

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**EFECTO DEL TOLUENO EN LA BIODEGRADACION DE
HIDROCARBUROS EN UN SUELO INTEMPERIZADO
CONTAMINADO CON PETROLEO**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Biotecnología

P R E S E N T A

I.B.I. Minerva Elizabeth Maya Yescas

Director de tesis:
Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

FEBRERO 2005

Iztapalapa, D.F. a 10 de Marzo del 2005

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud aprobó la tesis.

**EFFECTO DEL TOLUENO EN LA BIODEGRADACIÓN
DE HIDROCARBUROS EN UN SUELO INTEMPERIZADO
CONTAMINADO CON PETRÓLEO**

Presentó

I.B.I. Minerva Elizabeth Maya Yescas

Director:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Jurado:

**Dr. Sergio Huerta Ochoa
Universidad Autónoma Metropolitana**

**M. en C. Jorge Armando Haro Castellanos
Universidad Autónoma Metropolitana**

**Dra. Mayola García Rivero
Tecnológico de Ecatepec**

La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón Nacional de Posgrado del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 0471-0.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la adición de tolueno en la biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de un suelo intemperizado contaminado con petróleo y en la respiración microbiana. Para cuantificar los HTP en un suelo intemperizado se modificó la técnica del método oficial de la EPA 8440 que se considera como una contribución importante.

Un suelo contaminado con petróleo por más de 100 años e intemperizado (suelo de estudio), fue colectado en un sitio cercano a una refinería localizada en el estado de Veracruz. De la rizósfera de una planta nativa (*Cyperus laxus Lam*) del sitio, se aisló un consorcio microbiano adaptado a concentraciones elevadas de hidrocarburos, el cual se utilizó para estudiar la biodegradación de los HTP.

Se evaluó el efecto de la adición a bajas concentraciones de tolueno (2175, 4350 y 8700 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco) en la biodegradación de HTP y en la respiración microbiana, en el suelo de estudio con 80 000 ppm de HTP, donde se adicionó tolueno, en algunos casos se realizó al momento de inocular y en otros 24 horas antes, lo que favoreció el consumo de oxígeno y duplicó la degradación de HTP con respecto al control sin disolvente. El efecto sobre el consumo de oxígeno y la biodegradación de HTP, debido a la adición de tolueno, es mayor a una concentración de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial

seco que a 2175 y 8700 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco.

Al repetir un experimento, un año después con 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco adicionado 24 horas antes de inocular, se encontró que el efecto de la adición del tolueno es el mismo en la relación biodegradación (biodegradación sin tolueno/biodegradación con tolueno), bajo las mismas condiciones experimentales.

Se obtuvieron los espectros infrarrojos de las muestras con una concentración de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco adicionada y sin tolueno a los 24 y 50 días de cultivo. Encontrando a los 24 días compuestos polares, debido a los productos intermediarios de la biodegradación. A los 50 días, estos compuestos no se encontraron debido posiblemente a la mineralización de los mismos. En 50 días de cultivo se degradó un máximo de 38% de los HTP inicial adicionando tolueno 24 horas antes de inocular, a una concentración de 4350 mg de tolueno/mezcla de suelo artificial seco.

Los resultados obtenidos confirman que es factible el uso de tolueno a bajas concentraciones para mejorar la biodegradación de HTP en un suelo intemperizado, por lo que este tratamiento podría ser aplicable a otros suelos intemperizados altamente contaminados con hidrocarburos, siguiendo la estrategia propuesta.

Dedicatorias y Agradecimientos	i
Resumen	1
Índice de contenido	3
Índice de figuras y tablas	6
Introducción	9
Justificación	13
1 Revisión bibliográfica	
1.1 Composición del petróleo	16
1.2 Suelo contaminado con petróleo y derivados en México	19
1.3 Biodegradación del petróleo	20
1.4 Suelos contaminados e intemperizados y biodisponibilidad	27
1.4.1 Adición de surfactantes y biosurfactantes	29
1.4.2 Adición de disolventes orgánicos	30
1.5 Extracción y cuantificación de HTP	35
1.6 Productos intermediarios durante la biodegradación de hidrocarburos	36
1.7 Respirimetría	38
2. Objetivos	
2.1 General	41
2.2 Particulares	41
3. Hipótesis	42
4. Materiales y Métodos	
4.1 Reactivos	43
4.2 Medios de cultivo	43
4.3 Consorcio microbiano	44
4.3.1 Obtención y conservación	44
4.3.2 Propagación de microorganismos	44
4.3.3 Producción de esporas	45
4.4 Caracterización del suelo intemperizado	45
4.5 Unidad experimental	46

4.5.1	unidad experimental con agrolita	46
4.5.2	unidad experimental con tezontle	47
4.6	Extracción y cuantificación de HTP, en suelos intemperizados	47
4.6.1	Extracción de HTP en suelo intemperizado	47
4.6.2	Cuantificación de HTP por gravimetría	48
4.6.3	Cuantificación de HTP por espectroscopía infrarroja	49
4.7	Espectros de compuestos polares	50
4.8	Estudios de sorción	50
4.8.1	Sorción de HTP en agrolita	50
4.8.2	Sorción del tolueno en función de la humedad	51
4.8.3	Cuantificación del tolueno en la fase gaseosa	52
4.8.4	Sorción del tolueno en la unidad experimental	52
4.9	<i>MÉTODOS ANALÍTICOS</i>	53
4.9.1	pH del suelo	53
4.9.2	Determinación de humedad	54
4.9.3	Cuenta microbiana	54
4.9.4	Carbono Orgánico Total (COT)	55
4.9.5	Cuantificación de asfaltenos	55
4.10	Respirometría	56
4.10.1	Cuantificación del consumo de O ₂ en el respirómetro	56
4.10.2	Cuantificación del consumo de O ₂ y producción de CO ₂ por cromatografía de gases	56
5.	Resultados y Discusión	
5.1	Cuantificación de HTP, en suelos intemperizados	57
5.2	Estudios de sorción	60
5.2.1	Sorción de HTP en agrolita	60
5.2.2	Sorción de tolueno en función de humedad	61
5.3	Efectos en la adición de tolueno	66
5.3.1	En la respiración microbiana	66
5.3.2	En la biodegradación de HTP	78
5.4	Mineralización de hidrocarburos	85
5.5	Espectros de compuestos polares y HTP	87
5.6	Efecto del tolueno en: pH, humedad, cuenta microbiana y carbono orgánico total	89
5.6.1	Cinéticas de pH	90
5.6.2	Cinética de humedad	91

ÍNDICE DE CONTENIDO

5.6.3 Cuenta microbiana	92
5.6.4 Carbono orgánico total (TOC)	94
5.6.5 Concentración de Asfaltenos	95
5.7 Balances de HTP y carbono	96
6. Conclusiones	101
7. Recomendaciones	103
8. Referencias bibliográficas	105

INDICE DE FIGURAS

1	Modelos tridimensionales para los asfaltenos a y b, modelo bidimensional c. Propuestos por Mansoori en 1996.	18
2	Oxidación de hidrocarburos de cadena larga	23
3	Oxidación de hidrocarburos de cadena corta	24
4	Oxidación de 2-metilhexano por <i>P. aeruginosa</i> hasta sus respectivos ácidos	24
5	Catecol, protocatecuato y gentisato	25
6	Partes de un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)	38
5.1	Espectro infrarrojo de i-octano, clorobenceno y hexadecano correspondiente al método EPA 8440	57
5.2	Espectro infrarrojo de los extractos de HTP del suelo de estudio	58
5.3	Comparación entre dos curvas de calibración, (○) la del método EPA 8440 y (◊) la del método propuesto en este trabajo	59
5.4	Isoterma de sorción de HTP en agrolita, en diferentes tiempos	61
5.5	Sorción de tolueno en la unidad experimental con diferente humedad	63
5.6	Velocidad de sorción del tolueno en la unidad experimental a diferente humedad en la mezcla de suelos	65
5.7	Consumo de oxígeno con 2175 y 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno durante las primeras 260 horas	68
5.8	Consumo de oxígeno con 2175 y 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno	69
5.9	Consumo de oxígeno 4350 y 8700 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno a las 260 horas	74
5.10	Consumo de oxígeno con 4350 y 8700 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno	75
5.11	Consumo de oxígeno con 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno	77
5.12	Biodegradación de HTP en ensayos de suelo con dos concentraciones de tolueno y sin tolueno	79
5.13	Biodegradación de HTP con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco, adicionado 24 horas de inocular y sin tolueno	81
5.14	Producción de CO ₂ de ensayos con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco, adicionado 24 horas de inocular y sin tolueno	86
5.15	Espectro de HTP y compuestos polares a los 0 y 24 días de incubar	87
5.16	Espectros de HTP y compuestos polares a los 0 y 50 días de incubar	89

5.17	Mediciones de pH en la unidad experimental con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno	90
5.18	Mediciones de humedad en la unidad experimental con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno	92
5.19	Cuenta microbiana de UFC de suelo en la unidad experimental con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno	93
5.20	Carbono Orgánico Total de suelo en la unidad experimental con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno	95
5.21	Balance general de carbono en la unidad experimental con tolueno	98
5.22	Balance general de carbono en la unidad experimental sin tolueno	98
5.23	Balance general de HTP en la unidad experimental con tolueno	99
5.24	Balance general de HTP en la unidad experimental sin tolueno	100

INDICE DE TABLAS

1	Los géneros más comunes de levaduras, hongos y bacterias que tienen la capacidad degradadora del petróleo.	22
2	Toxicidad de diferentes disolventes en función de Kow	33
5.1	Propiedades fisicoquímicas del suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo	62
5.2	Tiempo aproximado que se requirió para el consumo de sacarosa y la fase de adaptación	70
5.3	Balance de carbono y oxígeno teórico para las fuentes de Carbono	71
5.4	Biodegradación a los 50 días de dos experimentos iguales con un año de diferencia	83

INTRODUCCIÓN

La contaminación forma parte de la vida moderna, una de las causas principales es el uso de combustibles derivados del petróleo, durante el proceso de extracción, manejo y disposición, además al oxidarse liberan al ambiente productos tóxicos para casi todas las formas de vida. Antes esto no parecía complicado, progreso era sinónimo de bienestar social, las industrias no tenían mayor problema para deshacerse de sus residuos puesto que eran vertidos en los cauces de los ríos o dejados a la intemperie (Canby, 1993). Sin embargo cuando la velocidad de producción de residuos supera a la velocidad de desintegración en el ambiente, surge la contaminación; este se agudiza gradualmente en las ciudades industrializadas donde se puede observar en todas sus modalidades: en el aire, en el agua y en el suelo, de modo que el progreso se ha convertido en un sinónimo de daño ecológico.

El tratamiento de un suelo contaminado puede efectuarse en fase sólida o suspensión de suelos (slurry phase). El proceso de biodegradación de hidrocarburos en suelo puede ser controlado por la transferencia de masa. Cuando se trabaja con hidrocarburos en suelos intemperizados (Carmichael y col., 1997) el paso que limita, el proceso es la transferencia de masa. Para incrementar la tasa de desorción de hidrocarburos se ha

propuesto el uso de surfactantes (Lee y Merlín, 1999) y solventes (Castaldi, 1993). Los surfactantes han mostrado efectos contradictorios (Liu y col.,1995) y tienen la desventaja de incrementar la formación de espuma en un reactor con agitación. En cuanto al uso de derivados del petróleo se ha preferido a los de baja toxicidad: aceite de parafina (Jiménez y Bartha, 1996). Villemur y col. (2000) utilizaron aceite de silicón para mejorar la degradación de hidrocarburos poliaromáticos, la adición de 15% de aceite (v/v) a una suspensión con 30% de suelo (p/v) incrementó la biodegradación. Sin embargo, se ha demostrado que la tolerancia de los microorganismos y estimulación de la biodegradación aumenta el espectro de posibles solventes que pueden utilizarse, como es el caso del tolueno (Robertson y Alexander, 1996).

Es poco lo que se ha publicado sobre el tratamiento de suelos intemperizados en fase sólida aplicando solventes para mejorar la biodegradación. Debido a esto surgió como interés de este trabajo: (i) incrementar la desorción de HTP en un suelo intemperizado mediante la adición de un solvente a bajas concentraciones, (ii) incrementar la velocidad de biodegradación de HTP.

El trabajo se realizó en tres partes, en la primera se desarrolló una técnica para cuantificar hidrocarburos totales

del petróleo en un suelo intemperizado, modificando el método EPA 8440, utilizando los propios HTP para una correcta determinación.

Durante la segunda parte, se seleccionó un soporte para la unidad experimental que fue la agrolita. Se cuantificó la sorción de hidrocarburos totales del petróleo, debido a que la agrolita está constituida principalmente por silicato de aluminio, similar a los componentes de las arcillas que retienen hidrocarburos, y se encontró que puede retener una concentración aproximadamente de 70 mg de HTP/g de agrolita seca.

En la tercera parte, se realizaron cinéticas de respiración y biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo en el suelo contaminado, observando el efecto de la adición de bajas concentraciones de tolueno (2175, 4350 y 8700 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco) al inicio del proceso.

Se realizó una investigación utilizando tolueno a bajas concentraciones para cambiar la polaridad del ambiente suelo-agua, influenciando la partición y la consecuente biodisponibilidad de los HTP en un suelo intemperizado. Se adicionó tolueno debido a: (i) disuelve HTP, (ii) es una fuente de carbono y (iii) incrementa la biodisponibilidad de HTP.

Se sabe que algunos solventes en concentraciones altas son tóxicos para los microorganismos. De esta manera, se planteó la siguiente hipótesis: La adición de bajas concentraciones de tolueno al inicio del proceso, favorece la biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo en suelos intemperizados, que resultó verdadera.

JUSTIFICACIÓN

En México, durante los procesos de extracción, refinación, transporte y uso del petróleo, éste es derramado accidentalmente al ambiente todos los años. Lo anterior, representa una problemática que es necesario resolver porque actualmente existen suelos contaminados con petróleo que permanecen largos periodos de tiempo a la intemperie, los cuales son llamados suelos intemperizados porque la fracción más volátil del petróleo se evaporó, lo soluble lixivió a suelo más profundo o aguas subterráneas, y lo fácilmente degradable ha sido biodegradado por los microorganismos nativos. De este modo, se genera un suelo que contiene contaminantes más recalcitrantes que los originales, en donde también se presenta una baja biodisponibilidad tanto de contaminantes como de nutrientes (Tezak y col.,1994), es decir, cuando un compuesto ha permanecido por un largo periodo de tiempo en el suelo tiende a migrar hacia los poros y microporos del suelo, sitios a los cuales no tienen acceso los microorganismos (Alexander, 2000). En este contexto la biodisponibilidad es la facilidad relativa con la que un compuesto puede ser usado por los microorganismos nativos del suelo y se puede entender como la suma del efecto neto entre la desorción y la biodegradación. Así la biodisponibilidad de los compuestos sorbidos es

inversamente proporcional a la tasa de desorción.

Para que éstos compuestos estén disponibles para los microorganismos (biodisponibles) deben difundir para llegar a la superficie del suelo.

