo dentro de la biopelícula.
3. La biopelícula es ideal, es decir, tiene una distribución no segregada de los microorganismos.
4. El sistema es isotérmico.
5. La difusión de los sustratos dentro de la biopelícula se describe por la ley de Fick.
6. Los coeficientes de difusión de los sustratos son constantes.
7. La concentración del tolueno en la fase líquida está en equilibrio con la fase gaseosa por medio de un coeficiente de partición relacionado con la constante de Henry.
8. El tolueno disuelto en la biopelícula no se transporta hacia la fase sólida.
9. La distribución del fenantreno adsorbido en el suelo es homogénea y forma una fina capa y en contacto con la biopelícula.
10. El transporte de fenantreno en la interfase sólido-líquido se representa un coeficiente global.
11. Se desprecia la volatilización de ácido ftálico y fenantreno, dada su baja presión de vapor (Tabla 1.6).
12. La reacción de degradación del fenantreno está dada por una cinética acelerada por la presencia de tolueno e inhibida debido a la acumulación de ácido ftálico.
13. La reacción de degradación del tolueno está dada por una cinética tipo Monod. No se considera la inhibición por altas concentraciones.
14. La reacción de degradación de ácido ftálico se favorece por el tolueno.

5.4. Balances locales de materia

5.4.1. Balance de fenantreno

El balance de masa al interior de la biopelícula para fenantreno, se escribe como:

$$\frac{\partial[\text{Fen}]_l}{\partial t} = D_{\text{eff Fen}} \frac{\partial^2[\text{Fen}]_l}{\partial x^2} - R_{\text{Fen}} \quad (5.1)$$

Donde, $[\text{Fen}]_l$ es la concentración fenantreno en la fase líquida; $D_{\text{eff Fen}}$ es el coeficiente de difusión efectivo para el fenantreno en la biopelícula y R_{Fen} es la expresión cinética de degradación para fenantreno. R_{Fen} es función de las concentraciones de biomasa, fenantreno, tolueno y ácido ftálico en la biopelícula.

$$R_{\text{Fen}} = f([X], [\text{Fen}]_l, [\text{Tol}]_l, [\text{Fta}]_l) \quad (5.2)$$

Las condiciones de frontera para la Ecuación (5.1) son:

$$\text{En } x = 0 \quad \frac{\partial[\text{Fen}]_l}{\partial x} = H([\text{Fen}]_l^{\text{eq}} - [\text{Fen}]_l) \quad (5.3)$$

$$\text{En } x = \delta \quad \frac{\partial[\text{Fen}]_l}{\partial x} = 0 \quad (5.4)$$

Donde δ es el espesor de la biopelícula; H es el coeficiente global de transporte; $[\text{Fen}]_l^{\text{eq}}$ es la concentración al equilibrio sólido-líquido y corresponde a la solubilidad máxima del fenantreno.

La condición inicial es:

$$\text{En } t = 0 \quad [\text{Fen}]_l(x, 0) = [\text{Fen}]_l = 0 \quad (5.5)$$

5.4.2. Balance de tolueno

Asumiendo que la difusión del tolueno al interior de la biopelícula es constante, el balance de materia en la fase líquida se escribe como:

$$\frac{\partial[\text{Tol}]_l}{\partial t} = D_{\text{eff Tol}} \frac{\partial^2[\text{Tol}]_l}{\partial x^2} - R_{\text{Tol}} \quad (4)$$

Donde, $[\text{Tol}]_l$ es la concentración de tolueno en la biopelícula; $D_{\text{eff Tol}}$ es el coeficiente de difusión efectiva de tolueno en la biopelícula y R_{Tol} es la cinética de reacción tipo Monod para tolueno, que se escribe como:

$$R_{\text{Tol}} = \frac{X \cdot k_{\text{Tol}}}{Y_{\text{Tol}}} \frac{[\text{Tol}]_l}{K_{\text{Tol}} + [\text{Tol}]_l} \quad (5)$$

k_{Tol} es la constante de reacción para tolueno; Y_{Tol} es el rendimiento celular de tolueno; K_{Tol} es la constante de Monod para tolueno;

Las condiciones de frontera para la ecuación (5.6) son:

$$\text{En } x = 0 \quad \frac{\partial[\text{Tol}]_l}{\partial x} = 0 \quad (6)$$

$$\text{En } x = \delta \quad [\text{Tol}]_l = [\text{Tol}]_g / m \quad (7)$$

Donde, $[\text{Tol}]_g$ es la concentración de tolueno en la fase gaseosa y m es el coeficiente de partición al equilibrio gas-líquido.

La condición inicial es:

$$\text{En } t = 0 \quad [\text{Tol}]_l(x,0) = [\text{Tol}]_l^0 = 0 \quad (8)$$

Donde, $[\text{Tol}]_l^0$ es la concentración inicial de tolueno en la fase líquida.

5.4.3. Balance de ácido ftálico

$$\frac{\partial [Fta]_l}{\partial t} = D_{\text{eff}_{Fta}} \frac{\partial^2 [Fta]_l}{\partial x^2} + P_{Fta} - R_{Fta} \quad (5)$$

Donde, $[Fta]_l$ y $D_{\text{eff}_{Fta}}$ son la concentración y el coeficiente de difusión efectiva de ácido ftálico en la biopelícula, respectivamente; P_{Fta} es la producción de ácido ftálico, Ecuación (5.12), que es proporcional a la cantidad de fenantreno consumido; R_{Fta} es la tasa de consumo de ácido ftálico, Ecuación (5.13), y es una función de las concentraciones de biomasa, fenantreno, tolueno y ácido ftálico en la biopelícula.

$$P_{Fta} = \infty R_{Fen} \quad (5)$$

$$R_{Fta} = f([X]_l, [Fta]_l, [Fen]_l, [Tol]_l) \quad (5)$$

Las condiciones de frontera para la ecuación (5.11) son:

$$\text{En } x = 0 \quad \frac{\partial [Fta]_l}{\partial x} = 0 \quad (5)$$

$$\text{En } x = \delta \quad \frac{\partial [Fta]_l}{\partial x} = 0 \quad (5)$$

La condición inicial para la ecuación (5.11) es:

$$\text{En } t = 0 \quad [Fta]_l(x, 0) = 0 \quad (5)$$

Para la resolución del sistema de ecuaciones diferenciales parciales (Ecuaciones 5.1 a 5.16) se requiere de la evaluación de parámetros tales como las difusividades efectiva de los substratos, fluxes y coeficientes de transporte y cinéticos. La solución numérica involucra la adimensionalización de las ecuaciones y la discretización en el espacio para las ecuaciones diferenciales parciales utilizando un método como el de diferencias finitas (Finlayson, 1980). Así, el sistema de ecuaciones

diferenciales ordinarias puede ser integrado en el tiempo con un método numérico como el de Runge-Kutta.

5.5. Balance macroscópico

Una vez encontrados los perfiles al interior de la biopelícula para poder pasar a la escala macro, es decir, las columnas empacadas, se requiere hacer balance macroscópico que implica el área de transferencia. Debido a la complejidad y heterogeneidad del ambiente del suelo, es difícil predecir con precisión el transporte y degradación del contaminante. El área superficial de transferencia para el suelo fue calculada en $1684 \text{ m}^2/\text{m}^3$ considerando una geometría esférica de las partículas de suelo. Puesto que parámetros como el espesor de biopelícula, la difusión al interior de los sustratos no fueron medidos se requeriría de una estimación basada en el ajuste de los datos experimentales o en datos publicados en la bibliografía al respecto. Sin embargo, para no hacer un ajuste paramétrico con tanta incertidumbre y en vista de que las mediciones que se realizaron fueron globales de entrada y salida se decidió optar por un enfoque volumétrico en donde los coeficientes globales de reacción engloben los fenómenos involucrados en la degradación.

5.6. Modelo matemático simplificado

Simplificaciones y consideraciones:

- a) Se considera únicamente las reacciones para representar el comportamiento en las columnas empacadas. Las constantes cinéticas de reacción engloban los fenómenos involucrados en el proceso.
- b) Para la concentración del fenantreno en la interfase sólido-líquido, se considera el equilibrio. La concentración en dicho punto es igual a la concentración máxima de disolución del fenantreno en el agua; los experimentos de disolución de fenantreno mostrados en la Sección 4.1.1. permiten hacer esta consideración.
- c) No hay producción de CO_2 debida al consumo de fenantreno. El fenantreno consumido produce ácido ftálico y biomasa.

- d) De acuerdo con los resultados experimentales se considera que 88% del ácido ftálico consumido es mineralizado y el resto utilizado para la formación de biomasa (Tabla 4.9).
- e) Degradación completa de tolueno. Consumo constante e igual a la carga alimentada.
- f) De acuerdo con la Tabla 4.1 se consideró que 90% del tolueno consumido fue mineralizado y el resto utilizado en la producción de biomasa.

5.6.1. Balance de fenantreno

El balance global de fenantreno en el sistema es:

$$\frac{d[\text{Fen}]}{dt} = -R_{\text{Fen}} \quad (5)$$

La cinética de reacción está dada por la Ecuación 5.18, el primer término toma en cuenta la inhibición por la presencia de ácido ftálico. Donde, X es la biomasa; K_1 es la constante global de reacción de fenantreno; K_{Fen} es la constante de Monod para fenantreno; K_{Fta} es la constante de inhibición por ácido ftálico. Mientras que el segundo término pondera la degradación acelerada en presencia de tolueno mediante una constante de reacción de fenantreno K_{TolFen} , la concentración de tolueno al equilibrio $[\text{Tol}]^{\text{eq}}$, y una relación cuadrática normalizada de la concentración de fenantreno.

$$R_{\text{Fen}} = X \cdot K_1 \left(\frac{[\text{Fen}]}{\left(K_{\text{Fen}} + [\text{Fen}] + \frac{[\text{Fta}]^2}{K_{\text{Fta}}} \right)} + [\text{Tol}]^{\text{eq}} \cdot K_{\text{TolFen}} \frac{[\text{Fen}]}{[\text{Fen}]_{\text{ini}}^2} \right) \quad (5)$$

La condición inicial de la Ecuación 5.18 es:

$$\text{En } t = 0 \quad [\text{Fen}] = [\text{Fen}]_{\text{s}}^{\text{inicial}} \quad (5)$$

5.6.2. Balance de tolueno

El balance de tolueno asumiendo consumo constante de tolueno igual a la carga de tolueno se escribe como:

$$\frac{d[\text{Tol}]}{dt} = 0 \quad (5)$$

$$R_{\text{Tol}} = \text{Tol}_{\text{carga}} \quad (5)$$

$$\text{En } t = 0 \quad \frac{d[\text{Tol}]}{dt} = R_{\text{Tol}} \quad (5)$$

5.6.3. Balance de ácido ftálico

El balance de ácido ftálico es la diferencia entre lo que se produce y lo que es consumido:

$$\frac{d[\text{Fta}]}{dt} = P_{\text{Fta}} - R_{\text{Fta}} \quad (5)$$

La producción de ácido ftálico está dada por la cantidad de fenantreno consumido multiplicada por el coeficiente estequiométrico A , calculado a partir de la Ecuación de oxidación 5.31

$$P_{\text{Fta}} = A \cdot X \cdot K_1 \left(\frac{[\text{Fen}]}{\left(K_{\text{Fen}} + [\text{Fen}] + \frac{[\text{Fta}]^2}{K_{\text{Fta}}} \right)} + [\text{Tol}]^{\text{eq}} \cdot K_{\text{TolFen}} \frac{[\text{Fen}]}{[\text{Fen}]_{\text{ini}}^2} \right) \quad (5)$$

El consumo de ácido ftálico está dado por la Ecuación 5.25. En donde, el primer término representa el consumo de ácido ftálico con una inhibición por el mismo ácido ftálico y en función de la relación normalizada de la raíz cuadrada de la

concentración de fenantreno. K_2 y K_3 son constantes de reacción de ácido ftálico.

K_{TolFta} es la constante de reacción de ácido ftálico en presencia de tolueno.

$$R_{Fta} = X \cdot K_2 \cdot [Fta] \cdot \left(\frac{K_3}{(1 + [Fta])} \frac{[Fen]^{1/2}}{[Fen]_{inicial}^{1/2}} + (K_{TolFta} \cdot [Tol]) \right) \quad (5)$$

La condición inicial para la Ecuación 5.25 es:

$$\text{En } t = 0 \quad [Fta] = 0 \quad (5)$$

5.6.4. Balance de CO₂

La producción de CO₂ es una ecuación dependiente, y está dada por el consumo de ácido ftálico y de tolueno.

$$\frac{d[CO_2]}{dt} = Y_{CO_2}^{Fta} \cdot B \cdot R_{Fta} + Y_{CO_2}^{Tol} \cdot C \cdot F \quad (5)$$

Donde, $Y_{CO_2}^{Fta}$ y $Y_{CO_2}^{Tol}$ son los rendimientos de CO₂ para ácido ftálico y tolueno respectivamente. Mientras que B y C son los coeficientes estequiométricos de las reacciones 5.32 y 1.2, respectivamente.

La condición inicial de la Ecuación 5.27, es:

$$\text{En } t = 0 \quad [CO_2] = 0 \quad (5)$$

5.6.5. Balance de biomasa

Por su parte la biomasa producida se calculó como el balance, es decir, como las cantidades faltantes de los consumos de los substratos y considerando una composición de biomasa dada por el factor de conversión D:

$$\frac{d[X]}{dt} = D \cdot \left(Y_X^{Fen} \cdot R_{Fen} + (1 - Y_{CO_2}^{Fta}) \cdot R_{Fta} + (1 - Y_{CO_2}^{Tol}) \cdot F \right) \quad (5)$$

La condición inicial es la cantidad de inóculo alimentada.

$$\text{En } t = 0 \quad [X] = [X]_{inicial} \quad (5)$$

5.6.6. Constantes

Las constantes utilizadas en la solución del sistema de ecuaciones son:

a) Concentración de tolueno:

$$[\text{Tol}]_1^{\text{eq}} = \frac{[\text{Tol}]_g}{0.27} = \frac{0.83}{0.27} = 3.074 \text{mg}_{\text{Tol}} / \text{L}$$

b) Carga de tolueno:

$$[\text{Tol}]_{\text{carga}} = 2.4 \text{mg}_{\text{Tol}} / \text{kg} / \text{h}$$

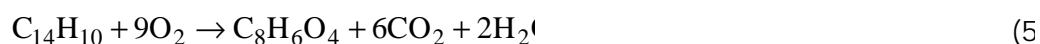
c) Los coeficientes estequiométricos:

$$A = 1.4 \text{mg}_{\text{Fta}} / \text{mg}_{\text{Fen}}$$

$$B = 2.16 \text{mg}_{\text{CO}_2} / \text{mg}_{\text{Fta}}$$

$$C = 3.34 \text{mg}_{\text{CO}_2} / \text{mg}_{\text{Tol}}$$

De acuerdo con las siguientes reacciones de oxidación



d) Factor de conversión D:

Se asume una composición de biomasa de 0.5 mg de carbono por mg de biomasa.

$$D = \frac{12 \text{mg}_{\text{Carbono}}}{44 \text{mg}_{\text{CO}_2}} \frac{2 \text{mg}_{\text{biomasa}}}{\text{mg}_{\text{Carbono}}} = 0.54 \text{mg}_{\text{biomasa}} / \text{mg}_{\text{CO}_2}$$

e) Rendimientos de CO₂:

De acuerdo a los resultados experimentales, Tabla 4.1 y Tabla 4.9

$$Y_{\text{CO}_2}^{\text{Fta}} = 0.88 \text{ y } Y_{\text{CO}_2}^{\text{Tol}} = 0.90$$

5.6.7. Integración

El sistema de ecuaciones diferenciales (Ecuaciones 5.17-5.30) se resolvió con el programa computacional Berkeley-Madonna v.8.0.1 (Macey&Oster, ©1997-2000). Dicho paquete utiliza el método Runge-Kutta semi-implícito de 4to. orden para integrar. El listado del programa se muestra en el Anexo E.

5.6.8. Ajuste paramétrico

Una vez calculadas las constantes del sistema se resolvió el modelo usando para la integración una tolerancia de 1×10^{-15} . Se ajustaron simultáneamente los datos experimentales de la degradación de fenantreno, la cinética de ácido ftálico y la producción de CO_2 para encontrar los valores de las constantes cinéticas. Los valores encontrados para el mejor ajuste simultáneo de las 3 variables se muestran en la Tabla 5.1. Una vez ajustados experimentales para el caso sin tolueno, se procedió a hacer el ajuste de los datos experimentales con la adición de tolueno. En este caso los únicos parámetros ajustados fueron las constantes K_{TolFta} y K_{TolFen} .

Tabla 5.1. Parámetros de ajuste del modelo simplificado
Parámetros

$K_1=0.22$
$K_2=1.59 \times 10^{-6}$
$K_3=32331.51$
$K_{\text{Fta}}=301360$
$K_{\text{Fen}}=1269.13$
$K_{\text{TolFta}}=12.65$
$K_{\text{TolFen}}=0.24$

Un análisis realizado en el paquete computacional Origin v7.0220 (OriginLab Corporation, ©1991-2002) indicó que los datos experimentales y los resultados del modelo no son significativamente diferentes con un nivel de confiabilidad de 0.05.

Los resultados obtenidos para el consumo de fenantreno con y sin la adición de tolueno se muestran en la Figura 5.3. La cinética de consumo de fenantreno se

representa correctamente con el modelo. Sin embargo, en el caso sin tolueno el modelo sobrestima la degradación después de 100 h.

La cinética de ácido ftálico y el ajuste con el modelo se muestran en la Figura 5.4. El modelo logra reproducir la acumulación de ácido ftálico sin la adición de tolueno. Sin embargo, cuando se adiciona tolueno los resultados experimentales muestran un valor base constante que el modelo no logra reproducir con las constantes utilizadas. Es importante recordar que el ajuste de los parámetros se hizo con los datos experimentales sin tolueno y posteriormente solo se ajustaron los 2 parámetros relacionados con el efecto del tolueno en la cinética de degradación de fenantreno y ácido ftálico, K_{TolFen} y K_{TolFta} , respectivamente. Un reajuste de todos los parámetros, para las cinéticas con la presencia de tolueno, arrojaba una mejor representación de los datos (datos no mostrados). Sin embargo, se optó por el enfoque donde los mismos parámetros ajustados fueron utilizados en el control y con la adición de tolueno. Valores diferentes de las constantes cinéticas se podría justificar bajo el argumento de poblaciones microbianas diferentes. Sin embargo, no se tiene evidencia a este respecto.

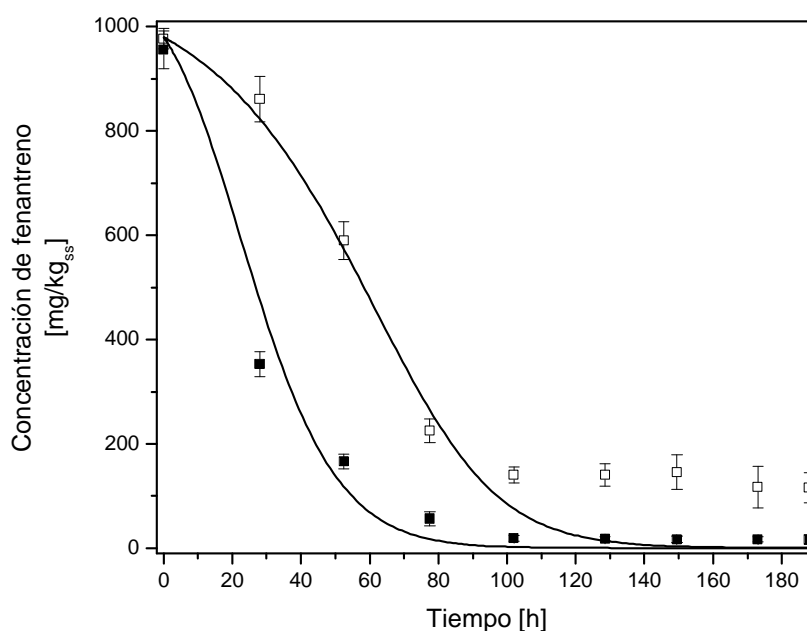


Figura 5.3. Consumo de fenantreno. Datos experimentales a) (□) Sin tolueno. b) (■) Con tolueno. (—) Modelo.

La Figura 5.5 compara los datos experimentales de producción de CO_2 con los datos arrojados por el modelo. El modelo sobrestima la producción de CO_2 en la parte inicial (hasta 50h) con y sin tolueno. En esta etapa la producción medida fue casi nula sin tolueno y baja en el caso de la adición de tolueno, a pesar de que el fenantreno estaba siendo consumido en ambos casos. Este comportamiento puede ser atribuido a una adaptación de población microbiana, a la acumulación de ácido ftálico cuya degradación se inició posteriormente o a un problema de sensibilidad en el equipo de medición. En el modelo fue tomada en cuenta únicamente la acumulación del ácido ftálico para explicar el comportamiento de la producción de CO_2 . Por lo que es probable que dicho comportamiento se deba también a alguna de las otras dos opciones.

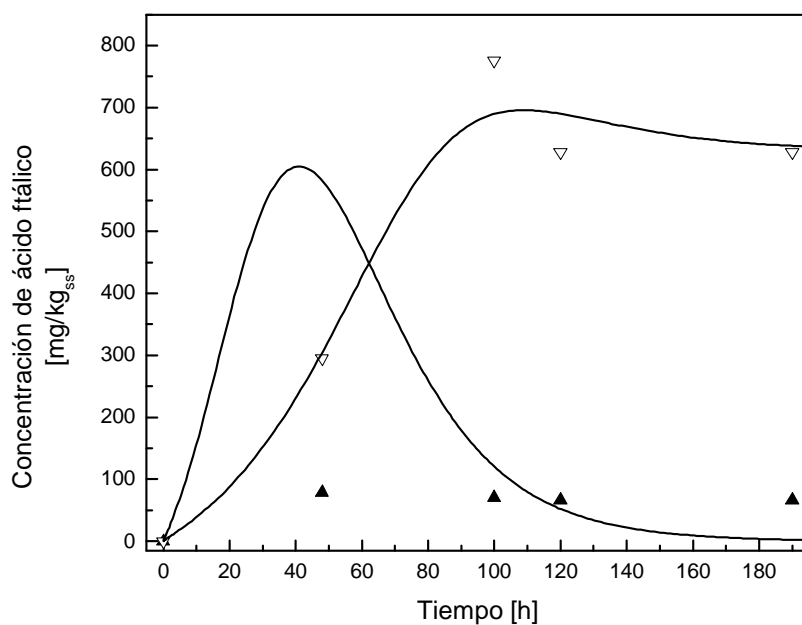


Figura 5.4. Consumo de ácido ftálico. Datos experimentales a) (Δ) Sin tolueno. b) (\blacktriangle) Con tolueno. (—) Modelo.

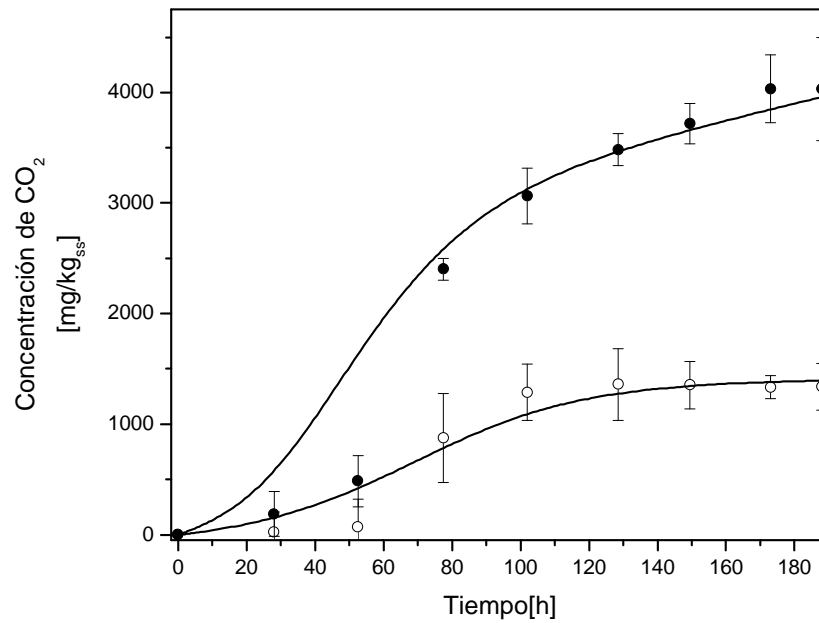


Figura 5.5. Producción de CO₂. Datos experimentales a) (○) Sin tolueno. b) (●) Con tolueno. (—) Modelo.

La Figura 5.6 muestra los resultados del modelo para la producción de biomasa. El modelo considera la producción de biomasa debido al consumo de fenantreno, tolueno y ácido ftálico por lo que se predice una mayor población microbiana con la adición de tolueno con un efecto de la presencia de tolueno y además de un mayor consumo de ácido ftálico.

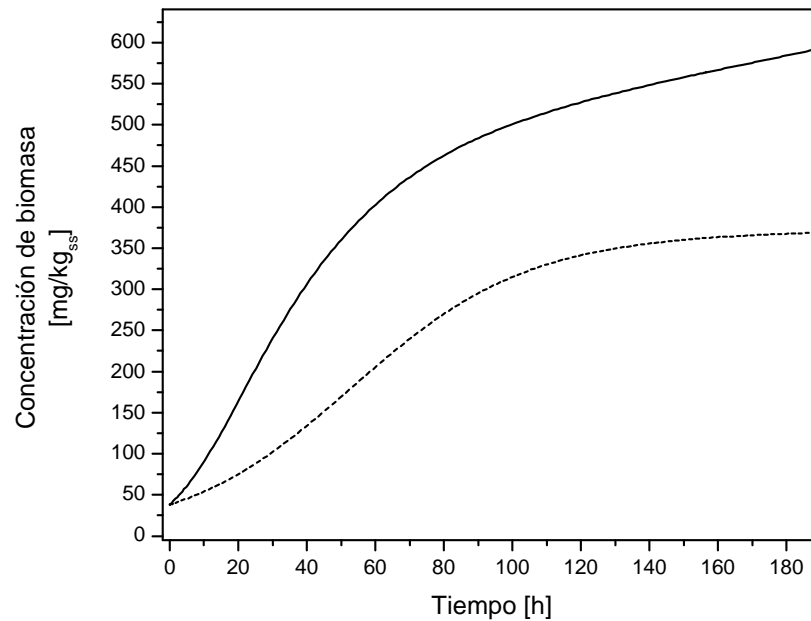


Figura 5.6. Estimación de la producción de biomasa con el modelo. a) (.....) Sin tolueno. b) (—) Con tolueno.

5.7. Conclusiones parciales

Los resultados obtenidos con modelo simplificado representan el comportamiento experimental obtenido en las columnas para la degradación de fenantreno con tolueno como cosubstrato. Este modelo simple permitió una representación matemática de los fenómenos que se llevan a cabo durante la degradación mediante el ajuste de 5 parámetros para el caso sin tolueno y 2 más para la cinética con tolueno. El modelo teórico queda planteado y requiere de otros estudios para la determinación de parámetros.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se propuso favorecer la biodegradación de hidrocarburos en suelos mediante el consumo de un cosustrato gaseoso más biodisponible. Una de las hipótesis de este trabajo es que la utilización simultánea de un cosustrato de más fácil asimilación permitiría una mayor actividad microbiana, incrementando la tasa de degradación del contaminante. Por otro lado, el consumo del cosustrato permitiría la producción de enzimas que intervienen en la degradación de moléculas con una estructura similar a la del cosustrato (*i.e.* otros contaminantes o metabolitos). Dichas hipótesis se evaluaron en el tratamiento de un suelo contaminado artificialmente con fenantreno (suelo modelo) y de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en un sistema de columnas empacadas utilizando poblaciones nativas y poblaciones previamente adaptadas al consumo de los compuestos.

El consumo del cosustrato (tolueno) y los hidrocarburos (fenantreno y HTP) se realizó de manera simultánea con las poblaciones microbianas utilizadas. Además, las bajas cantidades de tolueno adicionadas fueron completamente consumidas, evitando la generación de residuos gaseosos contaminantes.

Se observó que la biodegradación y mineralización de fenantreno en cultivos líquidos se vio afectada por la adición de tolueno. Para el caso del consorcio microbiano, dicho efecto es dependiente de la relación de carbono fenantreno-tolueno. Altas proporciones de tolueno inhibieron la mineralización. Mientras que bajas cantidades de tolueno favorecieron la degradación y mineralización de fenantreno. Los mejores resultados se obtuvieron a una relación de carbono 1:1. Para *T. versicolor* la degradación y la mineralización se vieron disminuidas en la presencia de tolueno. Ésto puede ser atribuido a una inhibición por tolueno o a las capacidades reducidas de los microorganismos para degradar los intermediarios.

En experimentos de columnas empacadas se observó que la biodegradación y mineralización de fenantreno con el consorcio microbiano se vieron favorecidas con la adición de tolueno. Se identificó al ácido ftálico como el principal intermediario, por lo cual se puede decir que el consorcio sigue preferentemente la ruta vía ftalato. La

acumulación de ácido ftálico en el tratamiento sin tolueno resultó en una mineralización reducida. Experimentos con fenantreno marcado (isótopo ^{14}C) permitieron evaluar la mineralización de fenantreno y comprobar la acumulación de intermediarios solubles en el tratamiento sin tolueno. Experimentos de la degradación de ácido ftálico con el consorcio demostraron que la tasa de degradación era considerablemente mayor en la presencia de tolueno. Por otro lado, la evaluación de la producción de CO_2 en microcosmos de las muestras finales de suelo provenientes de los tratamientos con y sin tolueno indicaron una mayor actividad microbiana para los suelos provenientes de las columnas adicionadas con tolueno.