En los suelos intemperizados los problemas difusionales de transferencia de masa llegan a controlar los procesos de biodegradación, es decir, los contaminantes no se encuentran accesibles para los microorganismos nativos para su biodegradación, en otras palabras, el contaminante no está biodisponible. Gutiérrez-Rojas (2000), menciona tres estrategias para incrementar la biodisponibilidad de los contaminantes, una de ellas es la adición de disolventes orgánicos. Se ha visto que la biodegradación es proporcional al volumen del disolvente, lo cual se debe a la unión de las bacterias a la interfase disolvente-agua.

Con el fin de favorecer la biodegradación de los hidrocarburos del petróleo se pueden usar disolventes orgánicos (Lin, 1996) que incrementan la transferencia de masa, es decir, que ayudan a dispersar los contaminantes a niveles moleculares, promoviendo la formación de una fina capa, la cual actúa como interfase para la unión de microorganismos degradadores. Sin embargo, poco se ha estudiado en este tema. Heipieper y col. (1994) mencionan que algunas bacterias soportan altas

concentraciones de disolventes tóxicos transformando los ácidos grasos de sus membranas de cis-insaturados por trans-insaturados.

1 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Composición del petróleo

La proporción y composición del petróleo varía de acuerdo a su origen, almacenamiento, refinación y su alteración por las condiciones ambientales. Los compuestos que se obtienen al fraccionar el petróleo crudo ó hidrocarburos totales del petróleo (HTP), pueden clasificarse en cuatro principales grupos de acuerdo a su solubilidad en disolventes orgánicos: alifáticos, aromáticos, polares ó resinas y asfaltenos (Tissot y Welte, 1982). En suelos intemperizados, los hidrocarburos alifáticos incluyen alcanos ramificados (parafinas) y de cadena lineal, además de cicloalcanos con diferente número de anillos y cadenas laterales (Hueseman y Moore, 1993). Estos compuestos son predominantes en un 40-60% del total de los hidrocarburos. Los hidrocarburos aromáticos sencillos, son compuestos como el tolueno, benceno, xileno, naftalenos y bifenilos. Los aromáticos tri y policíclicos, presentes en menor cantidad son: fenantreno, antraceno, criseno benzofluoreno y pireno, los cuales en total representan entre el 20 y 45% del total de los hidrocarburos. Los compuestos polares de bajo peso molecular se forman como consecuencia de la degradación microbiana de compuestos alifáticos y aromáticos (Huesemann y Moore, 1993); en los productos de la biodegradación se han identificado

principalmente cetonas y ésteres, además de cicloalcanos y aromáticos (Riis y col.,1996). Las resinas y los asfaltenos están formados por la fracción policíclica, de alto peso molecular, de los crudos en los que se incluyen átomos de N, S y O; constituyen los extremos pesados del petróleo de alto peso molecular de las series aromáticas, que representan del 10% al 30% de los hidrocarburos en suelos intemperizados.

Brubaker (1991), reportó que los hidrocarburos poliaromáticos están presentes en mezclas de hidrocarburos pesados y particularmente en el chapopote. Estos compuestos son insolubles en agua y se adsorben fuertemente a los sólidos.

Mansoori (1992), reportó que el grupo de los asfaltenos constituye la fracción más pesada en el petróleo y se define como el grupo de compuestos que precipita en presencia de un alcano de punto de ebullición bajo como el n-pentano. Hay una relación íntima entre los asfaltenos, resinas y los hidrocarburos policíclicos de alto peso molecular. Se supone que los asfaltenos se forman como resultado de la oxidación de las resinas naturales. Algunas de las propiedades químicas de los asfaltenos incluyen: (i) su hidrogenación produce hidrocarburos poliheterocíclicos aromáticos (hidrocarburos policíclicos aromáticos con átomos de oxígeno y azufre en cantidades variadas); (ii) un calentamiento por encima de 300-

400°C, los descompone, formando carbono y productos volátiles; (iii) la reacción con ácido sulfúrico forma ácido sulfónico, como podría esperarse basándose en su estructura poliaromática. Se han realizado esfuerzos considerables para caracterizar las moléculas que constituyen al grupo de los asfaltenos (Espinat, 1993; Mansoori, 1996) mediante estudios de estructura química, y análisis elemental. Mansoori (1996), ha intentado postular una estructura modelo basándose en métodos físicos y químicos. En la Figura 1 se muestran las estructuras propuestas para este tipo de compuestos.

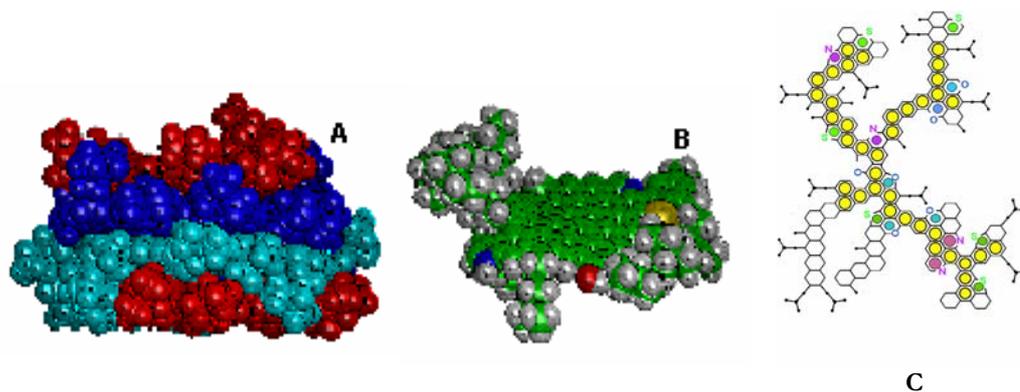


Figura 1 Modelos tridimensionales para los asfaltenos (A y B), modelo bidimensional (C). Mansoori en 1996.

Debido a su complejidad, los asfaltenos, con mucha certeza, son una fracción no biodegradable de los contaminantes en suelos intemperizados (Medina, 1999) y esto explica que frecuentemente se encuentra una cantidad elevada de asfaltenos en los suelos intemperizados (Abelson, 1990).

1.2 Suelos contaminados con petróleo y derivados en México

En México, la producción de petróleo crudo 3 millones 370 mil barriles de producción diaria (Pemex, 2004). Se estima que el 0.9% del petróleo crudo es derramado accidentalmente al ambiente durante los procesos de extracción, refinación, transporte y uso; una parte es derramada al mar, lagos, suelos y a la atmósfera todos los años. En los últimos años, se han tomado medidas para cuidar el medio ambiente, como por ejemplo muchos ductos tienen recubrimientos para reducir la corrosión. Además, el diseño, construcción y manejo de presas de desechos han mejorado y se encuentran mucho menos problemas por filtraciones y escurrimientos (Vinalay, 1998). Respecto a los suelos contaminados, el inventario de suelos afectados disminuyó de 1,575 a 1,497 hectáreas (Petróleos Mexicanos, 2001) debido a las medidas que se tomaron para descontaminar y evitar contaminaciones accidentales, aun así hay grandes áreas que se encuentran contaminadas por la industria petrolera que genera mezclas de hidrocarburos con una gran variedad de características químicas.

Por otra parte, la textura general de un suelo depende de las proporciones de partículas de distintos tamaños que lo constituyen. Las partículas del suelo se clasifican como arena, limo y arcilla.

Las partículas de arena tienen diámetros entre 2-0.05 mm, las de limo entre 0.05 y 0.002 mm, y las de arcilla son menores de 0.002 mm. Probablemente el componente más importante del suelo en relación con la persistencia de sustancias tóxicas son las arcillas. La persistencia de que aumenta en cuanto más pequeñas son las partículas, debido a que aportan una gran área superficial para la absorción de los productos químicos.

Las propiedades químicas del suelo más afectadas por un derrame de hidrocarburos son:

- Aumento del carbono orgánico ya que el 80% del carbono del petróleo crudo es oxidable
- Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos.
- Aumento del manganeso y hierro intercambiable
- Aumento del fósforo disponible (SEMARNAP, 1996).

Se considera la biorremediación como una de las medidas más apropiadas para la restauración de muchos sitios contaminados con hidrocarburos (Ledesma y col., 1994).

1.3 Biodegradación del petróleo

El petróleo es una fuente rica en materia orgánica, y los hidrocarburos que contiene son susceptibles de ser atacados por

diferentes grupos de microorganismos (Murado y col., 1996; Ferrer, 1997; Zhu y col., 2001).

En la mayoría de los casos, la biodegradación de hidrocarburos es un proceso aerobio. Sin embargo, hay evidencias de biodegradación de hidrocarburos en condiciones anaerobias (Reiser-Robers; 1996); también se conocen bacterias y hongos termofílicos capaces de degradar hidrocarburos a temperaturas que oscilan entre los 55° y 77°C.

El trabajo desarrollado por Roldan-Martin (2003), destaca que al emplear grano verde de café en biopilas para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos, con una concentración inicial de 58 000 ppm de HTP y al final de 38 000 ppm, se presenta menor compactación del sistema, se logran niveles altos de remoción y la actividad fúngica se ve incrementada en el sistema.

La biodegradación del petróleo se lleva a cabo por la vía de la oxidación. Para el caso de los hidrocarburos, como alcanos y alquenos, implica la incorporación de oxígeno molecular. Esta asimilación la puede llevar a cabo un gran grupo bacterias, entre las que se encuentran miembros del género *Pseudomonas* y del grupo corineformes y actinomicetos, especialmente de los géneros *Mycobacterium* y *Nocardia* (Parés y Juárez, 1997). En la

Tabla 1 se listan los géneros más comunes de levaduras, hongos y bacterias que tienen la capacidad degradar hidrocarburos de petróleo (Murado y col., 1996; Zhu y col., 2001; Ferrer, 1997).

Tabla 1. Géneros más comunes de levaduras, hongos y bacterias que tienen la capacidad degradadora del petróleo.

Géneros de Levaduras	Géneros de Bacterias		Géneros de Hongos	
	<i>Candida</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Acremonium</i>
<i>Cryptococcus</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Mycobacterium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Graphium</i>
<i>Endomyces</i>	<i>Cytophaga</i>	<i>Nocardia</i>	<i>Aureobasidium</i>	<i>Humicola</i>
<i>Hansenyla</i>	<i>Flavobacterium</i>	<i>Proteus</i>	<i>Beauveria</i>	<i>Monilia</i>
<i>Mycotorula</i>	<i>Achromobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Botrytis</i>	<i>Mortierela</i>
<i>Pichia</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Sarcina</i>	<i>Candida</i>	<i>Paecilomyces</i>
<i>Rhodotorula</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Chrysisporium</i>	<i>Penicillium</i>
<i>Torulopsis</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Spirillum</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Rhodotorula</i>
<i>Trichosporon</i>	<i>Arthrobacter</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Cochlobolus</i>	<i>Saccharomyces</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Spicardia</i>
	<i>Brevibacterium</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Debaryomyces</i>	<i>Tolypocladium</i>
			<i>Fusarium</i>	<i>Trichoderma</i>
			<i>Geotrichum</i>	<i>Verticillium</i>

Fuente: Murado y col., 1996; Ferrer, 1997; Zhu y col., 2001.

Yong y col. en 1992 identificaron el orden en el que se biodegradan los hidrocarburos del petróleo, este orden es el

siguiente: alifáticos de cadena lineal, > alifáticos de cadena ramificada, >compuestos monoaromáticos (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) >compuestos con dos ó más anillos, > los compuestos poliaromáticos.

El tipo más común de oxidación de los hidrocarburos parafínicos (cadena larga), es la oxidación monoterminal hasta un ácido graso, seguido por la β -oxidación de éste último. El primer producto de ésta secuencia es un alcohol primario. Cuando el hidrocarburo capta oxígeno molecular se forma el hidroperóxido intermediario (Figura 2). Esta asimilación puede ser llevada a cabo por grupos diferentes de bacterias, hongos y levaduras (Eweis y col., 1998).

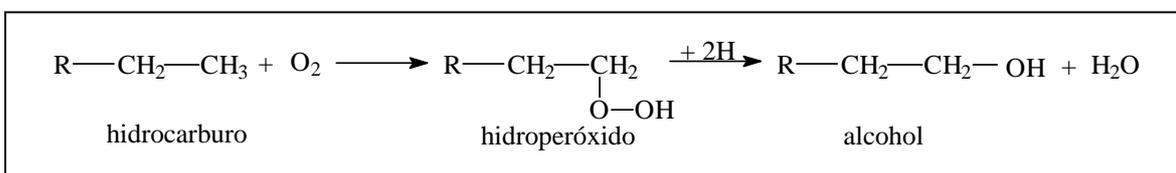


Figura 2. Oxidación de hidrocarburos de cadena larga

Los alcanos de cadena corta, también pueden ser oxidados en la parte subterminal para producir metilcetonas. Este tipo de oxidación se le conoce como oxidación subterminal (Figura 3).

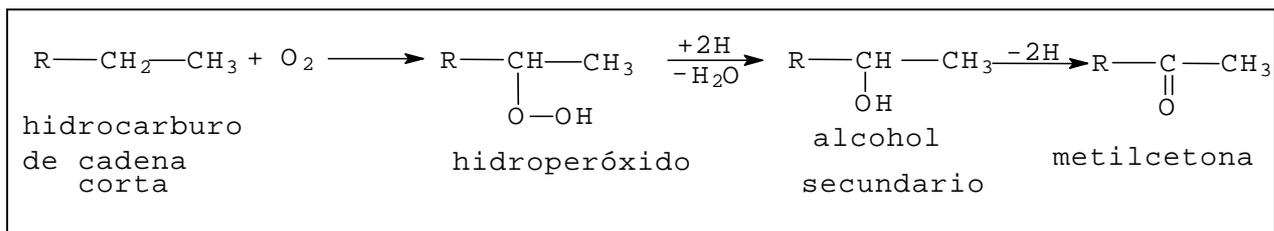


Figura 3. Oxidación de hidrocarburos de cadena corta

Pseudomonas aeruginosa crece sobre 2-metilhexano y produce una mezcla de ácidos, como se muestra en la Figura 4 (Coorson, 1995).

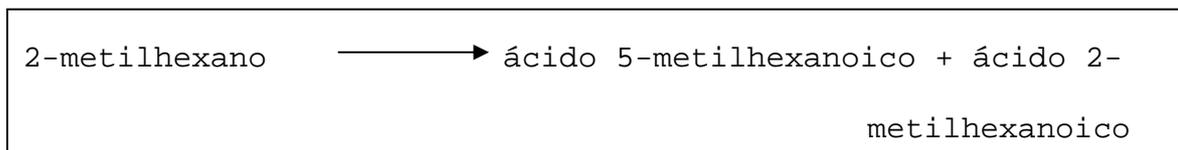


Figura 4. Oxidación de 2-metilhexano por *P. aeruginosa* hasta sus respectivos ácidos

Esto sugiere que el microorganismo debe ser capaz de atacar la cadena de hidrocarburos por cualquiera de los dos extremos. Un fenómeno parecido a la oxidación biterminal se ha descrito en la oxidación del decano y el dodecano por una cepa de *Corynebacterium* (Parés y Juárez, 1997).