En el tratamiento de suelos contaminados con HTP adicionando tolueno, durante la primera etapa del tratamiento, se incrementó la eliminación de HTP, al cabo de 3 meses, no hubo efecto de la adición de tolueno en la eliminación de HTP. Sin embargo, el efecto del tolueno sobre la mineralización fue significativo, indicando que la presencia de tolueno favoreció la eliminación de los metabolitos.

El modelo matemático simplificado representó de manera adecuada el efecto del tolueno sobre la degradación de fenantreno y del principal intermediario (ácido ftálico). La determinación de parámetros de transporte y cinéticos permitirá la profundización la interpretación del proceso mediante el modelado matemático.

Estudios de otras moléculas o grupos hidrocarburos como substratos primarios y otros cosubstratos quedan abiertos resultando una alternativa interesante para tratar de incrementar el alcance de la degradación. A nivel microbiológico el estudio e identificación de la o las enzimas responsables del mejoramiento de las tasas de degradación resulta sumamente interesante, abriendo las posibilidades de la inducción de dichas enzimas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuna-Askar, K., Englande, A. J., Hu, C. y Jin, G. (2000). Methyl tertiary-butyl ether (MTBE) biodegradation in batch and continuous upflow fixed-biofilm reactors. *Wat. Sci. Tech.* **42**: 153-161.
- Acuna-Askar, K., Englande, A. J., Ramírez-Medrano A., Coronado-Guardiola J.E. y Chavez-Gomez B. (2003). Evaluation of biomass production in unleaded gasoline and BTEX-fed batch reactors. *Wat. Sci. Tech.* **48**: 127-133.
- Acuña, M. E., Pérez, F., Auria, R. y Revah, S. (1999). Microbiological and kinetics aspects of a biofilter for the removal of toluene from waste gases. *Biotech. Bioeng.* **63**: 175-184.
- Aguilera Vázquez, L. (1998). Escalamiento de biorreactores para co-composteo de suelos contaminados con petróleo. *Tesis de Maestría en Biotecnología*: Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Alexander, M. (1994). Biodegradation and Bioremediation. San Diego, California, Academic Press Inc. 302 pp.
- Alvarez, P. J. J., Gronkhite, L. A. y Hunt, G. S. (1998). Use of benzoate to establish reactive buffer zones for enhanced attenuation of BTX migration: Aquifer column experiments. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 509-515.
- Amador-Muñoz, O., Delgado-Rodríguez, A., Villalobos-Pietrini, R., Munive-Colín, Z., Ortiz-Marttelo, R., Diaz-González, G., Bravo-Cabrera, J. L. y Gómez -Arroyo, S. (2001). Partículas suspendidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y mutagenicidad en el suoste de la Ciudad de México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **17**: 193-204.
- Arriaga, J. L., Martínez, G., Escalona, S., H., M. y Seila, R. (1994). Compuestos orgánicos volátiles en la atmósfera de la ZMCM. México D.F., El Colegio Nacional: 23- 38 pp.
- Baker, K. H. y Herson, D. S. (1994). Bioremediation. New York, Mc Graw-Hill. 360 pp.
- Barclay, C. D., Farquhar, G. F. y Legge, R. (1995). Biodegradation and sorption of polyaromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**: 958-963.
- Barnsley, E. A. (1983). Phthalate pathway of phenanthrene metabolism: formation of 2'-Carboxybenzalpyruvate. *J. Bacteriol.* **154**: 113-117.
- Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P. y Cerniglia, C. E. (1996). Metabolism of phenanthrene by white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2547-2553.
- Birman, I. y Alexander, M. (1996). Optimizing biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 267-272.
- Blackburn, J. W. (1998). Bioremediation scaleup effectiveness: A review. *Bioremediation J.* **I**: 265-282.
- Blackburn, J. W. y Hafker, W. R. (1993). The impact of biochemistry, bioavailability and bioactivity on the selection of bioremediation techniques. *Bioremediation* **11**: 328-333.

- Bogan, B. W., Lahner, L. M. y Paterek, J. R. (2001). Limited roles for salicylate and phthalate in bacterial PAH bioremediation. *Bioremediation J.* **5**: 93-100.
- Bogan, B. W., Schoenike, B., Lamar, R. T. y Cullen, D. (1996). Manganese peroxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2381-2386.
- Bosecker, K., Teschner, M. y Wehner, H. (1991). Biodegradation of crude oils. Diversity of environmental biogeochemistry. Development in Geochemistry, Amsterdam, Elsevier. 195-204.
- Bosma, T. N. P., Middeldorp, P. J. M., Schraa, G. y Zehnder, A. J. B. (1997). Mass transfer limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 248-252.
- Bouchez, M., Blanchet, D., Bardin, V., Haessler, F. y Vandecasteele, J.-P. (1999). Efficiency of defined strains and soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) mixtures. *Biodegradation* **10**: 429-435.
- Bouchez, M., Blanchet, D. y Vandecasteele, J.-P. (1995). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains and by defined strain associations: inhibition phenomena and cometabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43**: 156-164.
- Bouchez, M., Blanchet, D. y Vandecasteele, J.-P. (1996). The microbiological fate of polycyclic aromatic hydrocarbons: carbon and oxygen balances for bacterial degradation of model compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 556-561.
- Bramwell, D.-A. P. (2000). Effects of surfactants addition on the biomineralization and microbial toxicity of phenanthrene. *Biodegradation* **11**: 263-277.
- Brodkorb, T. S. y Legge, R. (1992). Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soil supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3127-3121.
- Bumpus, J. A. (1989). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 154-158.
- Canada, K. A., Iwashita, S., Shim, H. y Wood, T. K. (2002). Directed evolution of toluene *ortho*-monooxygenase for enhanced 1-naphthol synthesis and chlorinated ethene degradation. *J. Bacteriol.* **184**: 344-349.
- Carmichael, L. M. y Pffaender, F. K. (1997). Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in soil: relationship to soil characteristics and preexposure. *Environ. Tox. Chem.* **16**: 666-675.
- Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**: 351-368.
- Chen, G., Strevert, K. A. y Angela, V. (2001). Naphthalene, phenanthrene and surfactant biodegradation. *Biodegradation* **12**: 433-442.
- Chen, S.-H. y Aitken, M. D. (1999). Salicylate stimulates the degradation of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas saccharophila* P15. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 435-439.

- Cheung, P.-Y. y Kinkle, B. K. (2001). Mycobaterium diversity and pyrene mineralization in petrolium-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2222-2229.
- Choi, H., Kim, Y.-Y., Lim, H., Cho, J., Kang, J.-W. y Kim, K.-S. (2001). Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ozone in the presence of sand. *Wat. Sci. Technol.* **43**: 349-356.
- Chung, G.-Y., McCoy, B. J. y Scow, K. M. (1993). Criteria to assess when biodegradation is kinetically limited by intraparticle diffusion and sorption. *Biotech. Bioeng.* **41**: 625-632.
- Chung, N. y Alexander, M. (1998). Differences in sequestration and bioavailability of organic compound aged in dissimilar soils. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 855-860.
- Chung, N. y Alexander, M. (1999). Effect of concentration on sequestration and bioavailability of two polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* **33**: 3605-3608.
- Connell, D. W. (1997). Basic concepts of Environmental Chemistry. Boca Raton, Florida, Lewis Publishers. 506 pp.
- Corapcioglu, M. Y. y Hossain, A. (1990). Theoretical modeling of biodegradation and biotransformation of hydrocarbons in subsurface environments. *J. Theor. Biol.* **142**: 503-516.
- Cuny, P., Faucet, J., Acquaviva, M., Bertrand, J.-C. y Gilewicz, M. (1999). Enhanced biodegradation of phenanthrene by a marine bacterium in presense of a synthetic surfactant. *Letters Appl. Microbiol.* **29**: 242-245.
- Dagher, F., Déziel, E., Lirette, P., Paquette, G., Bisailon, J.-G. y Villemur, R. (1997). Comparative study of five polycyclic aromatic hydrocarbon degrading bacterial strains isolated from contaminated soils. *Can. J. Microbiol.* **43**: 368-377.
- 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.
- Dean, S. M., Jin, Y., Cha, D. K., Wilson, S. V. y Radosevich, M. (2001). Phenanthrene degradation in soil co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. *J. Environ. Qual.* **30**: 1126-1133.
- Deschênes, L., Lafrance, P., Villeneuve, J.-P. y Samson, R. (1996). Adding sodium dodecyl sulfate and *Pseudomonas aeruginosa* UG2 biosurfactants inhibits polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in a weathered creosote-contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **46**: 638-646.
- Devinny, J. S., Deshusses, M. A. y Webster, T. S. (1999). Biofiltration for air pollution control. Washington D.C., Lewis Publishers. 299 pp.
- Doddamani, H. P. y Ninnekar, H. Z. (2000). Biodegradation of phenanthrene by a *Bacillus* species. *Curr. Microbiol.* **41**: 11-14.
- DOF (Diario Oficial de la Federación) (1988). 28 de Enero.

- DOF (Diario Oficial de la Federación) (1993). 22 de Octubre.
- DOF (Diario Oficial de la Federación) (1998). 24 de Noviembre.
- Efroymsen, R. A. y Alexander, M. (1994). Role of partitioning in biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Environ. Sci. Technol.* **28**: 1172-1179.
- Efroymsen, R. A. y Alexander, M. (1995). Reduced mineralization of low concentrations of phenanthrene because of sequestering in nonaqueous-phase liquids. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 515-521.
- Egli, T. (1995). The ecological and physiological significance of the growth of heterotrophic microorganism with mixture of substances. *Advances in microbial ecology*. Jones, J. G. New York, Plenum Press. **14**: 305-386 pp.
- Evans, W. C., Fernley, H. N. y Griffiths, E. (1965). Oxidative metabolism of phenanthrene and anthracene by soil *Pseudomonas*: The ring-fission mechanism. *Biochemical J.* **95**: 819-831.
- Fan, S. y Scow, K. M. (1993). Biodegradation of trichloroethylene and toluene by indigenous microbial populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1911-1918.
- FRTR, Federal Remediation Technologies Roundtable. (2004). In Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide, Version 4.0. Phytoremediation (In Situ Soil Remediation Technology). <http://www.frtr.gov/matrix2/>
- Fernández-Linares, L., Rojas-Avelizapa, N., Roldan-Carrillo, T., Islas-Ramírez, M. y Zegarra-Martínez, H. (2003). Natural attenuation of hydrocarbon polluted sites in Mexico. *In situ* on-site Bioremediation. The seventh International Symposium, Orlando, FL., EU. E6.
- Finlayson, B. A. (1980). Nonlinear analysis in chemical engineering. New York, EU, McGraw-Hill. 366 pp.
- García, I., Hernández, S., Favela, E., Auria, R. y Revah, S. (2001). Degradación de tolueno con hongos. IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Veracruz, Ver, Mexico, SMBB.
- García-Peña, E. I., Hernandez, S., Favela-Torres, E., Auria, R. y Revah, S. (2001). Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnol. Bioeng.* **76**: 61-69.
- García-Rivero, M., Saucedo-Castañeda, G., Flores De Hoyos, S. y Gutiérrez-Rojas, M. (2002). Mass transfer and hydrocarbons biodegradation and aged soil in slurry phase. *Biotechnol. Prog.* **18**: 728-733.
- Ghosh, D. K. y Mishra, A. K. (1983). Oxidation of phenanthrene by a strain of *Micrococcus*: evidence of protocatechuate pathway. *Curr. Microbiol.* **9**: 219-224.
- Gray, M. R., Banerjee, D. K., Dudas, M. J. y Pickard, M. A. (2000). Protocols to enhance biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil. *Bioremediation J.* **4**: 249-257.
- Grimberg, S. J., Stringfellow, W. T. y Aitken, M. D. (1996). Quantifying the biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas stutzeri* P16 in the presence of nonionic surfactant. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2387-2392.

- Grosser, R. J., Friedrich, D. M., Ward, D. M. y Inskeep, W. P. (2000). Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: different enrichments conditions influence bioavailability and selection of phenanthrene-degrading isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2695-2702.
- Guerin, W. F. y Jones, G. E. (1988). Mineralization of phenanthrene by a *Mycobacterium* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 937-944.
- Guha, S. y Jaffé, P. R. (1996). Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 1382-1391.
- Guha, S., Peters, C. A. y Jaffé, P. R. (1999). Multisubstrate biodegradation kinetics of naphthalene, phenanthrene, and pyrene mixtures. *Biotech. Bioeng.* **65**: 491-499.
- Guieysse, B., Bernhoft, I., Andersson, B. E., Henrysson, T., Olsson, S. y Mattiasson, B. (2000). Degradation of acenaphthene, phenanthrene and pyrene in a packed-bed biofilm reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 826-831.
- Guieysse, B., Cirne, M. d. D. G. T. y Mattiasson, B. (2001). Microbial degradation of phenanthrene and pyrene in a two-liquid-partitioning bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 796-802.
- GWRTAC, Ground-Water Remediation Technologies Center. (1998) Jerald L. Schnoor (Ed). Ground water Technology Evaluation Report: Phytoremediation. <http://www.gwrtac.org/html/techdocs.html>.
- Hamby, D. M. (1996). Site remediation techniques supporting environmental restoration activities: A review. Ann Arbor, MI, USA, University of Michigan. Dept. of Environ. and Industrial Health. School of Public Health pp.
- Harms, H. y Bosma, T. N. P. (1997). Mass transfer limitation of microbial growth and pollutant degradation. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **18**: 97-105.
- Heitkamp, M. A. y Cerniglia, C. E. (1988). Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1612-1614.
- Huesemann, M. H. (1995). Predictive model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* **29**: 7-18.
- 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 contaminated model soils. *Bioremediation J.* **6**: 321-336.
- Hund, K. y Schenk, B. (1994). The microbial respiration quotient as indicator for bioremediation processes. *Chemosphere* **28**: 477-490.
- Imai, C., Sakai, H., Katsura, K., Honto, W., Hida, Y. y Takazawa, T. (2002). Growth model for the endangered cyprinid fish *Tribolodon nakamurai* based on otolith analyses. *Fisheries Sci.* **68**: 843-848.
- INE-CENICA-JICA (1997). Segundo informe sobre la calidad del aire en las ciudades mexicanas. México D.F. pp.

- Jiménez Cisneros, B. E. (2001). La contaminación ambiental en México: Causas, efectos y tecnología apropiada. México, D.F., Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México A.C., Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA. Noriega Editores. 926 pp.
- Johnson, C. R. y Scow, K. M. (1999). Effect of nitrogen and phosphorus addition on phenanthrene biodegradation in four soils. *Biodegradation* **10**: 43-50.
- Juárez Tomás, M. S., de Labanda, E. B., de Ruiz Holgado, A. P. y Nader-Macías, M. E. (2002). Estimation of vaginal probiotic lactobacilli growth parameters with the application of the Gompertz model. *Can. J. Microbiol.* **48**: 82-92.
- Kanally, R. A. y Harayama, S. (2000). Minireview. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* **182**: 2059-2067.
- Kazunga, C. y Aiken, M. D. (2000). products from incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 1917-1922.
- Keuth, S. y Hans-Jürgen, R. (1991). Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 804-808.
- Kiyohara, H., Nagao, K. y Nomi, R. (1976). Degradation of phenanthrene through *o*-phthalate by an *Aeromonas* sp. *Agr. Biol. Chem.* **40**: 1075-1082.
- Koutsoumanis, K., Tassou, C. C., Taoukis, P. S. y Nychas, G.-J. E. (1998). Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 981-987.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J. K. y Stahr, K. (2000). Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 1485-1498.
- Lay, J.-J., Li, Y.-Y. y Nioke, T. (1998). Mathematical model for methane production from landfill bioreactor. *J. Environ. Eng.:* 730-736.
- Lee, P.-H., Ong, S. K., Golchin, J. y Nelson, G. L. S. (2001). Use of solvents to enhance PAH biodegradation of coal tar-contaminated soils. *Wat. Research* **35**: 3941-3949.
- Li, A., Cheung, K. A. y Krishna, R. R. (2000). Cosolvent-enhanced electrokinetics remediation of soils contaminated with phenanthrene. *J. Environ. Eng.* **June**: 527-533.
- Lie, J., Sansregret, J.-L. y Cyr, B. (1994). Biopiles and biofilters combined for soil cleanup. *Pollution Eng.* **June**: 56-58.
- LGEEPA, 1988
- Lotfabad, S. K., Pickard, M. A. y Gray, M. R. (1996). Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) on soil. *Environ. Sci. Technol.* **30**: 1145-1151.
- Macnaughton, S. J., Stephen, J. R., Venosa, A. D., Davis, G. A., Chang, Y.-J. y White, D. C. (1999). Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3566-3567.

- Márquez-Rocha, F. J., Hernández-Rodríguez, V. Z. y Vázquez-Duhalt, R. (2000). Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters* **22**: 469-472.
- May, R., Schroder, P. y Sandermann, H. (1997). *Ex-situ* Process for treating PAH-contaminated soil with *phanerochaete chrysosporium*. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 2626-2633.
- McCarty, P. L., Goltz, M. N., Hopkins, G. D., Dolan, M. E., Allan, J. P., Kawakami, B. T. y T.J., C. (1998). Full-scale evaluation of *in situ* cometabolic degradation of trichloroethylene in groundwater through toluene injection. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 88-100.
- Merkel, G. J. y Perry, J. J. (1977). Increased cooxidative biodegradation on malathion in soil via cosubstrate enrichment. *J. Agric. Food Chem* **25**: 1011-1012.
- Morales, M., Revah, S. y Auria, R. (1998). Start-up and the effect of gaseous ammonia on a biofilter for the elimination of toluene vapors. *Biotechnol. Bioeng.* **60**: 483-491.
- Mueller, L. D., Nusbaum, T. J. y Rose, M. R. (1995). The Gompertz equation as a predictive tool in demography. *Exp. Gerontology* **30**: 553-569.
- Nam, K. y Alexander, M. (1998). Role of nanoporosity and hydrophobicity in sequestration and bioavailability: Tests with model solids. *Environ. Sci. Technol.* **32**: 71-71.
- Nam, K. y Kukor, J. (2000). COmbined ozonation and biodegradation for remediation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Biodegradation* **11**: 1-9.
- OMS (Organización Mundial de la Salud) (1998). Polynuclear aromatic hydrocarbons. Guidelines for drinking-water quality. <http://www.who.int>
- Ortega-Calvo, J.-J. y Saiz-Jimenez, C. (1998). Effect of humic fractions and clay on biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas fluorescens* strain isolated from soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3123-3126.
- Ortiz, I., Meza, J. C., Velasco, J. A. y Revah, S. (2003a). Enhanced biodegradation of hydrocarbons by addition of gaseous cosubstrates. En: Magar V.S. & Kelley M.E. (Eds) Proceedings of the Seventh International Symposium In situ on-site Bioremediation. Orlando, Fl. paper E-21. Battelle Press. Columbus OH.
- Ortiz, I., Revah, S. y Auria, R. (2003b). Effects of packing material on the biofiltration of benzene, toluene and xylene vapours. *Environ. Technol.* **24**: 265-275.
- PEMEX (2001a). Informe de seguridad, salud y medio ambiente. www.pemex.com
- PEMEX (2001b). Informe estadístico. www.pemex.com
- Perry's Chemical Engineers' Handbook on CD-ROM © 1999. Ed. Perry Robert H., Green Don W. New York, McGraw Hill.

- Phelps, T. J., Siegrist, R. L., N.E., K., Pickering, D. A., Strong-Gunderson, J. M., Morrissey, C. M. y Mackowski, R. (1994). Bioremediation of petroleum hydrocarbons in soil column lysimeters from Kwajalein Island. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **45/46**: 835-845.
- Piantanelli, L. (1986). A mathematical model of survival kinetics. I. Theoretical basis. *Archives of Gerontology and Geriatrics* **5**: 107-118.
- Pineda, J., Auria, R., Perez-Guevara, F. y Revah, S. (2000). Studies of biofiltration of toluene vapors using a support model. *Bioprocess Eng.* **23**: 479-486.
- PROFEPA (2002). Informe de emergencias ambientales ocurridas en PEMEX a nivel nacional. 1997-2002. <http://www.profepa.gob.mx/saa/audita53.htm>
- Providenti, M. A., Flemming, C. A., Lee, H. y Trevors, J. T. (1995). Effect of addition of rhamnolipid biosurfactants or rhamnolipid-producing *Pseudomonas aeruginosa* on phenanthrene mineralization in soil slurries. *FEMS Microbiol. Ecology* **17**: 15-16.
- Qiu, X., Stevens, D. K. y McFarland, M. J. (1992). PAH compounds transformation in soil composting using white-rot fungus *phanerochaete chrysosporium* - A mathematical model. 85th annual meeting of the air & waste management association, Kansas City, Missouri, USA.
- Rama, R., Mougin, C., Malosse, C., Chaplain, V., Sigoillot, J.-C. y Asther, M. (2000). Biotransformation of PAHs by the white rot fungus *Trametes versicolor*. Bioremediation of contaminated soils. Wise, D., L., Trantolo, D. J., Cichon, E. J., Inyang, H. I. y Stottmeister, U. New York, Marcel Dekker, INC pp.
- Rama-Mercier, R., Mougin, C., Sigoillot, J.-C., Sohier, L., Chaplain, V. y Asther, M. (1998). Wet sand cultures to screen filamentous fungi for the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnology Techniques* **12**: 725-728.
- Ratkowsky, D. A. (1983). Nonlinear Regression Modeling: A Unified Practical Approach. New York, Marcel Dekker. 276 pp.
- Rehmann, K., Hertkorn, N. y Kettrup, A. (2001). Fluoranthene metabolism in *Mycobacterium* sp. strain KR20: identity of pathway intermediates during degradation and growth. *Microbiology* **147**: 2783-2794.
- Ressler, B. P., Kneifel, H. y Winter, J. (1999). Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons and formation of humic acid-like residues during bacterial PAH degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 85-91.
- Ricklefs, R. E. y Scheuerlein, A., Eds. (2002). Biological implications of the Weibull and Gompertz models of aging. Biological Sciences and medical Sciences, Journals of Gerontology Series A.
- Roldan-Carrillo, T., Rojas-Avelizapa, N., Arce-Ortega, J. M., Zegarra-Martínez, H. y Fernández-Linares, L. (2003). Effect of agricultural wastes addition on heterotrophic activity in a contaminated soil. *In situ* on-site Bioremediation. The seventh International Symposium, Orlando. Fl., EU. A5.

- Salanitro, J. P., Dorn, P. B., Huesemann, M. H., Moore, K. O., Rhodes, I. A., Jackson, L. M. R., Vipond, T. E., Western, M. M. y Wisniewski, H. L. (1997). Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 1769-1776.
- Samanta, S. K., Chakraborti, A. K. y Jain, R. K. (1999). Degradation of phenanthrene by different bacteria: evidence for novel transformation sequences involving the formation of 1-naphthol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 98-107.
- Schippers, C., Geßner, K., Müller, T. y Scheper, T. (2000). Microbial degradation of phenanthrene by addition of a sophorilipid mixture. *J. Biotechnol.* **83**: 189-198.
- Schmidt, S. K. y Alexander, M. (1985). Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 822-827.
- Schwartz, E. y Scow, K. M. (1999). Using biodegradation kinetics to measure availability of aged phenanthrene to bacteria inoculated into soil. *Environ. Tox. Chem.* **18**: 1742-1746.
- Schwartz, E. y Scow, K. M. (2001). Repeated inoculation as a strategy for the remediation of low concentrations of phenanthrene in soil. *Biodegradation* **12**: 201-207.
- Scow, K. M., Schmidt, S. K. y Alexander, M. (1989). Kinetics of biodegradation of mixtures of substrates in soil. *Soil Biol. Biochem.* **21**: 703-708.
- SEMARNAT (2001). Anuario estadístico. http://www.semarnat.gob.mx/estadisticas_ambientales
- Shuttleworth, K. L. y Cerniglia, C. E. (1996). Bacterial degradation of low concentrations of phenanthrene and inhibition by naphthalene. *Microbial Ecology* **31**: 305-317.
- Simon, L. y Karim, M. N. (2001). Probabilistic neural networks using Bayesian decision strategies and a modified Gompertz model for growth phase classification in the batch culture of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Eng. J.* **7**: 41-48.
- Smith, M. J., Lethbridge, G. y Burns, R. G. (1999). Fate of phenanthrene, pyrene and benzo[a]pyrene during biodegradation of crude oil added to two soils. *FEMS Microbiol. Letters* **173**: 445-452.
- Sokhn, J., De Leij, F. A. A. M., Hart, T. D. y Lynch, J. M. (2001). Effect of copper on the degradation of phenanthrene by soil micro-organisms. *Letters Appl. Microbiol.* **33**: 164-168.
- Stevenson, F. J. (1982). Humus Chemistry. Genesis, composition, reaction. New York, EU. 443 pp.
- Stucki, G. y Alexander, M. (1987). Role of dissolution rate and solubility in biodegradation of aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 292-297.
- Tabak, H. H., Gao, C., Yan, X., Lai, L., Pfanstiel, S., Fu, C. y Govind, R. (1994). Biokinetics studies on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil slurry reactors. 87th annual meeting of the Air & Waste management association, Cincinnati, Ohio. USA. 94-TA45A.02.
- Tiehm, A. (1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 258-263.

- Toumi, P., Salminen, J. y K.S, J. (2003). Evaluation of natural attenuation of several petroleum hydrocarbon-contaminated sites. In situ and on-site bioremediation. The seventh International Symposium, Orlando, FL, EU, Battelle. Platform E6.
- Traczewska, T. M. (2000). Changes of toxicological properties of biodegradation products of anthracene and phenanthrene. *Wat. Sci. Tech.* **41**: 31-38.
- US-EPA (1993). Remediation technology screening matrix and reference guide.
- US-EPA (1995). Method-3540C; Soxhlet Extraction; Revision 3.
- US-EPA (2000). Introduction to Phytoremediation. EPA-600-R-99-107. 104 pp.
- US-National Research Council. (1983). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Evaluation of Sources and Effects. National Academy Press. Washington DC. 421 pp.
- US-National Research Council. (1999). Groundwater & Soil Cleanup. Improving Management of Persistent Contaminants. National Academy Press. Washington DC. 300 pp.
- US-National Research Council. (2000). Natural Attenuation for Groundwater Remediation. Washington, D.C., National Academy Press. Washington DC. 288 pp.
- Vandepitte, V., Quataert, P., De Rore, H. y Verstraete, W. (1995). Evaluation of the Gompertz function to model survival of bacteria introduced into soils. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 365-372.
- Vescovo, M., Scolari, G., Orsi, C., Sinigaglia, M. y Torriani, S. (1997). Combined effects of *Lactobacillus casei* inoculum, modified atmosphere packaging and storage temperature in controlling *Aeromonas hydrophila* in ready-to-use vegetables. *Int. J. Food Sci. and Technol* **32**: 411-419.
- Volkering, F., Breure, A. M., A., S. y van Andel, J. G. (1992). Microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons: effect of substrate availability on bacterial growth kinetics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 548-552.
- von Fahnestock, F. M., Wickramanayake, G. B., Kratzke, R. J. y W.R., M. (1998). Biopile design, operation and maintenance Handbook for treating Hydrocarbon-contaminated soils. Columbus, Ohio. EU., Battelle Press. 163 pp.
- Weissenfels, W. D., Beyer, M. y Klein, J. (1990). Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthrene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 479-484.
- Weissenfels, W. D., Klewer, H.-J. y Langhoff, J. (1992). Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 689-696.
- White, J. C., Kelsey, J. W., Hatzinger, P. B. y Alexander, M. (1997). Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. *Environ. Tox. Chem.* **16**: 2040-2045.
- Willumsen, B., Gray, M. R. y Dudas, M. J. (1997). Biological degradation of anthracene in soil after sorption from non-aqueous phase liquids. *Environmental Technology* **18**: 755-762.

- Yang, Y. y McCarty, P. L. (2002). Comparison between donor substrates for biologically enhanced tetrachloroethene DNAPL dissolution. *Environ. Sci. Technol.* **36**: 3400-3404.
- Zeng, Y. y Hong, P. K. A. (2002). Slurry-phase ozonation for remediation of sediments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* **52**: 58-68.
- Zhang, W.-X. y Bouwer, E. J. (1997). Biodegradation of benzene, toluene and naphthalene in soil-water slurry microcosms. *Biodegradation* **8**: 167-175.
- Zhang, Y., Maier, W. J. y Miller, R. M. (1997). Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **31**: 2211-2217.