La mayor parte de la información disponible sobre la biodegradación de compuestos aromáticos se ha derivado del estudio de especies del grupo *Pseudomonas*, aunque también puede llevarse a cabo por corineformes, actinomicetos y posiblemente, por miembros del género *Spirillum* y bacilos esporógenos facultativos. También por hongos de los siguientes géneros:

Acremonium, Aspergillus, Gliocladium, Graphium, Aureobasidium, Humicola, Beauveria, Monilia, Botrytis, Mortierella, Candida, Paecilomyces, Chrysiopsis, Penicillium, Cladosporium, Rhodotorula, Cochlobolus, Saccharomyces, Cylindrocarpus, Spicardia, Debaryomyces, Tolypocladium, Fusarium, Trichoderma, Geotrichum y Verticillium.

De forma general, la degradación aerobia de un compuesto aromático implica la acción de las enzimas mono y dioxigenasas, que lo transforman en un fenol dihidrico, y se trata por tanto de vías catabólicas convergentes. Algunos de los intermediarios en tales vías, son: el catecol, protocatecuato y el gentisato (Figura 5) (Madigan, 1998).

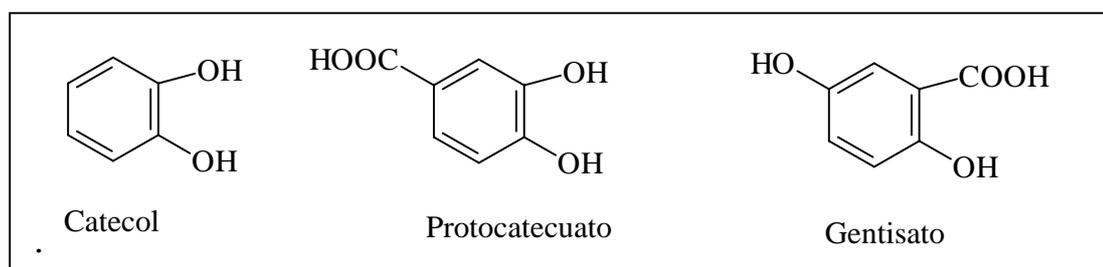


Figura 5. Catecol, protocatecuato y gentisato

Los hongos también han sido evaluados para la degradación de hidrocarburos. Boldu y col. (2002), estudiaron el papel del hongo *Cladophialophora sp.*, en la degradación de benceno, tolueno, etilbenzeno y xileno. El hongo no fue capaz de degradar el benceno, pero degradó los compuestos alcalinizados (tolueno, etilbenzeno y xileno). El mecanismo de degradación

fue una combinación de asimilación y cometabolismo. El tolueno y el etilbenzeno fueron usados como fuente de carbono y energía. En el proceso degradativo actúa la enzima monooxigenasa la cual se encarga de la degradación del tolueno, etilbenzeno y el xileno.

Madigan (1998), reporta cepas bacterianas que pueden utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono, aunque conserven la propiedad de utilizar más rápidamente otros sustratos para el crecimiento. Ciertos hidrocarburos se utilizan únicamente como co-sustratos, es decir, el organismo utiliza otro sustrato como fuente de energía y simultáneamente oxida al hidrocarburo. Este último no es oxidado completamente sino en una o dos etapas. Este mecanismo se conoce como co-metabolismo.

También demostraron que la composición química del petróleo y la temperatura en el cultivo tienen un efecto importante en el consorcio bacteriano y en su eficiencia de biodegradación. Keiji y col. en 1997, reportaron que al realizar la biodegradación de petróleo con bacterias *Acinetobacter T4*, se obtuvo una degradación del 12 al 20%, y para un consorcio aislado del mar (SM8) la degradación fue del 19 al 34%, con diferentes tipos de petróleo (Arabian light, Dubai, Shengli y Maya). Sin embargo, los compuestos saturados con peso molecular mayor de 500 kDa no eran degradados por estos microorganismos.

Gutiérrez-Rojas (2000), reporta que la biodegradación de suelos contaminados con petróleo, en un ambiente natural, puede estar restringida principalmente por tres factores: (i) los microorganismos nativos son deficientes para aprovechar los hidrocarburos como fuente de carbono y/o energía, (ii) la transferencia de masa está limitada (biodisponibilidad) y (iii) los compuestos intermediarios del metabolismo son tóxicos.

1.4 Suelos contaminados e intemperizados y biodisponibilidad

En suelos contaminados por largos periodos que permanecen a la intemperie, los compuestos llegan a ser inaccesibles para los microorganismos por las fuertes interacciones que se producen entre los contaminantes y el suelo. Cuando aumenta el tiempo de permanencia, el contaminante llega a estar progresivamente menos biodisponible para los microorganismos del suelo (Kelsey y col., 1997), las moléculas contaminantes interactúan con los suelos, dependiendo de la naturaleza de las moléculas, del tamaño de partícula (arcillas son menores de 0.002 mm) y de la composición de los suelos que las alojan.

La fase sólida del suelo es una mezcla de materiales inorgánicos que determinan su estructura. La fracción inorgánica está compuesta por fragmentos de rocas y minerales de diferente tamaño y composición. De acuerdo al tamaño, las

fracciones del suelo se clasifican en arena, limo y arcilla. La arena es de tamaño uniforme (0.02 - 2.0 mm) aunque de formas irregulares, es químicamente inerte y no tiene carga eléctrica, por tanto tiene una baja capacidad de intercambio iónico (Kim, 1994). El limo tiene un tamaño intermedio (0.002 - 0.02 mm) y presenta características que están entre la arena y las arcillas. Las arcillas son las partículas más pequeñas (menores de 0.002 mm), posee carga negativa y es el constituyente inorgánico más activo en el suelo. Su presencia confiere al suelo una alta capacidad de intercambio catiónico (Cresser y col., 1993). Las arcillas y la materia orgánica son los constituyentes del suelo que adsorben (superficie externa) y absorben (superficie interna) más compuestos exógenos. Cuando se trata de moléculas de elevado peso molecular, estas se retienen en las superficies minerales por enlaces de hidrógeno y, en el caso de compuestos de bajo peso molecular por intercambio iónico. Las arcillas tipo 1:1, como la kaolinita, tienen menor capacidad de sorción debido a que las moléculas sólo se adsorben en las superficies externas. En las arcillas 2:1, como es la montmorillonita, ocurre tanto adsorción como absorción de contaminantes, incrementándose la capacidad de sorción (Weber y col., 1994). En general, se reconoce que en

suelos con alto contenido de arcillas se favorece la retención de hidrocarburos (Geerdink y col., 1996).

La biodisponibilidad de un contaminante orgánico en un suelo, puede incrementarse por cualquiera de las siguientes vías: (i) adición de surfactantes sintéticos, (ii) uso de biosurfactantes y (iii) adición de disolventes orgánicos (Gutiérrez-Rojas, 2000).

1.4.1 Adición de surfactantes y biosurfactantes

Los surfactantes pertenecen a un grupo heterogéneo de moléculas que tiene la propiedad de reducir la tensión interfacial de las soluciones acuosas y mezclas de hidrocarburos, modificando la solubilidad de los hidrocarburos en agua (Boopathy y Manning, 1999).

Los surfactantes sintéticos frecuentemente aplicados para el lavado de suelos, debido a su alta solubilidad, movilizan contaminantes orgánicos adsorbidos o absorbidos al suelo (Mata-Sandoval y col., 2000). Sin embargo muchos de ellos no han mostrado efectos positivos en pruebas de laboratorio ya que resultan tóxicos a altas concentraciones e inhiben la degradación. Incluso puede ocurrir la formación de un exceso de espuma que dificulta el tratamiento por ejemplo en un biorreactor (Laha y Luthy, 1992). A pesar de estos

inconvenientes, el interés por aplicar surfactantes en el tratamiento de suelos contaminados ha permitido desarrollar novedosas propuestas como es el uso de lecitina de soya (Fava y Gioia, 2001), que es un surfactante fotogénico aplicado para el tratamiento de un suelo artificial contaminado con bifenilos policlorados en un microcosmos de suelo en suspensión.

Los biosurfactantes por otra parte, son exopolímeros producidos principalmente por bacterias, se forman como parte de su estrategia metabólica para crecer sobre sustratos donde la biodisponibilidad es reducida. Los biosurfactantes presentan características similares a los surfactantes sintéticos.

Si bien es posible superar algunos de los inconvenientes mencionados en el tratamiento de suelos con surfactantes, sus costos y su carácter poco específico, entre otros aspectos, promueven la búsqueda de otras alternativas para mejorar la biodisponibilidad y biodegradación de compuestos hidrófobos. En este sentido el uso de los solventes orgánicos es una alternativa.

1.4.2 Adición de disolventes orgánicos

Una alternativa para incrementar la biodisponibilidad en suelos contaminados con petróleo e intemperizados, es adicionar un

disolvente en un suelo contaminado con petróleo. Los hidrocarburos se disuelven, lo que facilita su difusión debido a que las atracciones entre las moléculas de los disolventes orgánicos son aproximadamente del mismo tipo y magnitud que las atracciones entre las moléculas de los hidrocarburos del petróleo.

Con compuestos hidrófobos puros, se demostró (Efroymsen y Alexander, 1991) que la adición de hexametilnonano promueve la degradación de estos compuestos por medio de la adhesión de los microorganismos a la interfase solvente-agua. Resultados similares se obtuvieron en la biodegradación de pireno (Jiménez y Bartha, 1996), con el uso de aceite de parafina; a diferencia del uso de heptametilnonano que provocó la inhibición de la actividad biológica. Estos resultados se explicaron por la formación de emulsiones que contienen a los hidrocarburos a las cuales se adhieren los microorganismos.

Cuando se tratan de mezclas de compuestos en una FLNA, se puede también mejorar la biodegradación por los mecanismos antes mencionados (Birman y Alexander, 1996). Para una FLNA tóxica se ha propuesto como alternativa el uso de sistemas de tres fases: FLNA tóxica, agua y FLNA no tóxica. En este sistema los compuestos se "concentran" en la fase orgánica no tóxica y

entran lentamente a la fase acuosa conforme se consumo en por los microorganismos, en este último se ha usado para penta-clorofenol (Munro y Daugulis, 1998).

Los sistemas de tres fases también han sido aplicados en reactores de suelo en suspensión.

Si los compuestos hidrófobos están en el suelo, como FLNA o sorbidos, el problema es también incrementar su solubilidad. Los solventes orgánicos afectan la lixiviación (Knedi-kizza y col., 1987) y la sorción (Fu y Luthy, 1986) de los contaminantes ya que cambian la polaridad del ambiente suelo-agua-contaminantes alterando la distribución. Con métodos químicos de tratamiento de suelos contaminados se ha demostrado que la extracción de compuestos aromáticos con la mezcla acetona:agua (81% v/v) ha sido altamente eficiente en pruebas piloto (Reiser-Robers,1996). Sin embargo, poco se ha explorado sobre el uso de solventes para mejorar la biodegradación de compuestos contaminantes sorbidos, aunque la extracción con solventes se ha empleado como un complemento a oxidaciones químicas (Nam y col., 1998). Castaldi (1993), sugirió que los solventes (tolueno y compuestos fenólicos) en una fase anaerobia previa a la degradación podría promover la degradación de los compuestos del suelo, sin embargo no reportó resultados sobre sus especulaciones. Villemur y col. (2000)

utilizaron aceite de silicón para mejorar la degradación de hidrocarburos poliaromáticos (PAH), la adición de 15% de aceite (v/v) a una suspensión con 30% de suelo (p/v) incrementó la biodegradación un 17%.

Si se combina la extracción de contaminantes del suelo por disolventes con la biodegradación, la principal restricción puede ser la toxicidad (García-Rivero y col., 2002). Algunos disolventes suprimen o disminuyen el crecimiento y/o el metabolismo de los microorganismos. Una clasificación de los disolventes en cuanto a su toxicidad se basa en el coeficiente de partición octanol/agua ($\log K_{ow}$), comúnmente expresado en forma logarítmica. Compuestos con un $\log K_{ow}$ menor a uno, normalmente no suprimen la actividad microbiana (Tabla 2), pero si el disolvente tiene un $\log K_{ow}$ entre uno y cinco unidades se considera altamente tóxico (Inoue y Horikoshi, 1989).

Tabla 2. Toxicidad de diferentes disolventes en función de K_{ow}

Disolvente	Log K_{ow}	Toxicidad
Dioxano	-1.10	No tóxico
Acetona	0.23	No tóxico
Benceno	2.00	Tóxico
Tolueno	2.40	Tóxico
Xileno	3.10	Tóxico
Decano	5.60	No Tóxico
Tetradecano	7.60	No tóxico

Fuente: Alexander; 1999.

Sin embargo, es difícil hacer una selección de un disolvente basándose sólo en la toxicidad, los disolventes no tóxicos son de tipo polar y por lo tanto, muy poco pueden mejorar la solubilidad en agua de los compuestos hidrófobos.

Se ha encontrado que los disolventes miscibles en agua son tolerados en altas concentraciones por los microorganismos (Catherine y Luthy, 1993). Su aplicación en la biorremediación básicamente se orienta a incrementar la solubilización de compuestos hidrofóbicos y mejorar la biodegradación de los contaminantes.

Por otra parte, se sabe que el efecto dosis respuesta de un disolvente depende de su concentración en la membrana celular y no sólo de la estructura química del disolvente (Isken y col., 1999). Esto implica que cualquier compuesto químico podría ejercer un efecto negativo en concentraciones elevadas, pero a la vez abre la posibilidad de que un microorganismo sea capaz de utilizar compuestos tóxicos o utilizar uno en presencia de otro compuesto tóxico.

Sikkema y col. (1995) reportan que la adición de hidrocarburos aromáticos es tóxica para los microorganismos, porque estos disuelven la membrana celular. Por lo tanto, el factor crítico

de la biodegradación de hidrocarburos aromáticos en sitios contaminados, es la tolerancia a éstos compuestos.

Isken y De Bont (1996) reportaron que cuando el tolueno es adicionado en concentraciones bajas, menores a 1% v/v, éste se acumula dentro de las células por unos minutos y desestabiliza el orden de los lípidos, causando una isomerización de cis a trans en los ácidos grasos insaturados, obteniendo así una barrera más impermeable a los solventes, este mecanismo se conoce como adaptación homeoviscosa. Otros autores (Heipieper y col., 1994; Ramos y col., 1997), reportan que algunas bacterias soportan altas concentraciones de disolventes tóxicos con un aumento en la rigidez de la membrana celular, como resultado del incremento de los niveles de isómeros trans de los ácidos grasos insaturados.