Anexo A. Rutas metabólicas de degradación de tolueno

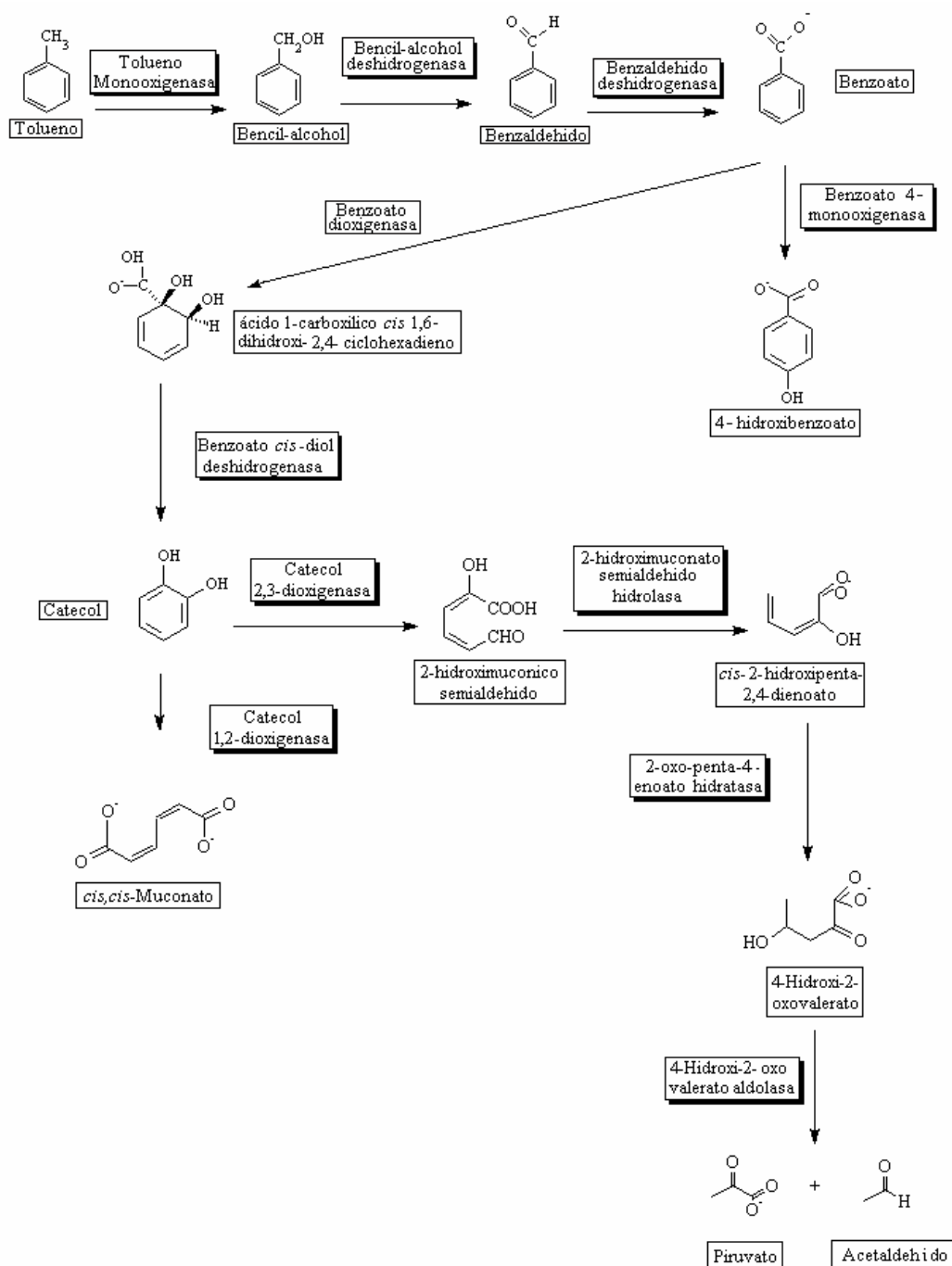


Figura A.1. Ruta metabólica de degradación del tolueno para *P. mendocina* vía benzoato. Tomado de la base de datos de biocatálisis/biodegradación de la Universidad de Minnesota. http://umbbd.ahc.umn.edu/tol/tol_map.html.

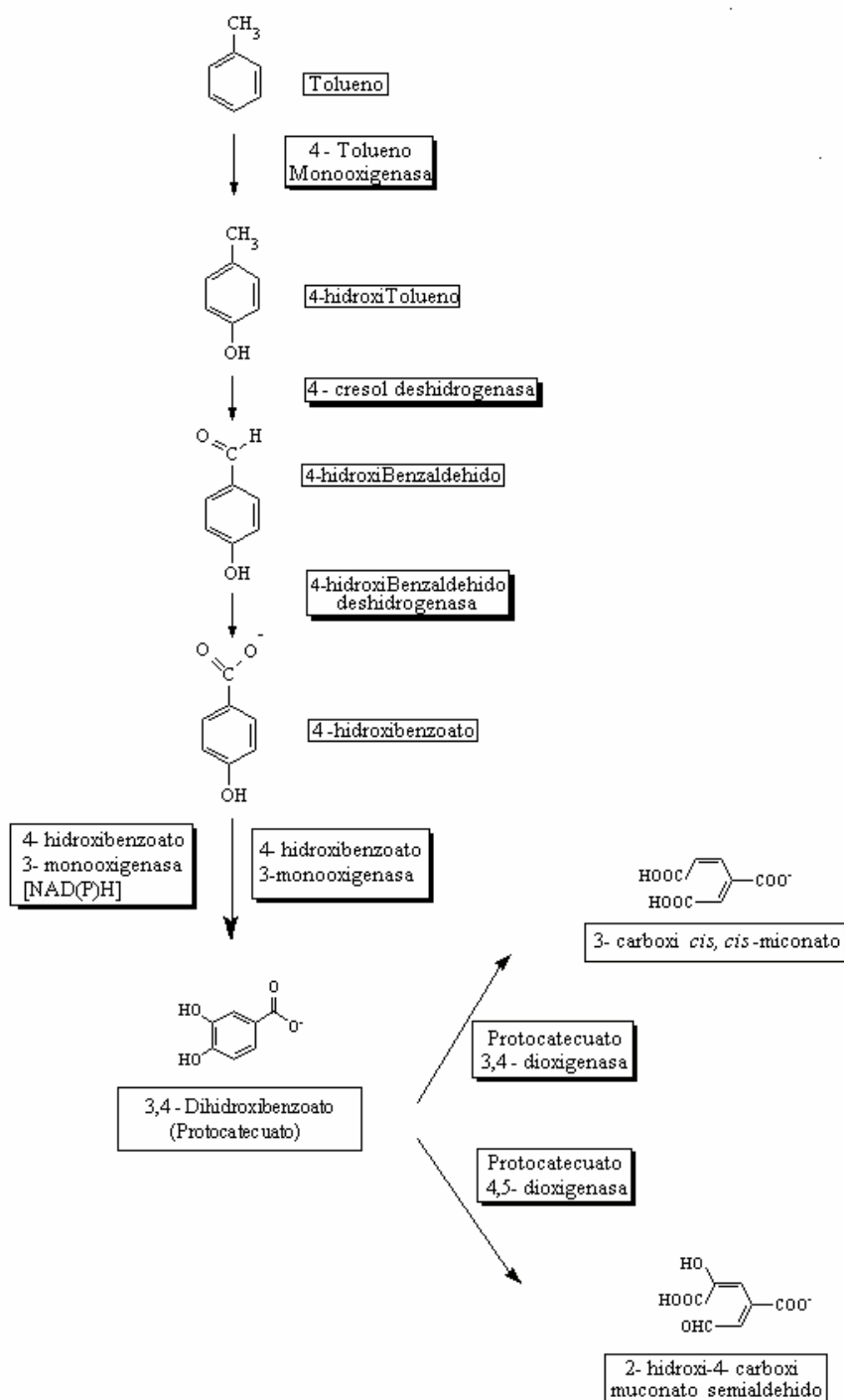


Figura A.2. Ruta metabólica de degradación del tolueno para *P. algaligenes* vía Protocatecuato. Tomado de la base de datos de biocatálisis/biodegradación de la Universidad de Minnesota. http://umbbd.ahc.umn.edu/tol/tol_map.html.

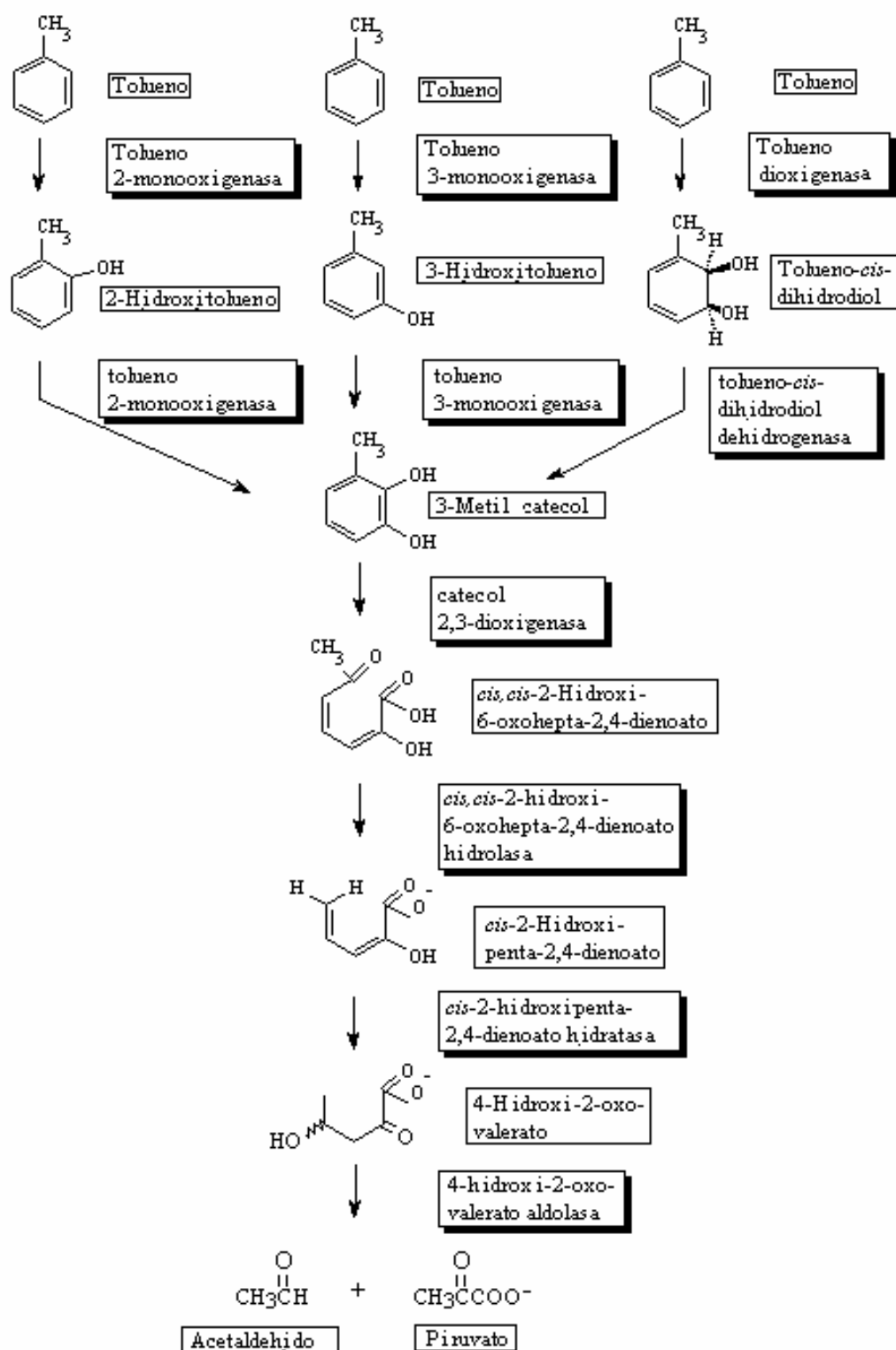


Figura A.3. Ruta metabólica de degradación del tolueno vía catecol para *P. algaligenes*. Tomado de la base de datos de biocatálisis/biodegradación de la Universidad de Minnesota. http://umbbd.ahc.umn.edu/tol/tol_map.html.

Anexo B. Cálculos y calibraciones

Anexo B.1. Concentración de biomasa en función de la absorbancia

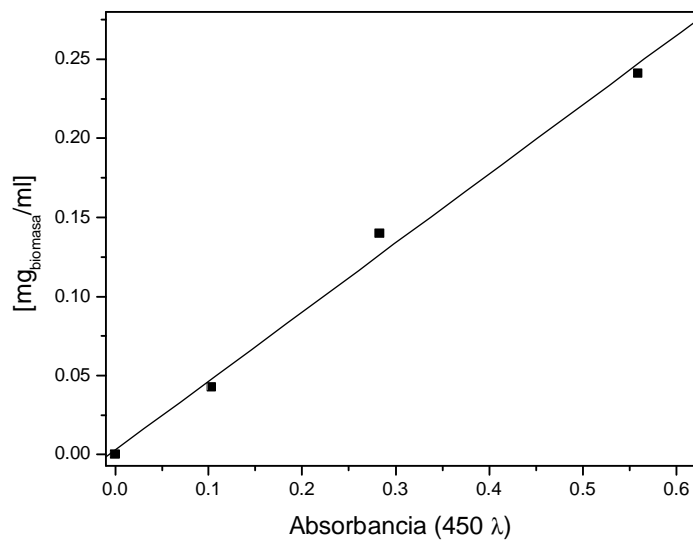


Figura B.1. Concentración de biomasa del consorcio bacteriano en función de la absorbancia. $y = 0.00269 + 0.43703X$. $R^2 = 0.996$.

Anexo B.2. Curvas de calibración de controladores de flujo

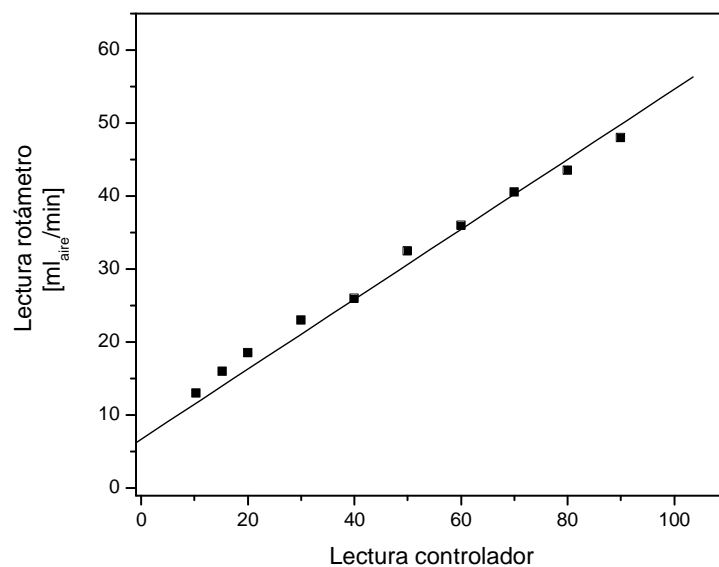


Figura B.2. Curva de calibración de controlador másico Aalborg Mod. GFC17. $y = 6.733 + 0.479X$. $R^2 = 0.985$.

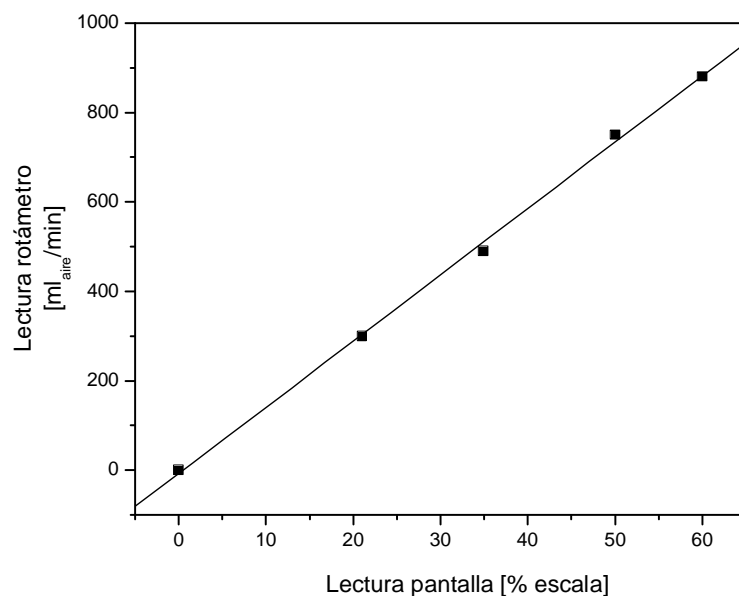


Figura B.3. Curva de calibración de controlador másico Matheson Mod. 8141.
 $y = -7.646 + 14.818X$. $R^2 = 0.999$.

Anexo B.3. Curva de calibración de fenantreno

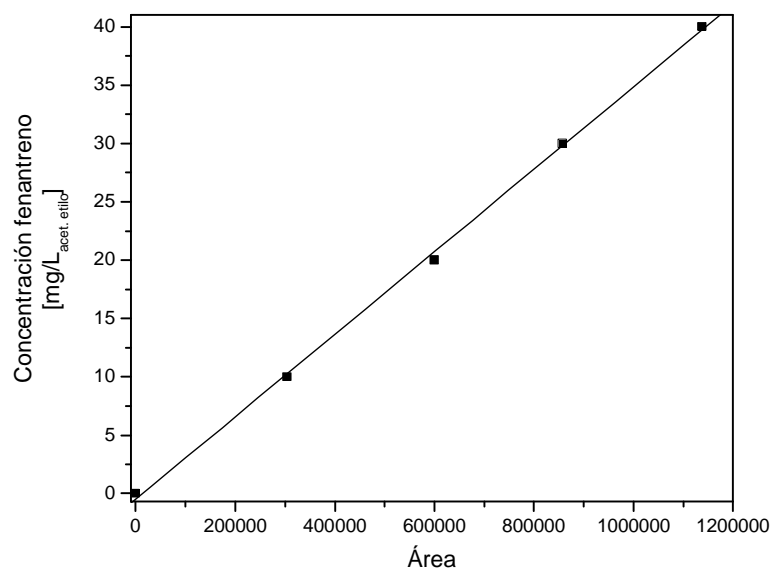


Figura B.4. Curva de calibración de fenantreno. (HPLC, Thermo Separation Products). $y = -0.479 + 3.533E^{-6}X$. $R^2 = 0.999$.

Anexo B.4. Cálculos de la producción de CO₂ y consumo de O₂

Las áreas, de oxígeno A_{O₂}, de nitrógeno A_{N₂}, de dióxido de carbono, A_{CO₂} y del aire, A_{aire} obtenidas en el cromatógrafo de gases de conductividad térmica se relacionaron de acuerdo con las siguientes expresiones, para calcular los porcentajes de CO₂ y oxígeno en las muestras.

$$\%O_2 = \frac{A_{O_2}}{A_{N_2}} 87.22 \quad \text{y} \quad \%CO_2 = \frac{A_{CO_2}}{A_{N_2}} \frac{(A_{N_2} + A_{O_2})}{A_{aire}} 74.97$$

Los valores de 87.22 y 74.97 fueron obtenidos de una calibración con una mezcla certificada que contenía 5% CO₂, 14.1% O₂, y 80.9 N₂.

Los porcentajes obtenidos con estas relaciones fueron convertidos a concentración molar utilizando la ley de gases ideales.

Anexo B.5. Cálculos de dilución de fenantreno (9-¹⁴C₁₄H₁₀)

El fenantreno marcado (9-¹⁴C₁₄H₁₀) tenía una actividad de 10.6 mCi/mmol y una concentración de 0.95 mCi/ml_{metanol}.

De acuerdo al confiabilidad del equipo se hicieron los cálculos para que con la solubilidad máxima del fenantreno (1.3 mg/L) la concentración en 100 μL de muestra de la fase líquida se tuvieran alrededor de 125 cuentas por minuto (cpm) que son las unidades de radioactividad que mide el equipo.

El asterisco (*) significa fenantreno marcado.

Para tener 28 μCi por kg_{ss} se requieren:

$$28\mu\text{Ci} \frac{\mu\text{l}}{0.95\mu\text{Ci}} = 29.5\mu\text{l} \text{ de solución de fenantreno}^* \text{ en metanol.}$$

Las equivalencias de unidades son: $1\mu\text{Ci} = 37000 \frac{\text{bq}}{\text{s}} = 2.2 \times 10^6 \text{cpm}$

$$\text{Así, } 28\mu\text{Ci} * 37000 \frac{\text{bq}}{\text{s}} * \frac{60\text{s}}{\text{min}} = 60.12 \times 10^6 \text{cpm}$$

$$\text{Respecto a la concentración, tenemos: } 28\mu\text{Ci} = \frac{\mu\text{mol}}{10.6\mu\text{Ci}} \frac{178\mu\text{g}^*}{\mu\text{mol}} = 470.18\mu\text{g}^* = 0.470\text{mg}^*$$

$$\text{La actividad específica es: } \frac{60.12 \times 10^6 \text{cpm}}{0.470\text{mg}^*} = 132.255 \times 10^6 \text{cpm/mg}^*$$

Para alcanzar la concentración de fenantreno de 50mg/kg_{ss} se requieren:

$$50\text{mg} - 0.470\text{mg}^* = 49.53\text{mg}$$

Los 49.53 mg faltantes se adicionaron de fenantreno sin marcar. Al hacer esta dilución se requiere recalcular la actividad:

$$\frac{132.255 \times 10^6 \text{cpm}}{\text{mg}^*} \frac{0.740 \text{mg}^*}{49.53 \text{mg}} = 1.255 \times 10^6 \text{cpm/mg}$$

Teniendo en cuenta que para fenantreno se tiene la siguiente relación en carbono:

$$\frac{168\text{gC}}{178\text{g}} \text{ se calcularon las cantidades de } ^{14}\text{C} \text{ solubles y de } ^{14}\text{CO}_2 \text{ producidas.}$$

Anexo B.6. Curva de calibración de tolueno

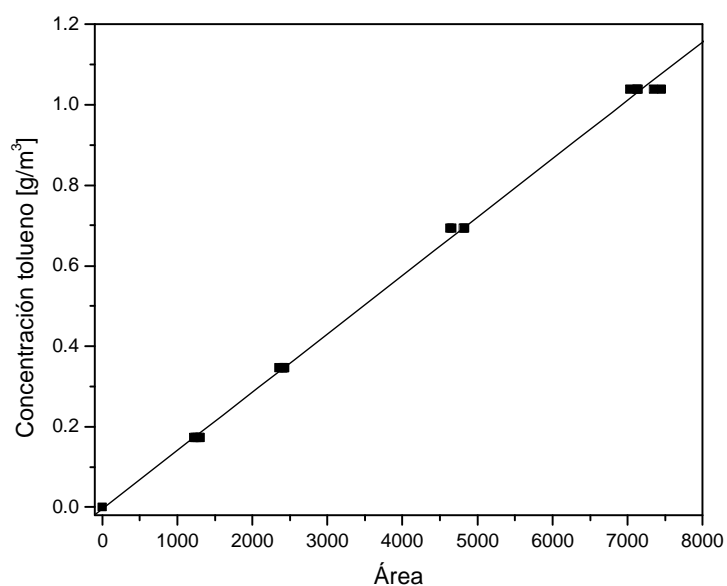


Figura B.5. Curva de calibración de tolueno. (GC-FID, Hewlett-Packard 5890).
 $y = -0.0041 + 1.451 \times 10^{-4} X$. $R^2 = 0.999$.

Anexo B.7. Curva de calibración de ácido ftálico

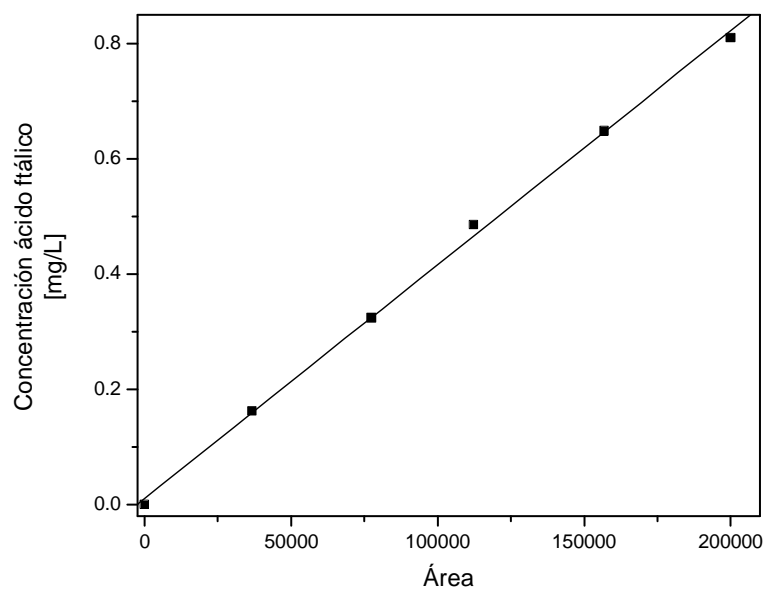


Figura B.6. Curva de calibración de ácido ftálico. (HPLC, Thermo Separation Products). $y = 0.105 + 4.058 \cdot 10^{-6} X$. $R^2 = 0.999$.

Anexo B.8. Modelo Gompertz

Una simulación con el modelo Gompertz utilizando el paquete computacional Origin v7.0220 (OriginLab Corporation, ©1991-2002) se muestra en la Figura B.7. Los valores de los Parámetros A, B y K se fijaron de manera arbitraria.

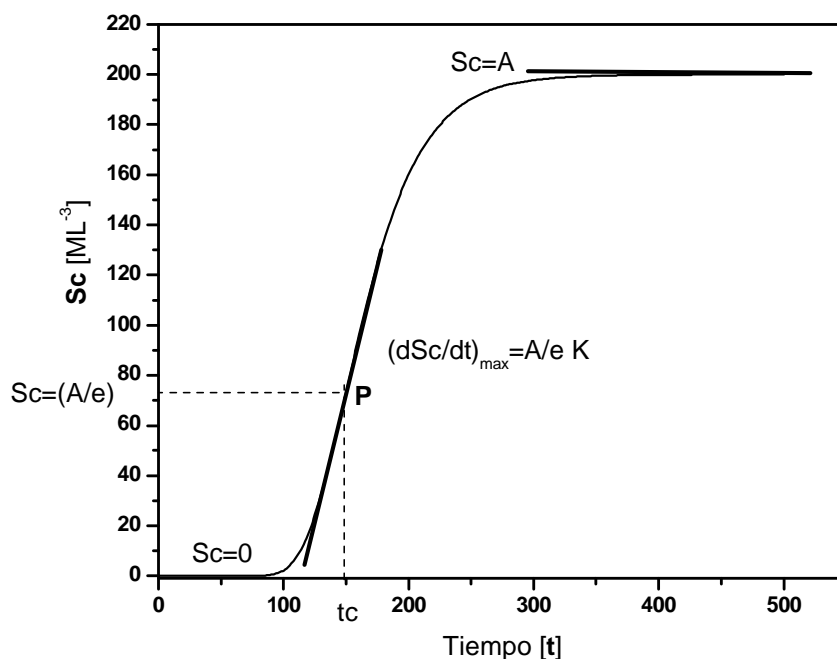


Figura B.7. Simulación con el modelo Gompertz. Parámetros: $A=200$; $B=90$; $K=0.03$.

El punto de inflexión P tiene las coordenadas $(t_c, A/e)$, el tiempo al que se alcanza dicho punto es $t_c = \frac{\ln(90.1)}{0.03} = 150$. Mientras que de la Ecuación 3.4 se obtiene que la máxima tasa de consumo es: $V_{max} = 0.368(200)(0.03) = 2.2$

Anexo C. Diagramas de flujo de experimentos realizados

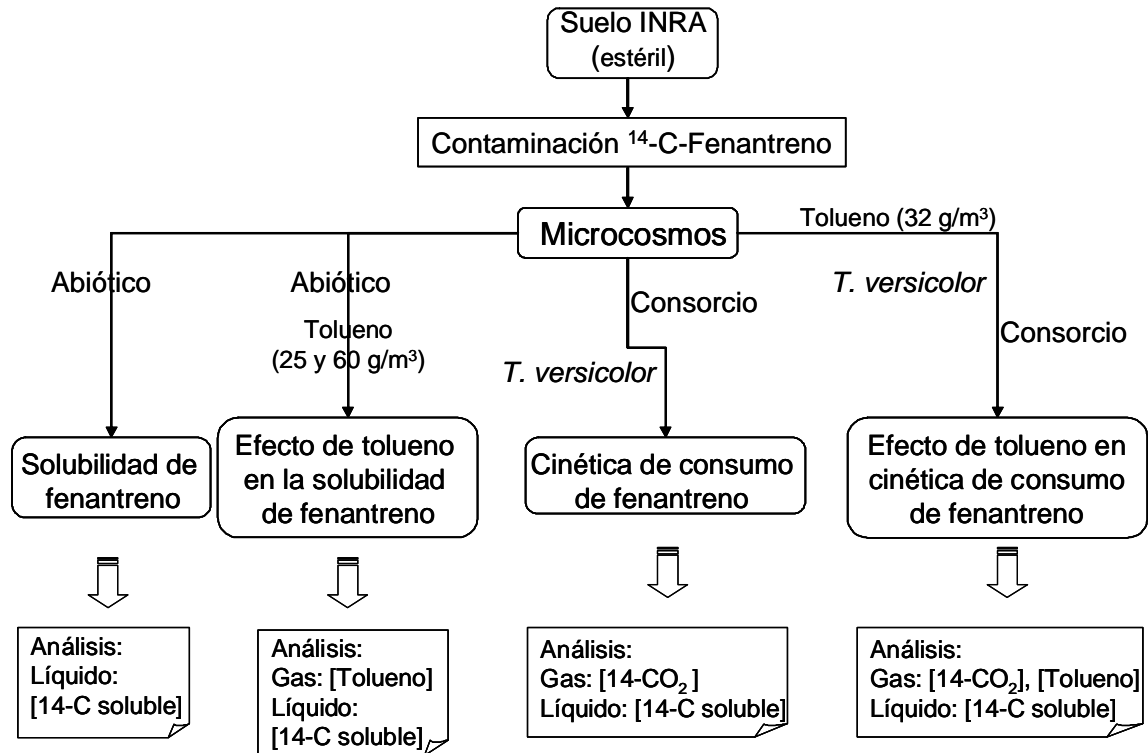


Figura C.1. Diagrama de experimentos realizados con suelo INRA.