1.5 Extracción y cuantificación de HTP

Para un suelo contaminado con petróleo, la extracción de HTP se realiza por medio de la técnica EPA 3540, un método para la extracción de compuestos orgánicos semivolátiles de los sólidos, se efectúa por medio de un dispositivo Soxhlet que asegura el contacto íntimo de la matriz de la muestra con el disolvente, obteniendo aceites minerales denominados HTP. Una vez obtenidos dichos compuestos, se cuantifican

gravimétricamente, por espectroscopía infrarroja ó cromatografía de gases (Método IMP-QA-620 y EPA 8440).

En la cuantificación de HTP por espectroscopia infrarroja de suelos contaminados con petróleo no intemperizados, el método de la EPA 8440 es apropiado, puede usarse un disolvente que preferentemente no absorba la radiación infrarroja en la región que absorbe la muestra, como por ejemplo con percloroetileno (C_2Cl_4).

1.6 Productos intermediarios durante la biodegradación de hidrocarburos

Durante el proceso de biodegradación de hidrocarburos se forman compuestos intermediarios que contienen grupos carbonilo (cetonas, aldehídos y ácidos), que se detectan por espectroscopía infrarroja en el intervalo de 1950 y 1550cm^{-1} tienen (Volker y col., 1996). La vibración por alargamiento del carbonilo, se caracteriza por absorción en toda esta región; cetonas, aldehídos, ácidos, amidas y carbonatos tienen bandas de absorción alrededor de 1700 cm^{-1} . Los ésteres, tienden a absorber en números de onda ligeramente superiores, es decir, 1770 a 1725 cm^{-1} . La conjugación tiende a hacer descender el pico de absorción en 20 cm^{-1} . Frecuentemente es imposible determinar que tipo de carbonilo está presente basándose solamente en la absorción en ésta región, pero el examen de

otras regiones del espectro puede proporcionar las pruebas necesarias para la clara identificación. Por ejemplo los ésteres tienen una banda de vibración por extensión C-O-R en 1200 cm^{-1} . Las vibraciones hidrógeno de un grupo carbonilo de un aldehído, generalmente produce una banda suave en la región de $2745\text{-}2710\text{ cm}^{-1}$. Las bandas de absorción en la región de $3700\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$ se deben a varias vibraciones de alargamiento de O-H y N-H. Las bandas de O-H a menudo son más anchas que las bandas de N-H.

Lopolito y col., (2000) realizaron ensayos de biodegradación empleando diferentes sustratos orgánicos (petróleo crudo, aceite lubricante y benceno), la biodegradación fue evaluada a través de la estimación de biomasa microbiana (recuento de bacterias viables en caja y consumo de oxígeno) y la concentración de hidrocarburos totales en la fase disuelta (DQO, espectroscopia infrarroja realizándose la extracción con tetracloruro de carbono). Se consideró que el uso de las técnicas antes mencionadas son necesarias para realizar un seguimiento adecuado en la biodegradación de HTP en un suelo contaminado. Un espectroscopio con transformada de Fourier (FT-IR) está compuesto de las partes que se muestran en la Figura 6.

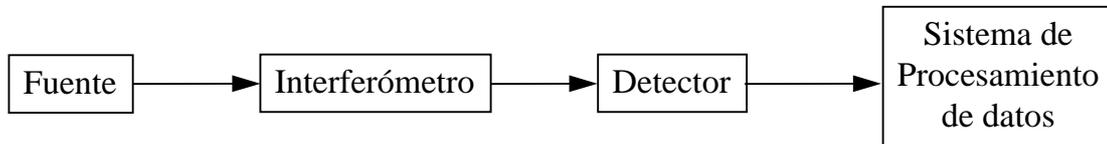


Figura 6. Partes de un espectroscopio infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

La fuente de infrarrojo genera la radiación, la cual llega al interferómetro, y luego es medida por un detector, el cual genera una señal eléctrica que es transportada a un sistema de procesamiento de datos.

La espectroscopía basada en las transformadas de Fourier, difiere de la espectroscopía convencional en que todos los elementos de resolución de un espectro se miden en forma simultánea. En consecuencia, se obtienen aumentos significativos en la relación señal-ruido.

1.7 Respirometría

La biodegradación aerobia de un compuesto puede estimarse por respirometría, cuantificando la actividad metabólica microbiana, por medio del consumo de oxígeno (O_2) y/o la producción de bióxido de carbono (CO_2) (Hinchee y Ong, 1992).

La respirometría, es una técnica basada en la medición del consumo de oxígeno por parte de microorganismos que degradan un sustrato orgánico, hasta oxidarlo a CO_2 . El uso de esta técnica

está encontrando crecientes aplicaciones en la determinación de la cinética de la biodegradación. Los análisis respirométricos permiten adquirir datos sobre el consumo de oxígeno en respuesta al metabolismo de un sustrato por la respiración de microorganismos. La respirometría ahorra el tiempo y el trabajo asociados con los experimentos de agotamiento de sustratos y provee puntos de referencia de alta calidad para la valoración de parámetros biocinéticos.

Aplicaciones de la respirometría:

(<http://www.drcalderonlabs.com/Publicaciones/Respirometria.htm>)

- Para determinar la tasa de consumo de oxígeno en efluentes domésticos e industriales.
- Para determinar la combinación óptima de factores para el tratamiento por Biodegradación en suelos contaminados con Petróleo y/o sus derivados.
- Para determinar la influencia tóxica y el poder inhibitorio de algunos contaminantes sobre las poblaciones microbiológicas en las plantas de tratamiento de aguas residuales.
- Para determinar la efectividad de cultivos microbiológicos y su comportamiento en la digestión de algún sustrato en particular.

- Para determinar las características de biodegradación de productos químicos específicos o de mezclas químicas.
- Para determinar los parámetros cinéticos para las reacciones de Biodegradación.
- Para monitorear la aclimatación de un cultivo de microorganismos a materiales orgánicos refractarios.
- Para medir la actividad de cultivos aeróbicos tanto como anaeróbicos.
- Para determinar la tasa de consumo de oxígeno de plantas, pequeños animales, suelo o muestras de Composta o residuos vegetales.

2 OBJETIVOS

2.1 GENERAL:

Evaluar el efecto de la adición a bajas concentraciones de tolueno en la biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo y en la respiración microbiana en un suelo intemperizado.

2.2 PARTICULARES:

Poner en marcha la técnica para cuantificar hidrocarburos totales del petróleo en un suelo intemperizado

Seleccionar un soporte para la unidad experimental y cuantificar la sorción de hidrocarburos totales del petróleo

Definir y caracterizar una unidad experimental para evaluar la biodegradación y la respiración microbiana a partir de hidrocarburos totales del petróleo.

Realizar cinéticas de respiración y biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo en el suelo contaminado, observando el efecto de la adición de bajas concentraciones de tolueno al inicio del proceso.

3 HIPÓTESIS

La adición de bajas concentraciones de tolueno al inicio del proceso, favorece la biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo en suelos intemperizados.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

Para la preparación de los medios de cultivo se utilizaron reactivos de grado analítico, marca Baker. Los disolventes fueron grado reactivo, marca Baker, con excepción del percloroetileno (Merck).

4.2 Medios de cultivo

La composición del medio de cultivo utilizado para la obtención y conservación del consorcio microbiano, fue: NaNO_3 , 3.0g/L; KH_2PO_4 , 1.0 g/L; KCl , 0.5 g/L; $\text{Mg}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25g/L y solución mineral 2 mL/L. La composición de la solución mineral (% p/v) fue la siguiente: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.015; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.161 y $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.008. El pH del medio de cultivo (MCB) se ajustó a 6.0. El medio de cultivo utilizado para la propagación del consorcio (MCC) tiene la composición arriba mencionada, con pH 6 con excepción de la fuente de nitrógeno se usó NH_4NO_3 .

4.3 Consorcio microbiano

4.3.1 Obtención y conservación

El consorcio microbiano se obtuvo a partir de la rizósfera de una planta nativa (*Cyperus laxus Lam.*), que crecía en el suelo contaminado del sitio de muestreo. El consorcio microbiano se

desarrolló en el medio MCB, como fuente de carbono se adicionaron 6000 mg/L de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), exento de asfaltenos, obtenido del suelo contaminado. El consorcio se incubó a 30°C con agitación a 150 rpm, durante 10 días. El consorcio se conservó en glicerol al 30% a -20°C para su uso posterior. Previamente a partir de este consorcio se aislaron dos hongos identificados como *Penicillium janthinellum* y *Aspergillus caneus*.

4.3.2 Propagación de microorganismos

El consorcio fue producido adicionando 10% (v/v) del cultivo en conservación al medio MCC que contenía 8 000 mg/L extracto de hidrocarburos sin asfaltenos como fuente de carbono. Se emplearon matraces Erlen-Meyer de 250 mL con 50 mL de medio MCC, se incubaron en agitación a 150 rpm y 30°C, durante 10 días.

4.3.3 Producción de esporas

Los dos hongos fueron propagados en medio agar papa y dextrosa (PDA) por 10 días a 30°C en matraces Erlen-Meyer de 250 mL. Las esporas producidas por cada hongo fueron cosechadas usando 50 mL de Tween 80 al 0.01%. La suspensión de esporas se diluyó con agua destilada, en relación 1:10 y se hizo un conteo al

microscopio a 40X. Se contaron 13 cuadros al azar y el promedio de las esporas (esporas/mL) se obtuvo considerando que 25 cuadros contienen 1×10^{-4} mL.

4.4 Caracterización del suelo intemperizado

El suelo se obtuvo en un sitio cercano a una refinería en operación, situada en Minatitlán, Veracruz. Este sitio ha estado contaminado por casi 100 años con desechos de la refinería. El clima de la zona es de tipo ecuatorial con una temperatura que oscila entre los 23 y 30°C. Las lluvias más abundantes se registran entre Julio y Septiembre periodo en el cual el sitio puede inundarse. Las muestras de suelo se tomaron a una profundidad no mayor a 0.50 m, y se secaron a temperatura ambiente y se conservaron en botes de plástico. Las propiedades físico-químicas del suelo se analizaron en el Departamento de Suelos del Laboratorio Central Universitario de la Universidad Autónoma de Chapingo.

Para los experimentos realizados se usó la fracción del suelo malla 8/20 y 20/30 (1:1), la concentración inicial de HTP fue de 233 750 mg HTP/Kg suelo.

4.5 Unidad experimental

Las unidades experimentales se realizaron básicamente con mezcla de suelos (contaminado y sin contaminar) y agrolita o tezontle, también se adicionó: sacarosa (15g/L), medio mineral el cual se adicionó en el volumen necesario para obtener el 50% de humedad. Se incubaron a 30°C, se colocaron en diferentes contenedores que se menciona en cada caso.

4.5.1 Unidad experimental con agrolita

La agrolita se lavó previamente con agua caliente de grifo hasta que se obtuvo un agua de lavado incolora. La agrolita se secó al aire libre y se tamizó con malla 8/20 y 20/30 (1:1). Se realizó una mezcla de suelos de la siguiente manera: por cada gramo de agrolita, se adicionó 1.2 g de suelo contaminado seco (233 750 mg HTP/Kg de suelo) y 1.3 g de suelo arenoso seco (obteniendo una mezcla de suelo artificial seco con una concentración de 80 000 ppm de HTP). Todo se tamizó con malla 8/20 y 20/30 (1:1), la mezcla se inoculó 20% v/p de consorcio microbiano.

4.5.2 Unidad experimental con tezontle

El tezontle se tamizó con malla 8/20 y 20/30 para preparar una mezcla en proporción (1:1).

Se realizó una mezcla de suelos de la siguiente manera: por cada gramo de tezontle se adicionó 0.5g de suelo contaminado seco (233 750 mg HTP/Kg de suelo), 0.5g de suelo arenoso seco (obteniendo una mezcla de suelo artificial seco con una concentración de 60 000 ppm de HTP). Todo tamizado con malla 8/20 y 20/30 (1:1), la mezcla se inoculó con 10% v/p de consorcio microbiano.

4.6 Extracción y cuantificación en suelos intemperizados

4.6.1 Extracción de HTP en suelo intemperizado

Se siguió el método oficial de la EPA 3540. Cinco gramos de suelo seco contaminado se colocaron en cartuchos de celulosa (135 X 80 mm), se adicionó sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). A cada cartucho, se puso un tapón de algodón y se presionó ligeramente. El cartucho se colocó en un equipo de extracción Soxhlet de 250 mL, y se adicionaron 160 mL de una mezcla de solventes hexano-acetona (1:1 v/v). Cada muestra se mantuvo en reflujo de 16 a 24 horas, a 72°C. A cada muestra se eliminó la mezcla de disolventes en un rotavapor a 72°C, evitando sequedad y finalmente el extracto de HTP de cada muestra se colocó en una charola de aluminio a peso constante. El exceso de solvente se evaporó en una campana de extracción hasta sequedad. Las

muestras se colocaron en un desecador, y luego se realizó la determinación gravimétrica y espectroscópica en infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR).

4.6.2 Cuantificación de HTP por gravimetría

La concentración de HTP (base seca) en el suelo contaminado, se estima mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{HTP}] = \frac{W_{\text{CH+HTP}} - W_{\text{CH}}}{W_{\text{MC}}}$$

Donde:

$W_{\text{CH+HTP}}$ peso seco de los HTP y la charola
 W_{CH} peso seco de la charola
 W_{MC} peso de la muestra de suelo contaminado.

En cada unidad experimental se determinó la concentración de HTP por gravimetría y por espectroscopía infrarroja para conocer el contenido de HTP durante todo el proceso.

4.6.3 Cuantificación de HTP por espectroscopía infrarroja

La cuantificación de HTP se realizó con una variación al método oficial EPA 8440. Para el método EPA se realizó una curva de calibración con una mezcla de 15 mL de n-hexadecano, 15 mL de i-octano y 10 mL de clorobenceno disueltos en tetracloruro de etileno ó percloroetileno (C_2Cl_4) y se leyó en el en un rango de 3000-2830 cm^{-1} , que es la señal que corresponde a la presencia de enlaces C-H, por espectroscopia infrarroja (IR).

La variación consistió en usar los propios extractos de HTP del suelo disueltos en tetracloruro de etileno y diluirlos para la realización de la curva estándar (750 y 18000 mg de HTP por litro de percloroetileno). En la sección 5.1 se muestran las diferencias de cada método.

Se usó un espectroscopio infrarrojo con transformadas de Fourier de la serie 2000 (Perkin-Elmer).

Los espectros fueron obtenidos bajo las siguientes condiciones de operación:

Longitud de onda máxima:	3500 cm ⁻¹
Longitud de onda mínima:	2200 cm ⁻¹
No. de barridos:	12
Resolución:	4 cm ⁻¹
Técnica de cálculo	Área bajo la línea base

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

$$(\text{mg HTP/Kg suelo}) = \left(\frac{\text{mg HTP}}{\text{litro de C}_2\text{Cl}_4} \right) \left(\frac{\text{volumen de aforo con C}_2\text{Cl}_4}{0.009 \text{ kg suelo (contenido de suelo)}} \right)$$

El valor de 0.009 se refiere al tamaño de cada muestra que fue de 9 gramos.

El rango de longitud es mayor porque se identificó la presencia de los compuestos polares que se mencionan en la siguiente sección.