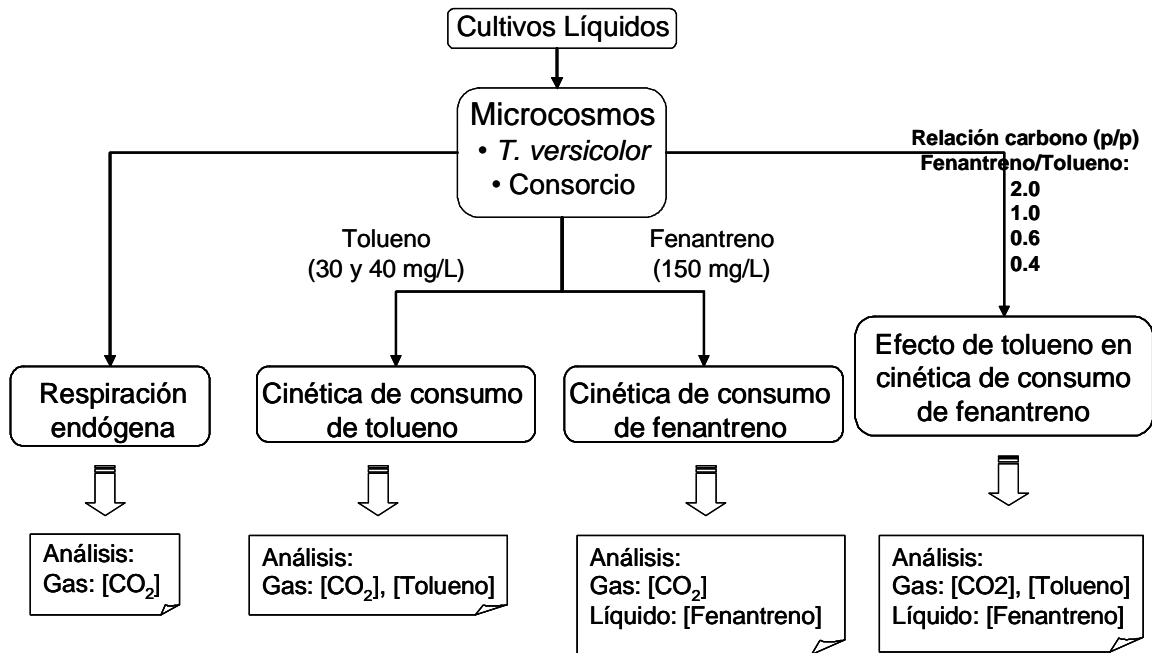


Figura C.2. Diagrama de experimentos en cultivo líquido.

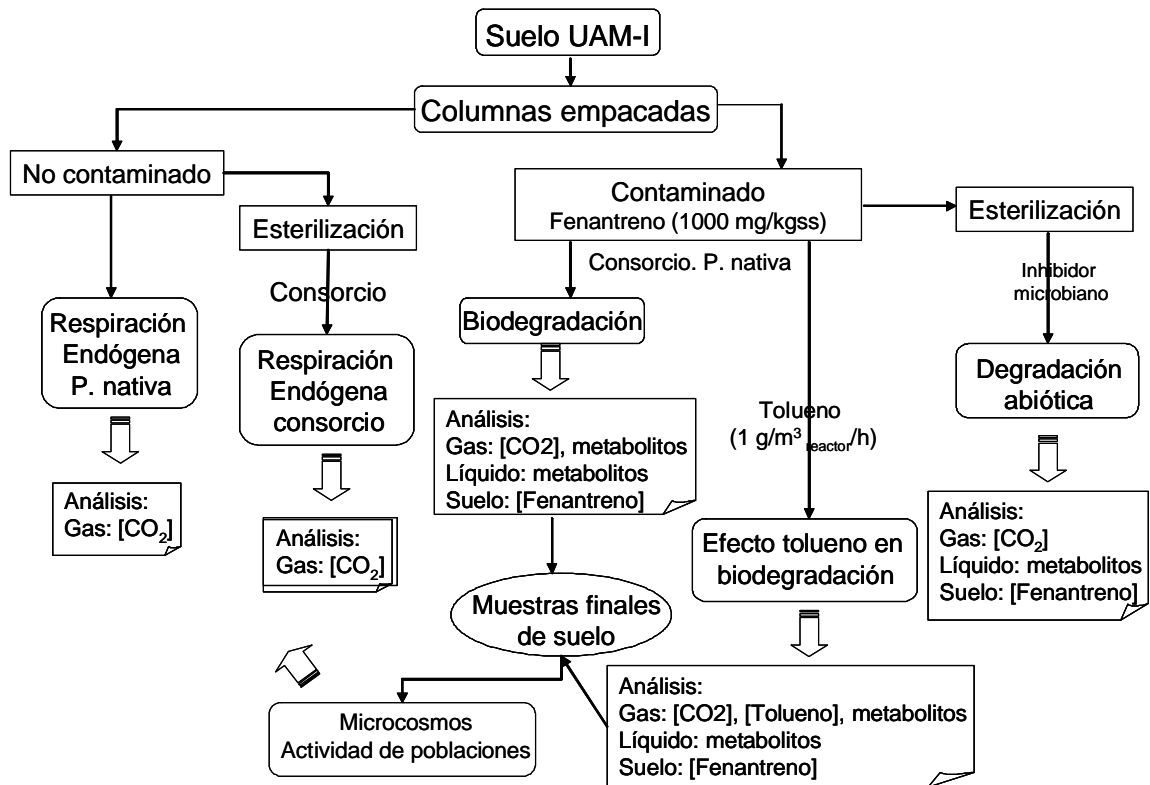


Figura C.3. Diagrama de experimentos realizados con suelo UAM-I.

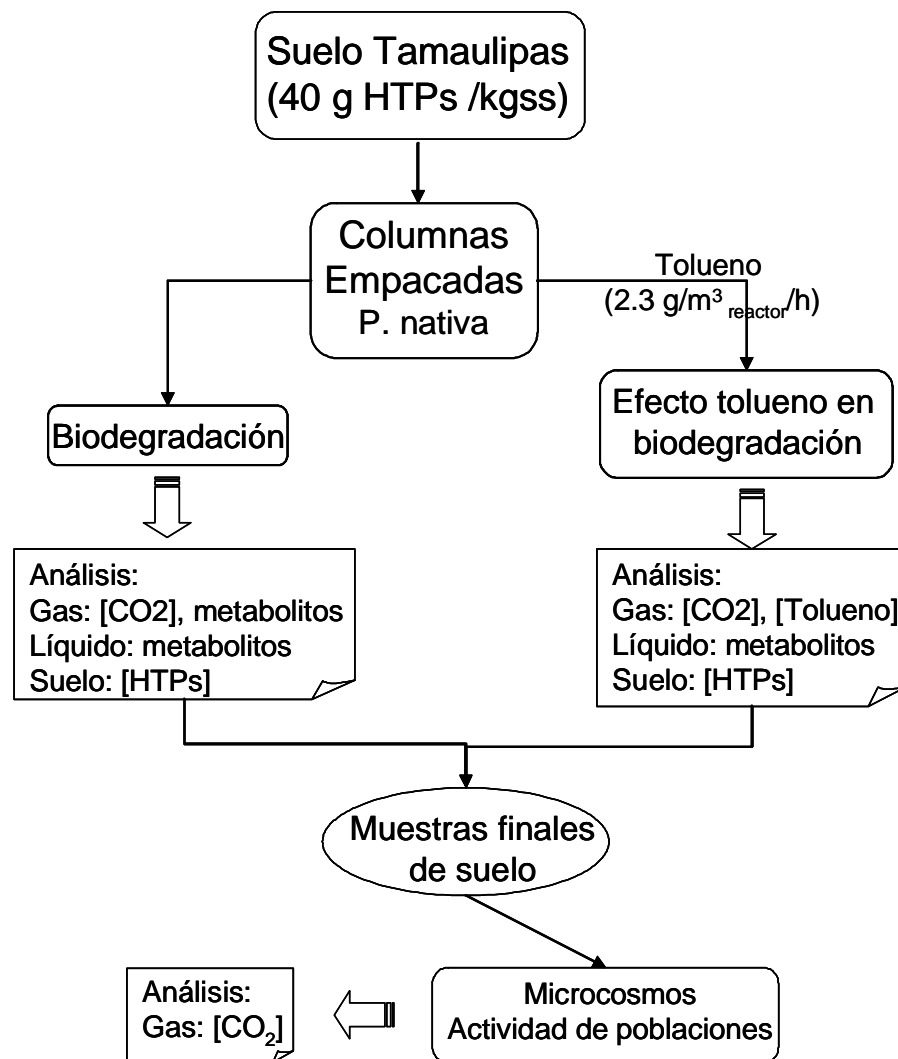


Figura C.4 Diagrama de experimentos realizados con suelo Tamaulipas.

Anexo D. Resultados experimentales

Anexo D.1. Estándar de ácido ftálico

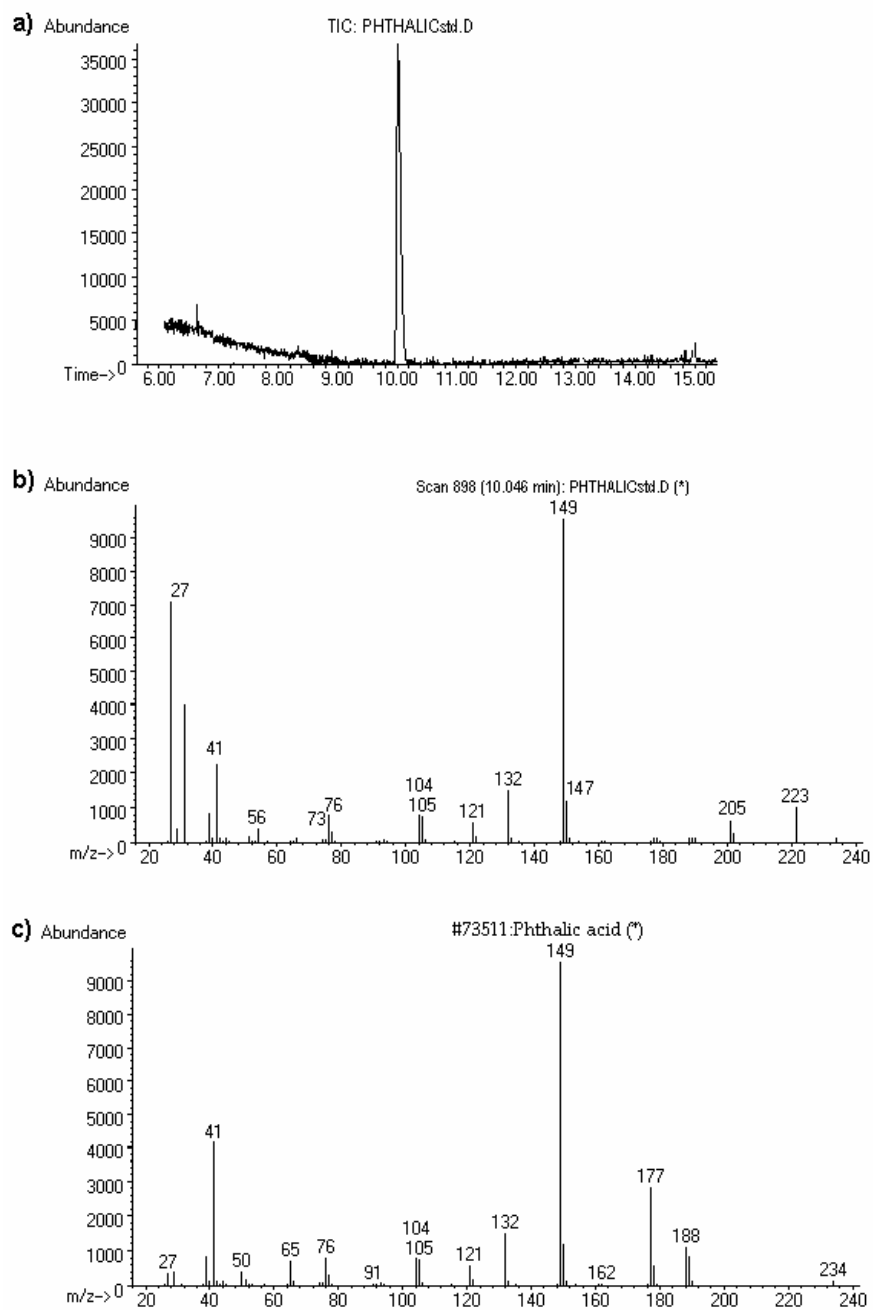


Figura D.1. Cromatograma y espectros de masas del estándar de ácido ftálico.

Anexo D.2. Estándar de fenantreno

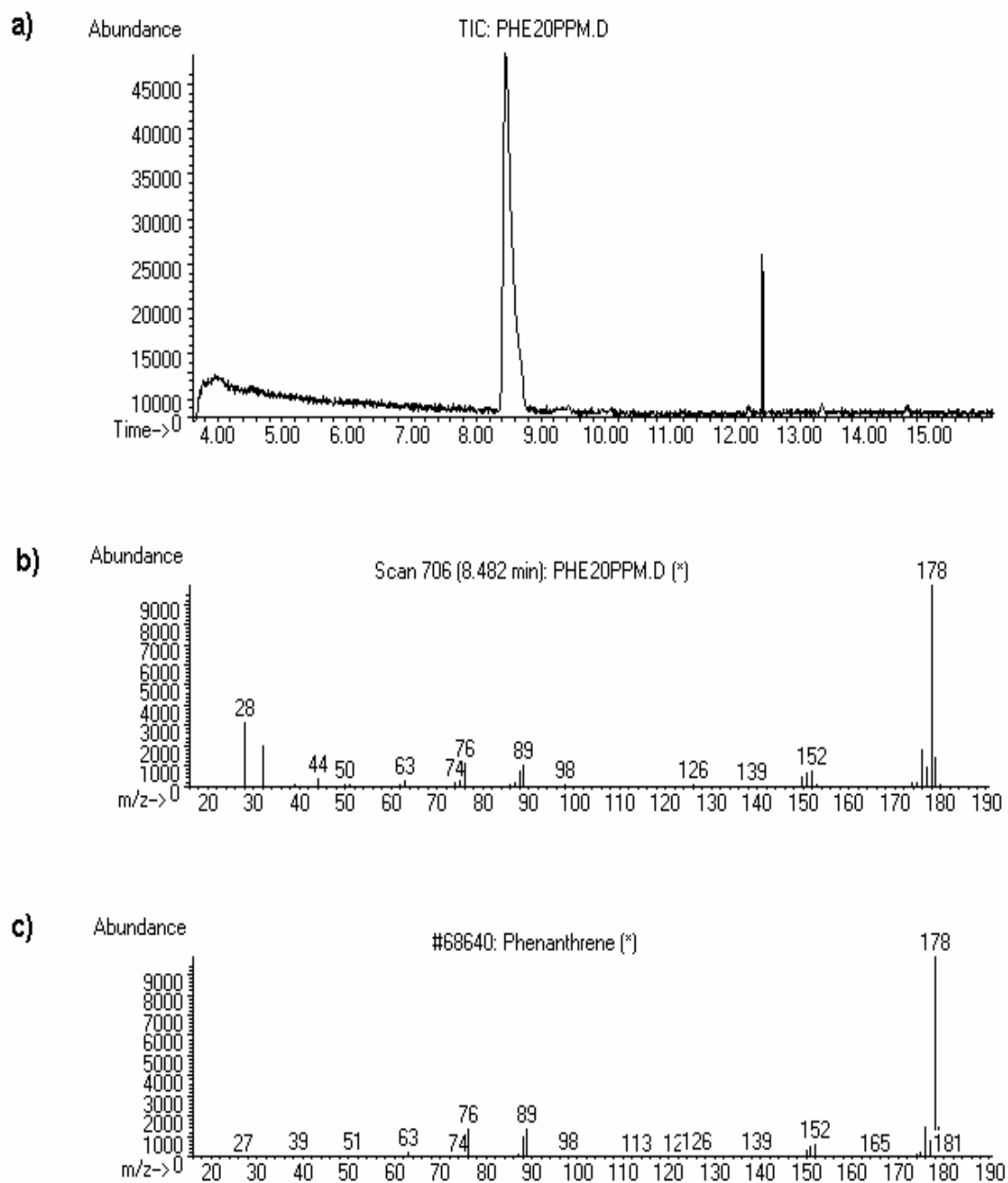


Figura D.2. Cromatograma y espectros de masas del estándar de fenantreno.

Anexo D.3. Producción de CO₂ durante la degradación de fenantreno en columnas empacadas

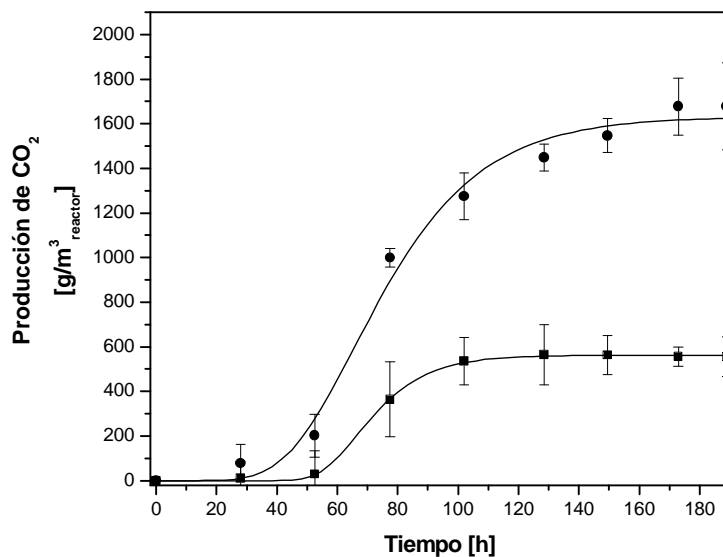


Figura D.3. Producción de CO₂ en la degradación de fenantreno en columnas empacadas (●) Con tolueno, corregida por degradación de tolueno. (■) Sin tolueno.

Anexo D.4. Producción de CO₂ durante la degradación de HTP en columnas empacadas

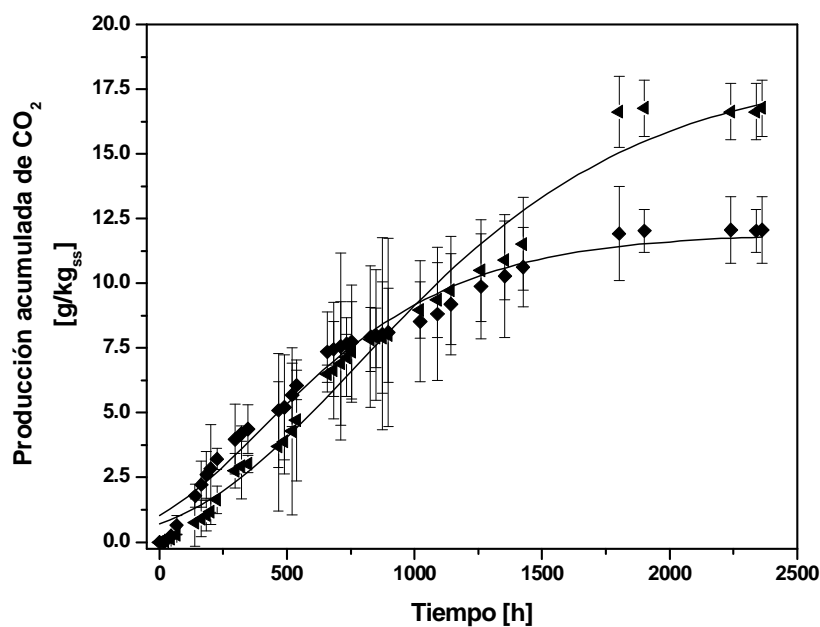


Figura D.4. Producción acumulada de CO₂ en la degradación de HTP en columnas empacadas. (◆) Sin tolueno. (◀) Con Tolueno. (—) Ajuste con modelo Gompertz.

Anexo E. Listado del programa

```

'MODELO MATEMÁTICO DE LA DEGRADACIÓN DE FENANTRENO Y TOLUENO
FENcero=980          'Concentración inicial fenantreno; (mg Fen/kgss)
K1=0.22             'Constante global de reacción de Fen; (mg Fen/mg biomasa/h)
K2=1.59E-6         'Constante global de reacción de Fta; (mg Fta/mg biomasa/h)
K3=32331.51        'Constante de reacción de Fta; (mg Fta/kgss)
Ktolfta=12.65       'Constante de reacción de Fta en presencia de tolueno; (L/mg Tol)
Ktolfen=0.24        'Constante de reacción de Fen en presencia de tolueno; (L/mg Tol)
Kfen=1269.13        'Constante de Monod para fenantreno; (mg Fen/kgss)
Kfta=301360         'Constante de inhibición para Fen por Fta; (mg Fta mg Fta kgss/mg Fen)
A=1.4              'Conversión de Fen-->Fta, estequiométrica; (mg fta/mg phe)
B=2.16             'Relación estequiométrica Fta-->CO2; (mg CO2/mg fta)
C=3.34             'Relación estequiométrica Tol-->CO2; (mg CO2/mg tol)
D=0.54             'Factor de conversión CO2-->Biomasa.12/44/0.5; (mg biomasa/mgCO2)
YCO2fta=0.88       'Rendimiento de Fta -->CO2; (adimensional)
YCO2tol=0.9        'Rendimiento de Tol -->CO2; (adimensional)
YxFen=0.27         'Conversión de Fen-->biomasa, estequiométrica; (mg biomasa/mg phe)
TOLcarga=2.4       'Concentración de tolueno en el gas (mg/kgss/h)
TOLgas=.83         'Concentración de tolueno en el gas (g/m3)
m=0.27            'Coef. de partición tol (-)
'CÁLCULO DEL CONC. TOL EQUILIBRIO
TOLeq=(TOLgas/m)   'Concentración de alimentación de tolueno (mg/L)
RTOL=TOLcarga
Stoptime=190
dt=.01
METHOD stiff
'CONDICIONES INICIALES
Init FEN=FENcero    'mg Fen/kgss
Init FTA=0          'mg Fta/kgss
Init CO2=0          'mg CO2/kgss
Init X=38           'mg biomasa/kgss
'BALANCE PARA EL FENANTRENO; Entrada=Consumo
d/dt(FEN)=-RFEN
RFEN=X*K1*((FEN/(Kfen+FEN+(FTA^2/Kfta)))+FEN^2/FENcero^2*TOLEQ*Ktolfen)
Limit FEN>=0
'BALANCE PARA EL AC. FTÁLICO; Producción-Consumo
d/dt(FTA)=PFTA-RFTA
PFTA=A*RFEN
RFTA=X*K2*FTA*(((K3/(1+FTA))*FEN^0.5/FENcero^0.5)+TOLeq*Ktolfta)
Limit FTA>=0
'BALANCE PARA EL CO2; Producción
d/dt(CO2)=PCO2
PCO2=(YCO2fta*B*RFTA)+(YCO2tol*C*RTOL)
Limit CO2>=0
'BALANCE BIOMASA; Producción=ProdTol+ProdPhe+ProdFta
d/dt(X)=YxFen*RFEN+D*(((1-YCO2fta)*B*RFTA)+((1-YCO2tol)*C*RTOL))
Limit X>=0

```

Anexo F. Nomenclatura

$[Fen]$ = Concentración de fenantreno (ML^{-3})

$[Tol]$ = Concentración de tolueno (ML^{-3})

$[Fta]$ = Concentración de ácido ftálico (ML^{-3})

$[CO_2]$ = Concentración de dióxido de carbono (ML^{-3})

$[X]$ = Concentración de biomasa (ML^{-3})

$D_{eff_{Fen}}$ = Coef. de difusión efectiva de fenantreno en la biopelícula (L^2T^{-1})

$D_{eff_{Tol}}$ = Coef. de difusión efectiva de tolueno en la biopelícula (L^2T^{-1})

$D_{eff_{Fta}}$ = Coef. de difusión efectiva de ácido ftálico en la biopelícula (L^2T^{-1})

R_{Fen} = Reacción de degradación de fenantreno ($ML^{-3}T^{-1}$)

R_{Tol} = Reacción de degradación de tolueno ($ML^{-3}T^{-1}$)

R_{Fta} = Reacción de degradación de ácido ftálico ($ML^{-3}T^{-1}$)

P_{Fta} = Reacción de producción de ácido ftálico ($ML^{-3}T^{-1}$)

K_{Fen} = Constante de Monod para fenantreno (ML^{-3})

K_{Tol} = Constante de Monod para tolueno (ML^{-3})

k_{Tol} = Constante de reacción para tolueno (ML^{-3})

K_{Fta} = Constante de inhibición por ácido ftálico (ML^{-3})

K_{TolFen} = Constante de reacción de fenantreno en presencia de tolueno (ML^{-3})

K_{TolFta} = Constante de reacción de ácido ftálico en presencia de tolueno (ML^{-3})

K_1 = Constante global de reacción de fenantreno (h^{-1})

K_2 = Constante global de reacción de ácido ftálico (h^{-1})

K_3 = Constante de reacción de ácido ftálico (ML^{-3})

Y_X = Rendimiento = $\frac{\text{Cantidad de biomasa producida}}{\text{Cantidad de sustrato consumido}} = (MM^{-1})$

Y_{CO_2} = Rendimiento = $\frac{\text{Cantidad de } CO_2 \text{ producida}}{\text{Cantidad de sustrato consumido}} = (MM^{-1})$

H = coeficiente global de transporte de fenantreno (T^{-1})

m = Coef. de partición gas - líquido = $\frac{C_g}{C_l} = m$ (-)

δ = espesor de la biopelícula (L)

A – Coeficiente estequiométrico ($\text{mg}_{\text{Fta}} \text{mg}_{\text{Fen}}^{-1}$)

B – Coeficiente estequiométrico ($\text{mg}_{\text{CO}_2} \text{mg}_{\text{Fta}}^{-1}$)

C – Coeficiente estequiométrico ($\text{mg}_{\text{CO}_2} \text{mg}_{\text{Tol}}^{-1}$)

D – Factor de conversión ($\text{mg}_{\text{biomasa}} \text{mg}_{\text{CO}_2}^{-1}$)

x – Coordenada espacial (L)

Subíndices y superíndices:

l – líquido

s – sólido

eq – equilibrio

Fen – Fenantreno

Fta – Ácido Ftálico

Tol – Tolueno

Anexo G. Artículos y presentaciones en congresos derivadas de esta tesis.

- Ortiz I., Auria R., Sigoillot J-C., Revah S. Enhancing Phenanthrene Biomineralization in a Polluted Soil Using gaseous Toluene as a Cosubstrate. 2003. *Environmental Science and Technology*. 37(4): 805-810.

- Ortiz I., Meza J.C., Velasco J.A., Auria R., Revah S. Enhanced biodegradation of hydrocarbons by addition of cosubstrates. En: Magar V.S. & Kelley M.E. (Eds) In situ and on-site bioremediation-2003. Proceedings of the Seventh International Symposium In situ and On-site Bioremediation (Orlando, FL; June 2003) (paper E-21). Battelle Press. Columbus OH.

- Ortiz I., Velasco J.A., Revah S. Hydrocarbon biodegradation in soil using gaseous toluene as cosubstrate. 2004. *Biodegradation*. En prensa.

- Ortiz I., Velasco J.A., Cabanillas D., Revah S. Biodegradación de hidrocarburos en suelo mediante la inyección continua de tolueno como cosubstrato. Presentado en: X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la SMBB. Puerto Vallarta, Jalisco, México. Septiembre, 2003.

- Ortiz I., Auria R., Revah S., Biodegradation of phenanthrene-polluted soil. Effect toluene addition of as a co-substrate. Presentado en: National Science Foundation-Pan American Advanced Studies Institutes: "Innovative Approaches to the in-situ Assessment and Remediation of contaminated sites". US Hazardous Substances Research Center. Río de Janeiro, Brasil, 20 julio- 3 agosto 2002.

- Ortiz I., Auria R., Sigoillot J-C., Revah S. Biodegradation of phenanthrene-polluted soil by a bacterial consortium and by the white rot fungus *Trametes versicolor*. Effect of addition of toluene as a co-substrate. Presentado en: International Conference on Microbiology of hydrocarbons: state of the art and perspectives. Instituto Francés del Petróleo. Rueil-Malmaison, France. 6-7, Junio, 2002.

- Ortiz I., Auria R., Revah S., Simultaneous Biotreatment of toluene in gas phase and phenanthrene in soil. Presentado en: The sixth international symposium on environmental biotechnology. Veracruz, Ver. México. Junio, 2002.

- Ortiz I., Auria R., Revah S., Modelado matemático de la biodegradación de fenantreno en suelo y tolueno en fase gaseosa. Presentado en: IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la SMBB. Veracruz, Ver., México. Septiembre, 2001.