4.7 Espectros de los compuestos polares

La identificación de compuestos polares se realizó bajo las condiciones de operación mencionadas en la sección 4.6.3.

4.8 Estudios de sorción

4.8.1 Sorción de HTP en agrolita

Los ensayos de sorción de HTP en agrolita se realizaron por duplicado, colocando en matraces Erlen-Meyer de 250 mL, 10 mL de tolueno, un gramo de agrolita deshidratada y diferentes concentraciones de extracto de hidrocarburos, (0, 50 000, 100 000 y 200 000 mg HTP/Kg agrolita), se agitaron con espátula durante 2 minutos. Los ensayos se mantuvieron en agitación a diferentes tiempos 0, 6, 12, 24 y 48 horas a 150 rpm a 30°C, se filtraron, y la agrolita se lavó con tolueno para arrastrar a los hidrocarburos no sorbidos, se usó el tolueno, debido a que tiene una polaridad similar a la de los HTP. El tolueno se evaporó a temperatura ambiente y el extracto de hidrocarburos se aforó a 10 mL con percloroetileno. Los hidrocarburos extraídos de la agrolita se cuantificaron por espectroscopía infrarroja como se describe en la sección 4.6.3.

4.8.2 Sorción del tolueno en función de la humedad

En la unidad experimental que se describe en la sección 4.5.1. se realizó en frascos serológicos de 165 mL cerrados con tapa

hermética de teflón Mininert® con 11 gramos de la mezcla de suelo artificial, ocupando un volumen de 28 mL. Para inhibir el crecimiento microbiano se adicionó 1%(v/p) de cloruro mercúrico (April y Abbott, 1998).

Las unidades experimentales contenían: (i) suelo a diferente humedad (0%, 25%, 50% y 75%) con medio mineral y (ii) tolueno. La concentración de tolueno que se le adicionó a todos los ensayos fue de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial. El tolueno se midió en la fase gaseosa por cromatografía de gases como se menciona en el siguiente párrafo, en diferentes tiempos (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24 y 48 horas). Se realizó por triplicado.

La adición de cloruro de mercurio fue para eliminar la interferencia de los microorganismos y realizarlo en condiciones abióticas.

4.8.3 Cuantificación del tolueno en la fase gaseosa

Inicialmente se realizó una curva estándar del tolueno. A cada frasco serológico con válvulas Mininert® tapa de teflón, se le adicionó diferentes concentraciones de tolueno (30 a 120 ppm), y se le midió en la fase gaseosa el tolueno con un cromatógrafo de gases SRI 8610 equipado con un detector de ionización de flama (FID) y columna capilar de metil-silicón. Las condiciones

de operación fueron: gas acarreador helio a un flujo de 6.4 mL/min; temperatura del inyector y horno 117°C, del detector 115°C.

4.8.4 Sorción del tolueno en la unidad experimental

Las unidades experimentales se realizaron en base a la sección 4.5.1, en frascos de 500 mL con 55 gramos de mezcla de suelo artificial seco, se adicionó 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco, 24 horas antes de inocular y se realizaron dos variaciones: (i) Se inculó con el consorcio microbiano y medio de cultivo, se agitó manualmente se dejó abierto durante una hora, se cerró herméticamente y se colocó en el respirómetro, (ii) se inculó como se describe en el caso anterior, se agitó manualmente se cerró herméticamente y se colocó en el respirómetro.

Se verificó que en los ensayos abióticos no hubiera actividad microbiana siguiendo el consumo de oxígeno (sección 4.10.1) y concentración de tolueno en la fase gaseosa (4.8.3). Se midió el consumo de oxígeno cada 4 horas y el tolueno en la fase gaseosa, en intervalos de tiempo de 0, 24, 48, 72, 144 y 168 horas.

4.9 Métodos Analíticos

4.9.1 pH del suelo

La determinación potenciométrica de la actividad de H⁺ en una suspensión de suelo en agua se realiza de acuerdo al siguiente procedimiento (García, 1981): se pesa 10g de suelo seco malla de 2 mm en un matraz, se añade 25 mL de agua destilada, después se agita durante un minuto, se dejó reposar durante una hora y se midió el pH en el sobrenadante.

4.9.2 Determinación de humedad

En una charola de aluminio, a peso constante, se colocaron de 5 a 10 g de mezcla de suelo artificial húmeda, se secaron en una estufa a 60°C durante 24 horas y se pesó la muestra seca. Se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Humedad} = (\text{PMH} - \text{PMS} / \text{PMH}) * 100$$

Donde:

PMH: Peso de muestra húmeda

PMS: Peso de muestra seca

4.9.3 Cuenta microbiana

La cuenta de células viables se realizó por triplicado mediante la técnica de dilución en serie y subsiguiente plaqueo en agar de soya tripticaseína (AST Bioxon®). Para preparar las diluciones se emplearon 3 mL de suspensión microbiana y se

diluyó en 27 mL de solución salina al 0.95% (p/v). Las cajas se inocularon con 0.1 mL de suspensión microbiana que se distribuyó sobre la superficie de agar con una varilla de vidrio. Las cajas de Petri se incubaron a 30°C durante 72 horas. Se contaron la unidades formadoras de colonias (UFC) en la caja con una dilución que tuviera entre 25 y 100 UFC. Las células viables, se reportan como UFC/mL calculadas de acuerdo a la siguiente fórmula:

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

4.9.4 Carbono Orgánico Total (COT)

Para cuantificar el carbono orgánico total (COT) en cada unidad experimental, con 11 gramos de mezcla de suelo artificial de los frascos serológicos, con las condiciones que se mencionan en la sección 4.5.1 en diferentes tiempos (0, 72, 144, 216, 436, 480, 576, 720, 960 y 1 200 horas). Por duplicado.

Se filtró con papel filtro (Whatman 40) al vacío se lavó con 10 mL de agua destilada y esterilizada, y el filtrado se midió en el analizador Shimadzu TOC-5000 que muestra la concentración en partes por millón (ppm).

4.9.5 Cuantificación de asfaltenos

Se fraccionó a partir de los HTP, por insolubilidad en pentano caliente (Baugh, 1993). Se colocaron de 0.25 a 0.5g de extracto

de HTP en un vaso de precipitado y posteriormente se adicionaron 20 mL de n-pentano en ebullición, con la finalidad de precipitar los asfaltenos. El precipitado se filtró al vacío con papel Whatman 42 realizando de 3 a 5 lavados con 10 mL de n-pentano en ebullición. Finalmente los asfaltenos se cuantificaron gravimétricamente.

La fracción de asfaltenos (F_{asf}) presente en los HTP de muestras sólidas contaminadas, se estimaron mediante la siguiente ecuación:

$$F_{asf} = \frac{(W_{pasf} - W_p) + (W_{vasf} - W_v)}{W_{ext-asf}}$$

Donde:

W_{pasf}	peso seco del papel filtro con asfaltenos
W_p	peso seco del papel filtro
W_{vasf}	peso del vaso de precipitado con asfaltenos
W_v	peso seco del vaso de precipitado
$W_{ext-asf}$	peso seco del extracto de HTP iniciales empleado en la determinación de los asfaltenos

4.10 Respirimetría

4.10.1 Cuantificación del consumo de oxígeno con respirómetro

A cada unidad experimental que indica en las secciones 4.5.1 y 4.5.2, se le adicionó tolueno a diferentes concentraciones (2175, 4350 y 8700 mg HTP/Kg mezcla de suelo artificial), en frascos de 500 mL, con 55 g de mezcla de suelo artificial seco, y se cuantificó con un respirómetro N-CON (Comput-Ox 244).

cuyo funcionamiento se basa en la caída de presión generada durante la respiración, en presencia de KOH. La interpretación de datos se realiza utilizando un programa computacional.

4.10.2 Cuantificación del consumo de O₂ y producción de CO₂ por cromatografía de gases

El consumo de oxígeno (O₂) y el CO₂ producido por la degradación de hidrocarburos en los frascos serológicos se cuantificó con tapa de teflón Mininert®, con un cromatógrafo de gases SRI 8610 equipado con un detector de conductividad térmica, columna Porapak Q malla 80/100 de 2 metros de longitud y diámetro interno 1/8 pulgada. Las condiciones de operación fueron: gas acarreador helio, temperatura del inyector 100°C, del horno 35°C y del detector a 100°C.

5. Resultados y Discusión

5.1 Cuantificación de HTP en suelos intemperizados

Se puso en marcha una técnica para cuantificar HTP en un suelo intemperizado. Que consistió en usar los extractos de HTP del suelo contaminado diluidos en percloroetileno (C_2Cl_4) y posteriormente se realizó la lectura de las bandas de absorción de metilos y metilenos (2950 a 2930 cm^{-1}). Se comparó con el método de la EPA 8440 que consiste en medir HTP de suelos contaminados. Se realizó una curva de calibración con n-hexadecano, i-octano y clorobenceno. En la Figura 5.1 se muestra un espectro infrarrojo de la curva de calibración del método de la EPA 8440 a diferentes concentraciones.

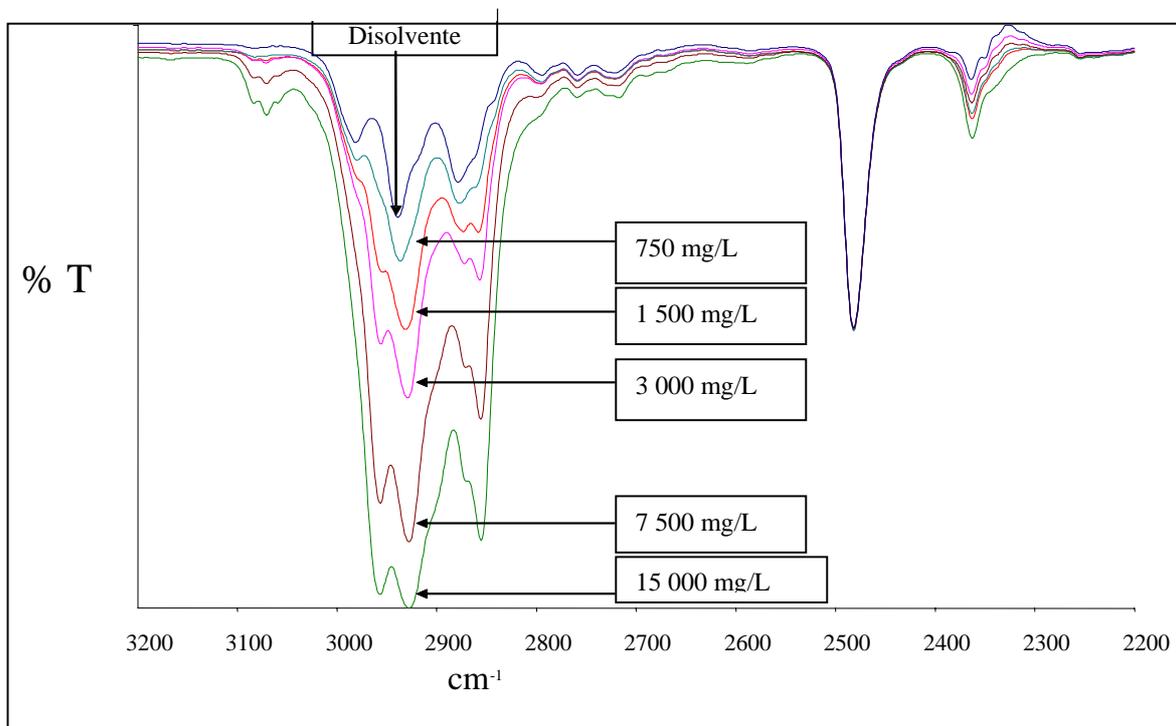


Figura 5.1 Espectro infrarrojo de i-octano, clorobenceno y hexadecano correspondiente al método EPA 8440

En la Figura 5.2 se muestra el espectro infrarrojo de los extractos de HTP del suelo de estudio.

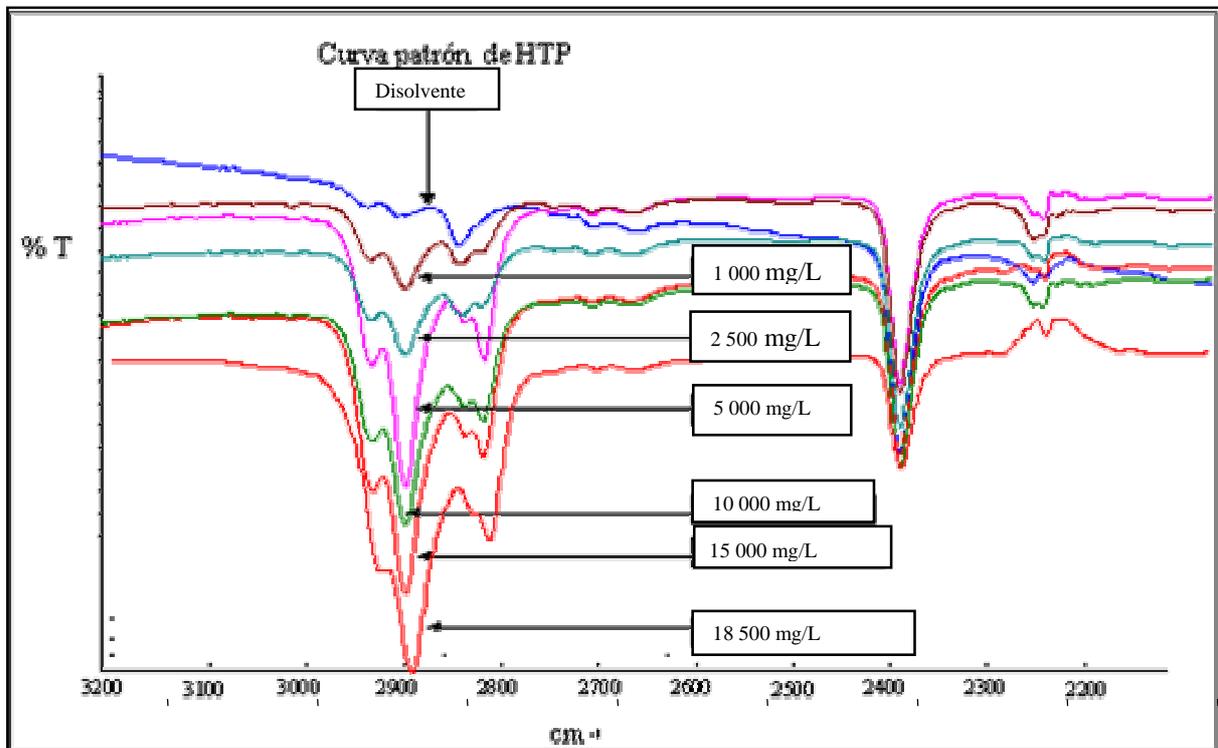


Figura 5.2 Espectro infrarrojo de los extractos de HTP del suelo de estudio

Los espectros de las figuras 5.1 y 5.2 son aparentemente similares y al realizar la curva estándar de cada una para cuantificar HTP se aprecia la diferencia en las pendientes, de las curvas obtenidas por ambos métodos (Figura 5.3). Con el método EPA, la pendiente fue $0.007(\%T \text{ L/cm}\cdot\text{mg})$ y la pendiente de la curva con los extractos de HTP del suelo en estudio es de $0.001(\%T \text{ L/cm}\cdot\text{mg})$.

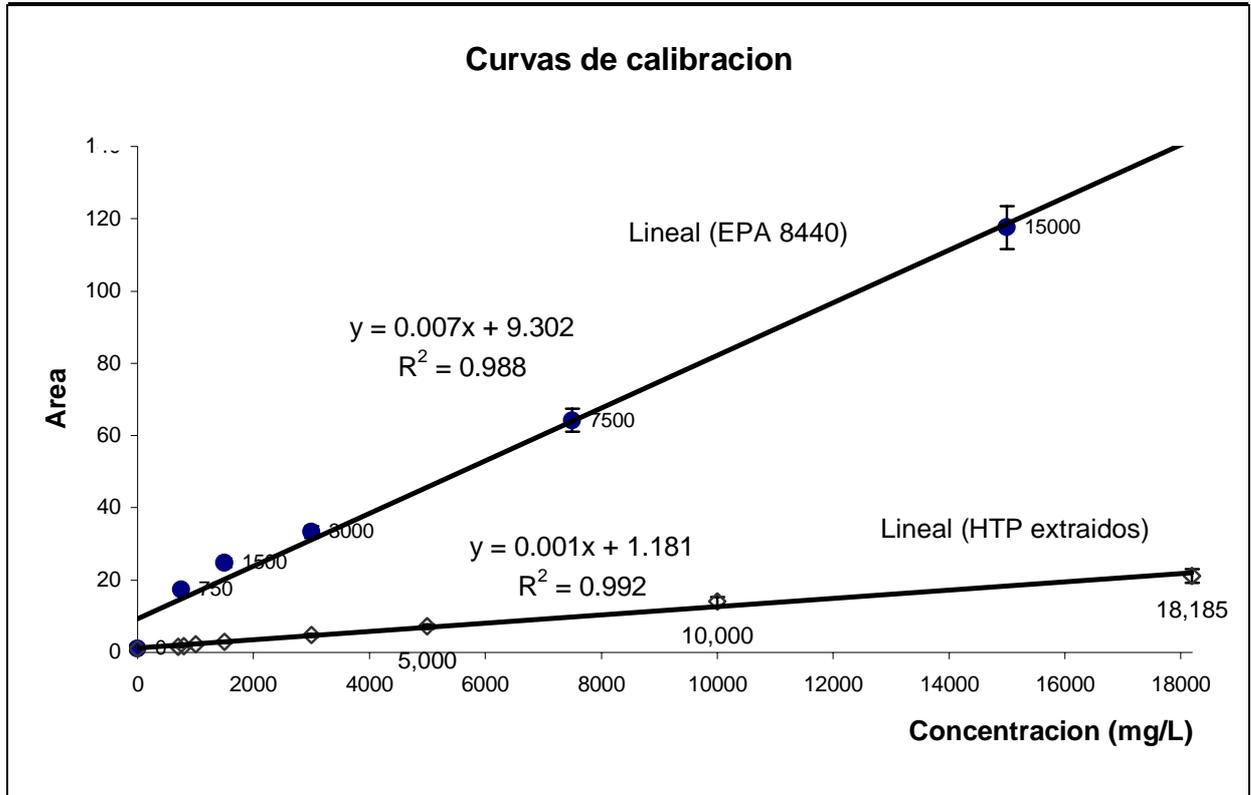


Figura 5.3 Comparación entre las curvas de calibración, (●) Método EPA 8440 y (◇) Método propuesto en este trabajo

La diferencia es notoria, el método EPA 8440 es 7 veces mayor que el método propuesto en este trabajo, además de que es de gran ayuda para medir la biodegradación de HTP en condiciones similares a la del suelo de estudio, por lo que en adelante esta curva de calibración se utiliza para este trabajo. Cabe destacar que el suelo de estudio es un suelo contaminado con petróleo y expuesto a la intemperie por casi 100 años. Por lo que la concentración de metilos y metilenos ha variado debido a: (i) los microorganismos nativos consumieron los hidrocarburos alifáticos de cadena más corta, (ii) los hidrocarburos más

volátiles podrían haber disminuido (Volker y col.,1996), por esa razón las pendientes son diferentes, la del método EPA 8440 es para un suelo contaminado recientemente.

5.2 Estudios de sorción

5.2.1 Sorción de HTP en agrolita

La agrolita está constituida principalmente por silicato de aluminio, similar a los componentes de las arcillas. Debido a esto, es probable que la agrolita muestre una sorción de hidrocarburos similar a la observada en la arcilla (Geerdink y col., 1996).

Se realizó una isoterma de sorción en agrolita, variando la concentración de HTP y manteniendo constante la cantidad de agrolita (Sección 4.8.1). Se eligió como límite superior una concentración de HTP similar a la del suelo contaminado (233 mg de HTP por gramo de suelo seco). Como disolvente de los HTP se utilizó tolueno, el valor de su constante dieléctrica (2.38 @ 25°C) es ligeramente polar, los HTP que son una mezcla de compuestos de diferente polaridad en conjunto probablemente se comporten como un compuesto ligeramente polar, y se disuelvan completamente.

En la Figura 5.4, se observa que las curvas de sorción tienen un comportamiento similar, es decir, las pendientes son

similares. A las 24 y 48 horas de exposición, la sorción de HTP en la agrolita tiende al equilibrio y una concentración aproximadamente de 70 mg de HTP/g de agrolita, posiblemente los HTP que sorbe la agrolita al adicionar tolueno se encuentran más biodisponibles, debido a la alta porosidad de la agrolita.

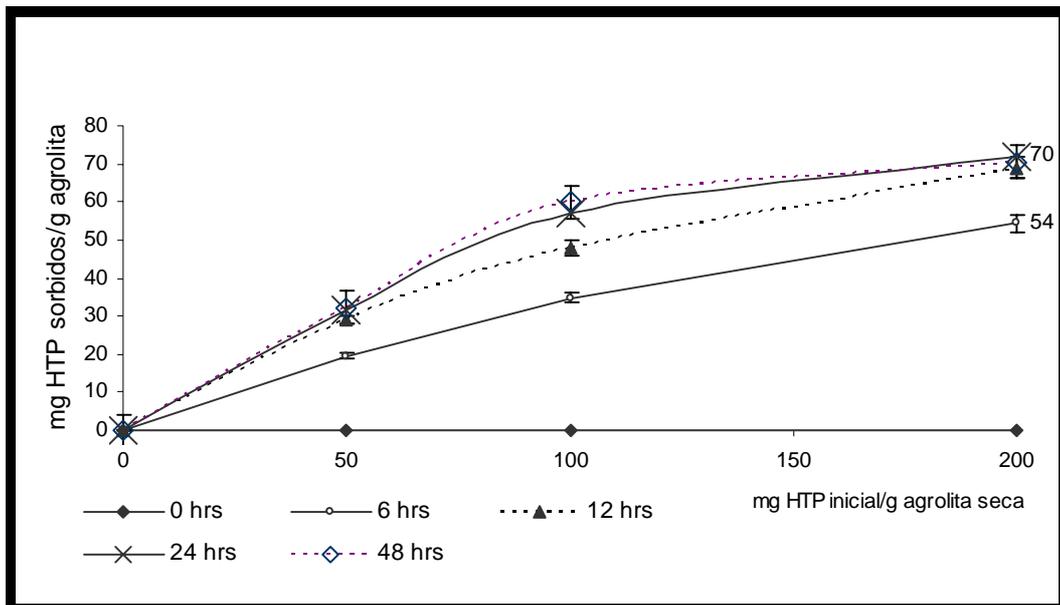


Figura 5.4 Isoterma de sorción de HTP en agrolita, en diferentes tiempos.

5.2.2 Sorción de tolueno en función de la humedad

Se realizaron los ensayos abióticos para determinar si la humedad en la unidad experimental afecta la sorción del tolueno que se adiciona, y también observar la sorción del tolueno.

En la Tabla 5.1, se muestra el análisis de las propiedades fisicoquímicas del suelo contaminado con petróleo usado en este

trabajo. Se encontró que se trata de un suelo de tipo franco-arenoso.

Tabla 5.1 Propiedades fisicoquímicas del suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo

CEC ^A	pH	% Arena	% Limo	% Arcilla	% Materia Orgánica
0.30	3.88	53.84	33.12	13.04	3.9

^A Capacidad de intercambio catiónico, en miliohms/mL.

En el suelo de estudio la mayor proporción fue de arena, componente inerte que no presenta interacción con los hidrocarburos (Kim, 1994). La arcilla, que es el componente más activo, se encontró en baja proporción. Tanto la arcilla como la materia orgánica pueden ser responsables de la adsorción de hidrocarburos (Hasset y Wagne, 1989).

En la Figura 5.5 se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de tolueno en la fase gaseosa (Sección 4.8.2) se adicionó a una concentración de 4 350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco con diferentes humedades (25%, 50% 75%) y también suelo seco.

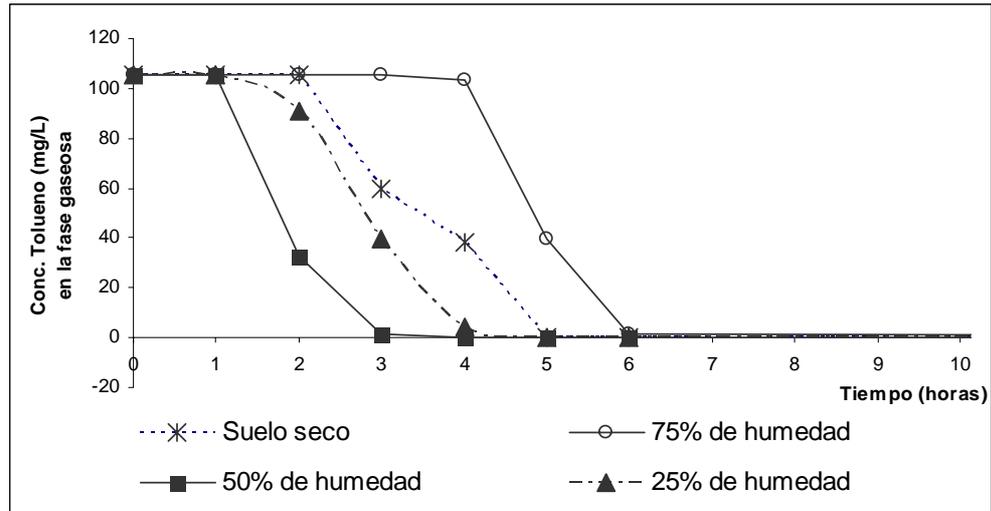


Figura 5.5 Sorción de tolueno en la unidad experimental con diferente humedad

Las mediciones se realizaron durante 48 horas, pero como los valores obtenidos fueron constantes después de las 8 horas en todos los casos, se presentaron los resultados hasta las 10 horas, estos resultados son para apreciar que a diferentes humedades si afecta la sorción del tolueno y también se puede apreciar que el tolueno en todos los casos es sorbido por la mezcla de suelo y el tolueno no se queda en la fase gaseosa después de las 7 horas.

Arocha y col. (1996) reportaron que la sorción de un solvente en un suelo ocurre en 2 etapas independientemente de la humedad del sistema: (i) sorción rápida debido a la difusión y absorción en macroporos de la clasificación según la IUPAC, macroporos $d > 500 \text{ \AA}$, agrolita y (ii) sorción lenta controlada por la difusión y absorción en los microporos internos.

En el sistema de estudio, el tolueno puede distribuirse en el suelo artificial, HTP, fase líquida y fase gaseosa, es decir:

- Se requieren 1.53 g de tolueno para disolver 1 g de HTP (García-Rivero y col., 2002).
- En un litro de agua se disuelven 500 mg de tolueno
- En la fase gaseosa se pueden disolver 115 mg tolueno/L de aire. Para el sistema de estudio este dato se determinó experimentalmente.

En las primeras 7 horas los componentes del sistema se distribuyen de la siguiente manera: (i) El tolueno lo sorbe la mezcla de suelo artificial, (ii) El tolueno disuelve los HTP y (iii) El tolueno se disuelve en el medio de cultivo. Esto sugiere que sería conveniente adicionar el tolueno a la unidad experimental antes de inocular y de esta manera presenta una menor toxicidad para los microorganismos.

A partir de las cinéticas de adsorción de tolueno, se estimó la velocidad de sorción a diferente humedad por medio de la pendiente obtenida en cada caso. En la Figura 5.6 se muestran las velocidades de sorción en función de la humedad.

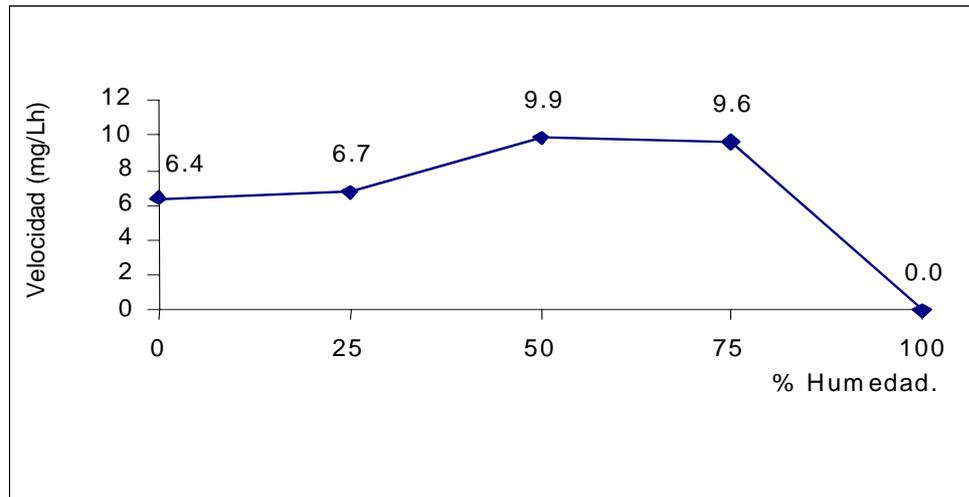


Figura 5.6 Velocidad de sorción del tolueno en la unidad experimental a diferente humedad en la mezcla de suelos

Basándose en los resultados obtenidos, se puede afirmar que el tolueno a una concentración de 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco, se absorbe en las primeras 8 horas y no se pierde por evaporación.

En el ensayo del suelo artificial seco es más rápida la sorción del tolueno que con la mezcla de suelo artificial de 75% de humedad debido a que los poros no están ocupados por agua.

En los frascos serológicos con tolueno únicamente, la fase gaseosa mantuvo en la saturación con 105 mg tolueno/L, valor próximo al de la saturación.

En los frascos serológicos con medio de cultivo que ocupó el mismo volumen que los que contenían mezcla de suelo artificial, la fase gaseosa se mantuvo en la saturación debido a que una

parte se disolvió en el medio de cultivo (un litro de agua se disuelven 500 mg de tolueno) quedando tolueno sin disolverse el cual se evapora a 30°C, saturando el aire en ese espacio(137 mL).

A continuación se presentan ensayos en la unidad experimental con microorganismos, para evaluar el efecto de la adición de tolueno a bajas concentraciones, en el metabolismo microbiano y en la biodegradación de HTP de un suelo contaminado e intemperizado.

5.3 Efectos en la adición de tolueno

5.3.1 En la respiración microbiana

El tolueno es biodegradado por los microorganismos a bajas concentraciones y los microorganismos pueden soportar hasta una concentración de 0.3% v/v en medio líquido mientras que en medio sólido puede soportar una mayor concentración (10% v/p) debido a que el suelo puede ser un secuestrante del tolueno y es menos tóxico para los microorganismos (Ramos y col.,1997).

Para evaluar el efecto del tolueno sobre la respiración de los microorganismos en un suelo contaminado e intemperizado se realizaron tres experimentos en todos se adicionó una concentración de tolueno de 4350 mg/Kg de mezcla artificial de suelo y se comparó con: (i) una menor concentración (2175 mg/Kg

de mezcla artificial de suelo) (ii) una mayor concentración (8700 mg/Kg de mezcla artificial de suelo) y (iii) se adicionó tolueno al momento de inocular y/o 24 horas antes de inocular. Todos con su respectivo control (sin tolueno).

En el experimento donde se realizó con concentraciones: 4350 y 2175 mg de tolueno/Kg de mezcla artificial de suelo. La adición se efectuó al momento de inocular y 24 horas antes de inocular además de un control (sin tolueno). En frascos de 500 mL con 55 gramos de mezcla de suelo artificial seco, en base a la Sección 4.8.1., con 20% de inóculo (consorcio microbiano). Unos ensayos se colocaron en el respirómetro y otros ensayos en la estufa; todos a 30°C, durante 50 días.

Se midieron las siguientes variables de respuesta: consumo de oxígeno por respirometría (Sección 4.10.1), concentración de HTP (Secciones 4.6.2 y 4.6.3), presencia de compuestos polares (Sección 4.7). Al principio y al final de los experimentos se midió la concentración de asfaltenos (Sección 4.6.4).

Los resultados del consumo de oxígeno se muestran en las Figuras 5.7 y 5.8.

En la Figura 5.7, se muestran las primeras 240 horas del experimento.

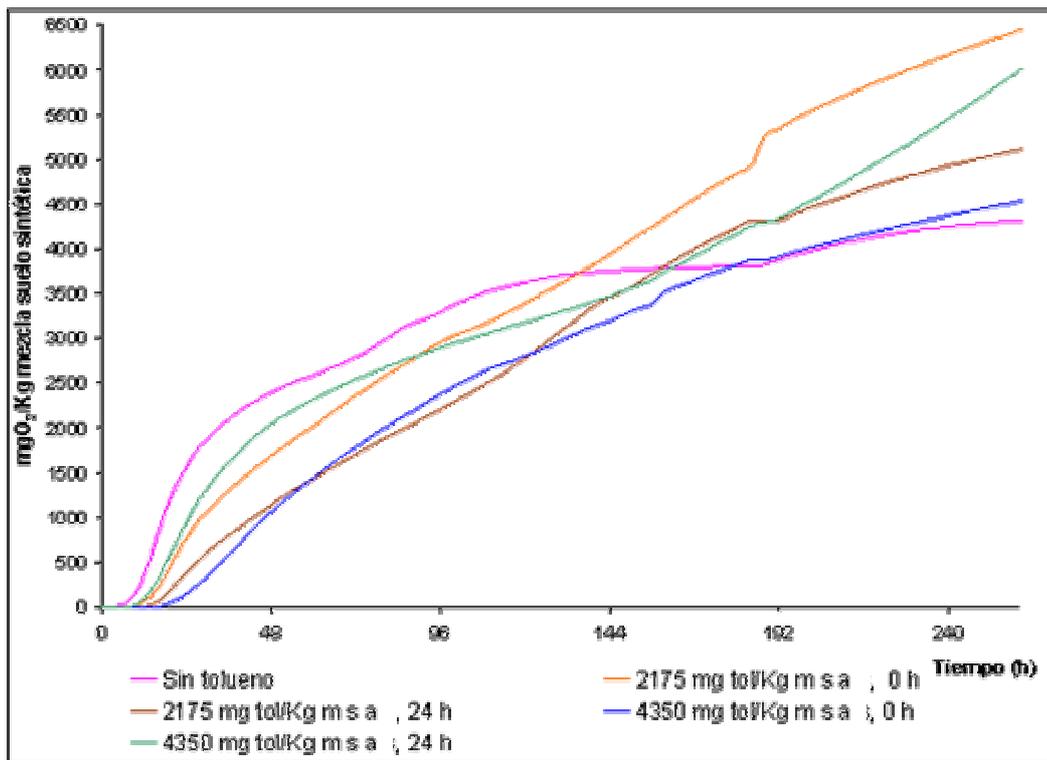


Figura 5.7 Consumo de oxígeno con 2175 y 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial y sin tolueno durante las primeras 260 horas.

La adición del tolueno al momento de inocular se indica con 0 h, y para la adición del tolueno 24 horas antes de inocular se indica con 24 h.

En la Figura 5.8, el número que se muestra se refiere a los miligramos de oxígeno que consumió en 50 días por kiligramo de mezcla de suelo artificial (mg O₂/Kg m s a).

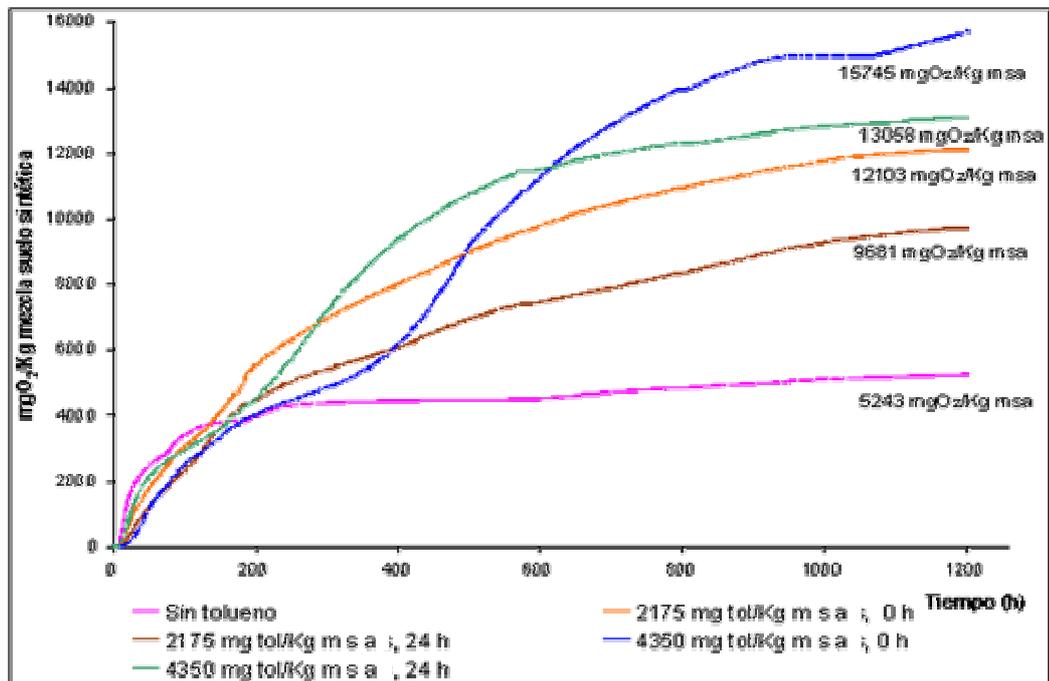


Figura 5.8 Consumo de oxígeno con 2175 y 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial y sin tolueno

Se observó que en presencia de disolvente, en las primeras 120 horas el consumo de oxígeno es menor que sin disolvente, posteriormente el consumo de oxígeno es mayor en los ensayos con disolvente, siendo la tasa de consumo de 1.2 a 6 $\text{mgO}_2/\text{Kg h}$ mezcla de suelo artificial, mientras que al que no se adicionó disolvente su tasa de consumo es de 0.925 $\text{mgO}_2/\text{Kg h}$ mezcla de suelo artificial.

Los efectos en la adición del tolueno, se aprecian en la Figura 5.7 y en la Tabla 5.2, donde se indica el tiempo de la fase de adaptación y el tiempo estimado para el consumo total de la sacarosa.

Tabla 5.2 Tiempo aproximado que se requirió para el consumo de sacarosa y la fase de adaptación

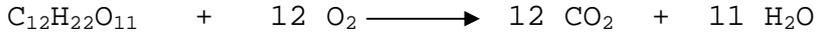
	Sin Tolueno	Se adicionó tolueno al momento de inocular		Se adicionó tolueno 24 h antes de inocular	
		Concentración 2175 mg tol/Kg m s a	Concentración 4350 mg tol/Kg m s a	Concentración 2175 mg tol/Kg m s a	Concentración 4350 mg tol/Kg m s a
Consumo de sacarosa (h)	112	164	128	140	140
Fase de adaptación (h)	8	16	12	12	20

Se realizaron balances de carbono considerando un rendimiento biomasa a sustrato $Y_{x/s}$ de 0.5 para la sacarosa como fuente de carbono primaria, con 2175 y 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial y sin tolueno.

La fase de adaptación en los ensayos que no contenían disolvente fue de aproximadamente 8 horas, y esto fue debido a la presencia de una fuente de carbono fácilmente asimilable (sacarosa), mientras que debido a la presencia de tolueno aún conteniendo también sacarosa, la fase de adaptación fue mayor (12 - 20 días), observando así un efecto diferente por la presencia de tolueno. Este largo periodo de adaptación podría deberse a la aclimatación de los microorganismos a la presencia de tolueno en el cultivo.

Se realizó un balance de carbono y oxígeno considerando que el 50% del carbono se va a CO_2 , los cálculos se muestran a continuación:

Sacarosa:



Tolueno:



HTP:

El 80% de los HTP es fuente de Carbono (Pirt, 1975).

Se calculó la cantidad de oxígeno que se requiere para consumir la sacarosa que se muestra en la Tabla 5.2. En el experimento donde no se adicionó tolueno se requiere de 112 horas para biodegradar la sacarosa, mientras que en presencia de tolueno es mayor el tiempo (128 horas o mayor).

En la Tabla 5.3 se muestra la cantidad de oxígeno (miligramos) teóricos requerida para degradar la fuente de carbono ya sea sacarosa, tolueno ó HTP.

Tabla 5.3 Balance de carbono y oxígeno teórico para las fuentes de Carbono.

Fuente de carbono	mg O ₂ /Kg para consumir la fuente de carbono	Suma mg O ₂ /Kg para consumir la fuente de carbono
HTP	45 514	
Sacarosa	3 462	45 514 + 3 462 = 48 976
2 175mg Tol/Kg msa	1 327	48 976 + 1 327 = 50 338
4 350mg Tol/Kg msa	2 646	48 976 + 2 646 = 51 622

Comparando los datos experimentales del consumo de oxígeno (Figura 5.8), con los cálculos teóricos presentados en la Tabla 5.3, en el caso del ensayo sin tolueno, el consumo de oxígeno

fue de 5 243 mgO₂/Kg de mezcla de suelo artificial; posiblemente los microorganismos degradaron la sacarosa (se requerían 3 462 mgO₂/Kg) y una fracción de HTP: en los demás ensayos por la adición del tolueno hubo mayor biodisponibilidad de los hidrocarburos y por consiguiente mayor consumo de oxígeno. En el ensayo con mayor concentración de tolueno, adicionado 24 horas antes de inocular, el consumo de oxígeno fue de 15 745 mgO₂/Kg de mezcla de suelo artificial.

La velocidad de consumo de oxígeno fue constante, con excepción del experimento donde se adicionó disolvente 24 horas antes de inocular a una concentración de 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial, en el cual se incrementó la velocidad de consumo de oxígeno con respecto a todos los demás, lo que sugiere que al adicionar tolueno favorece la biodisponibilidad de HTP.

Los resultados obtenidos indican que al adicionar tolueno, el consumo de oxígeno es dos veces mayor que en el control (sin tolueno). Esto sugiere que la población microbiana fue capaz de usar los compuestos tan pronto como quedaron biodisponibles y que la velocidad de desorción fue el paso limitante para la degradación (Gray y col., 2000).

Específicamente al adicionar 4350 mg de tolueno/Kg mezcla de suelo artificial, adicionado 24 horas antes de inocular fue tres veces mayor que el control (sin tolueno).

El consumo de oxígeno fue 20% mayor cuando la adición del disolvente se efectúa 24 horas antes de inocular, en relación al consumo de oxígeno en los ensayos adicionados con tolueno al momento de inocular.

Con 4350 mg de tolueno/Kg mezcla de suelo artificial se observa un efecto favorable del 30% que a una menor concentración (2175 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial), y el consumo de oxígeno tres veces superior al experimento sin tolueno en 50 días de cultivo.

En el experimento donde se realizó con concentraciones: 4350 y una mayor concentración (8700 mg de tolueno/Kg de mezcla artificial de suelo) que se adicionó tolueno al momento de inocular con su respectivo control (sin tolueno), durante 25 días, con las condiciones mencionadas en la Sección 4.8.2, en frascos de 500 mL con 55 gramos de mezcla de suelo artificial, a 30°C. Como variable de respuesta el consumo de oxígeno por respirometría (Sección 4.19).

Los resultados del consumo de oxígeno se muestran en las Figuras 5.9 y 5.10, para las dos concentraciones de tolueno. De

todos los ensayos, el número que se muestra en la Figura se refiere a la cantidad de oxígeno que requirió en los 25 días para la degradación de la sacarosa e hidrocarburos.

En la Figura 5.9, se observa que durante las primeras 260 horas los ensayos con 8700 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial, el consumo de oxígeno fue menor tanto para el control como para la concentración de 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial.

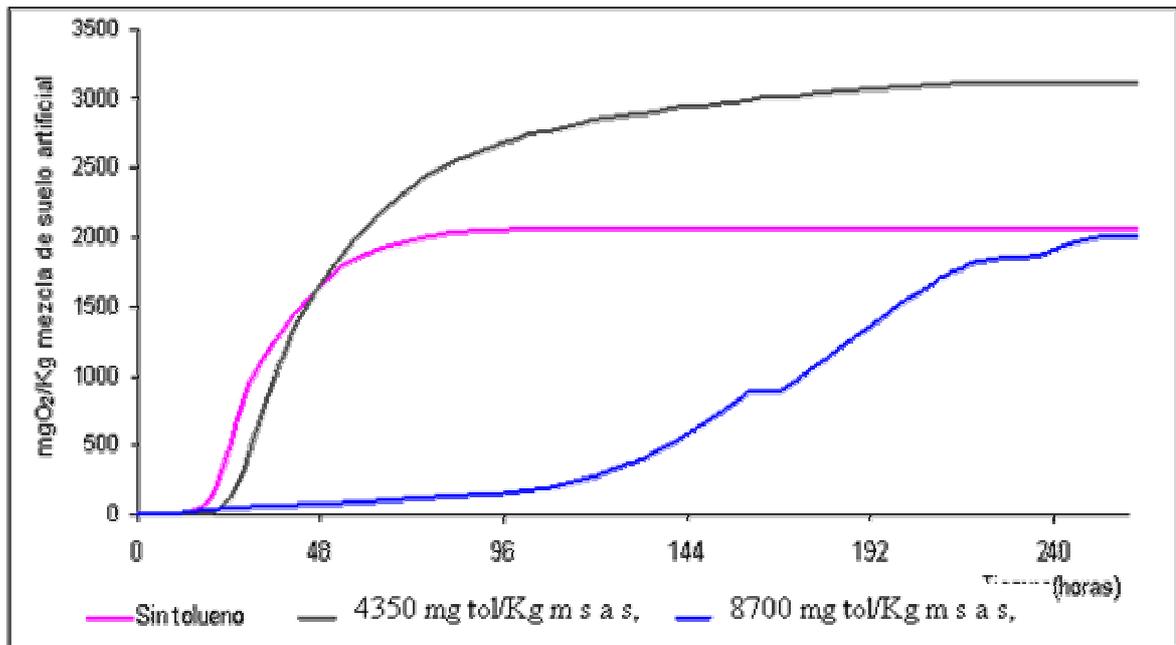


Figura 5.9 Consumo de oxígeno 4350 y 8700 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial y sin tolueno a las 260 horas

Se observa una mayor fase de adaptación en presencia de tolueno que sin tolueno, y a 8700 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial es más prolongada la fase de adaptación, aproximadamente 96 horas, que es una mayor concentración de

tolueno, es más tóxica para los microorganismos (Huertas y col., 2000).

En la Figura 5.10 se encuentran los resultados de la demanda de oxígeno hasta los 25 días. Se puede apreciar que después de 328 horas, la cantidad de oxígeno consumido fue mayor para 8700 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial que para el control (sin tolueno).

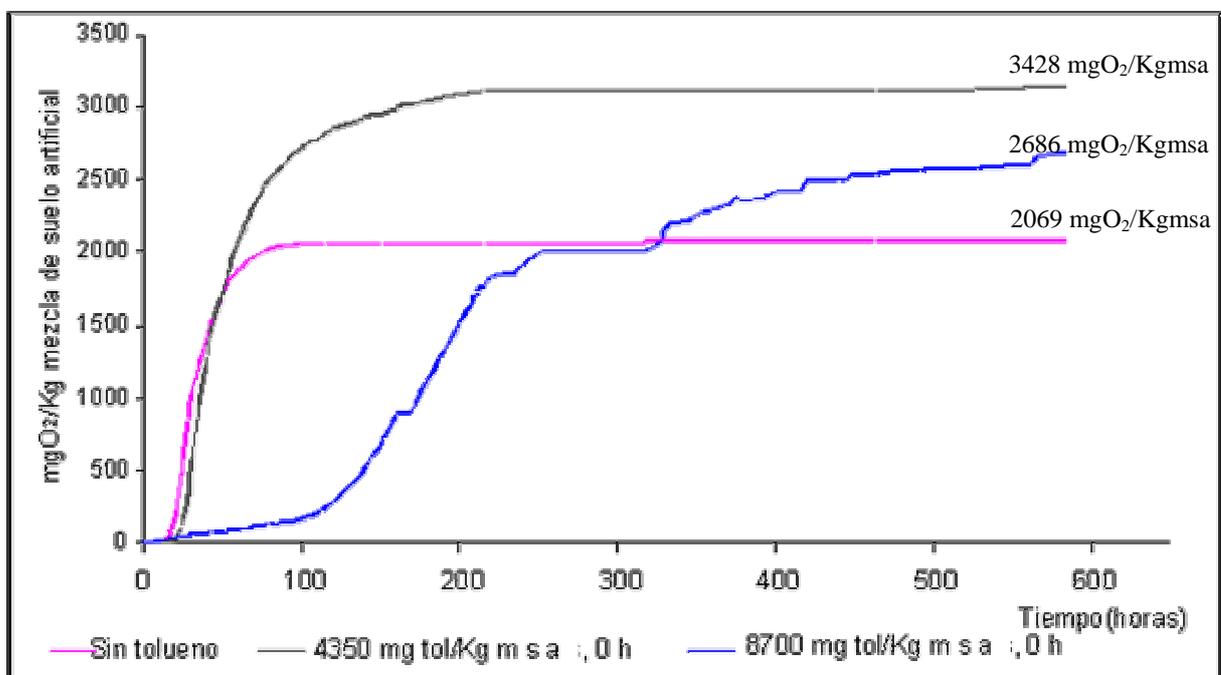


Figura 5.10 Consumo de oxígeno con 4350 y 8700 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno. El número que se muestra se refiere a los miligramos de oxígeno que consumió en 25 días por kiligramo de mezcla de suelo artificial (mg O₂/Kg m s a).

A las 560 horas la velocidad de consumo de oxígeno fue cada vez mas lenta en todos los ensayos, siendo que con 4350 mg de

tolueno/kg mezcla de suelo artificial, es una concentración donde se puede identificar el mayor consumo de oxígeno.

En el ensayo donde se adicionó 8700 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial, a las 260 horas fue similar el consumo de oxígeno, y después de las 400 horas el consumo de oxígeno fue mayor que sin tolueno. También se encontró un efecto inhibitorio en el consumo de oxígeno.

Para concentraciones altas de tolueno (25 a 40 mg/L de medio), se ha reportado que inhibe la degradación de benceno y fenol (Reardon y col., 2000). En la membrana celular el tolueno provoca perforaciones, colapsando el potencial de membrana (Sikkema y col., 1995), esto puede al mismo tiempo alterar la permeabilidad de las células. Estas dos repuestas de los microorganismos a elevadas concentraciones de tolueno explican por qué el consumo de oxígeno disminuye cuando se adiciona más de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco.

El siguiente experimento se realizó basándose en los resultados obtenidos de los dos experimentos anteriores como se observó que con 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco adicionada 24 horas antes de inocular favorecería en la biodegradación de los HTP, se realizó otro experimento bajo las mismas condiciones que se mencionan en la sección 4.8.1, en frascos serológicos de 165 mL con 11 gramos de mezcla de suelo

artificial. Se llevó a cabo el experimento durante 50 días. Se midieron las siguientes variables de respuesta: concentración de HTP, el consumo de oxígeno y la producción de bióxido de carbono por cromatografía de gases durante 25 días; el pH, humedad; cuenta microbiana, y carbono orgánico total.

Los resultados del consumo de oxígeno para una concentración de 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco, adicionado 24 horas antes de inocular y el control (sin tolueno) se muestran en la Figura 5.11.

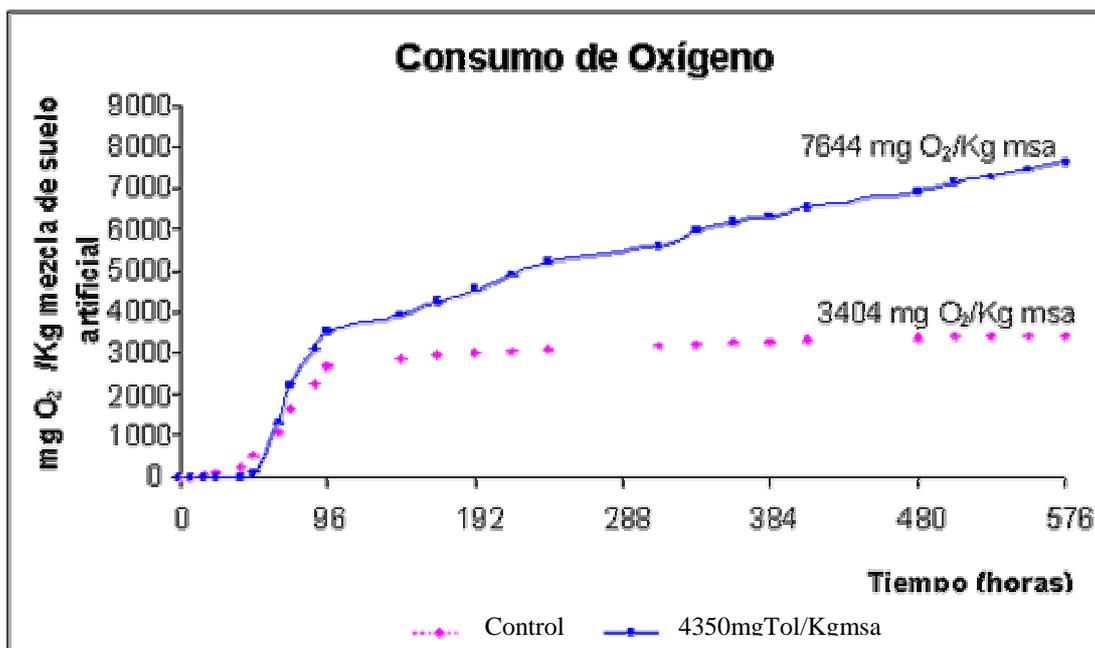


Figura 5.11 Consumo de oxígeno con 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial y sin tolueno a las 576 horas.

El número que se muestra en la parte superior de la gráfica se refiere a la cantidad de oxígeno que consumió en 24 días (576 horas)

Los resultados obtenidos fueron similares a los del experimento que se realizó con una concentración menor a 4350 mg tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial que se llevó a cabo un año antes, y se observó que el consumo de oxígeno fue casi 3 veces mayor en los ensayos con tolueno con respecto al que no se adicionó disolvente.

Alvarez y Vogel (1991) reportaron que a bajas concentraciones de tolueno puede estimular la degradación de otros compuestos aromáticos, como sucede aparentemente con 4350 mg tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial.

Para analizar los efectos en la adición del tolueno a bajas concentraciones en la biodisponibilidad de los HTP se realizó la cinética de HTP.

5.3.2 En la biodegradación de HTP

Para evaluar el efecto del tolueno sobre la biodegradación de HTP en un suelo contaminado e intemperizado se realizaron dos experimentos en todos se adicionó una concentración de tolueno de 4350 mg/Kg de mezcla artificial de suelo y se comparó con: (i) una menor concentración (2175 mg/Kg de mezcla artificial de suelo) se adicionó tolueno 24 horas antes y al momento de inocular y (ii) se adicionó tolueno 24 horas antes de inocular. Todos con su respectivo control (sin tolueno).

En la Figura 5.12 se muestran los resultados obtenidos en la biodegradación de HTP en los ensayos adicionados con 2175 y 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco, 24 horas antes de inocular y al momento de inocular y el control (sin tolueno). Se cuantificó la degradación de HTP a los 24 y 50 días de incubación a 30°C.

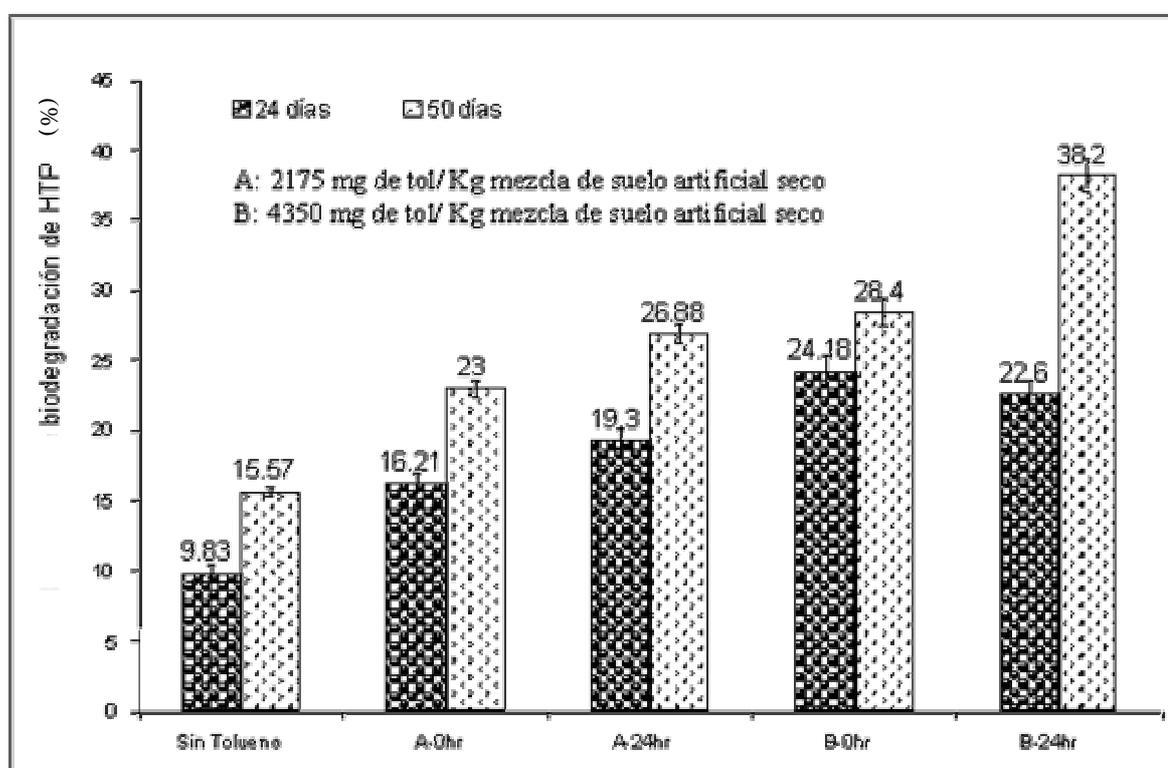


Figura 5.12 Biodegradación de HTP en ensayos de suelo con dos concentraciones de tolueno y sin tolueno.

La adición del tolueno al momento de inocular se indica con 0hr, y para la adición del tolueno 24 horas antes de inocular se indica con 24hr.

En los ensayos en presencia de tolueno la biodegradación de HTP fue mayor que en los ensayos sin tolueno. En los reactores adicionados con tolueno 24 horas antes de inocular, hubo mayor

degradación de HTP que en los reactores adicionados con el tolueno al momento de inocular, esto se observó desde los 24 días.

Se identificó que el tolueno adicionado 24 horas antes de inocular a una concentración de 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco, presentó la mayor degradación de HTP (38.2%) en 50 días.

Volker y col. (1996) reportaron que en suelos contaminados con petróleo e intemperizados se biodegradó del 40 al 60% de HTP en 110 días en un medio líquido. Por otra parte, Huesemann y Moore (1993) reportan que un suelo intemperizado (5 a 15 años) contaminado con hidrocarburos (21,100 ppm HTP) en Houston Texas, en un año (52 semanas) se logró un 90% de de degradación de los contaminantes. Los resultados aquí obtenidos indican que la adición del tolueno puede ser una alternativa para favorecer la degradación de HTP en suelos intemperizados.

Los resultados sugieren que la adición de 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial 24 horas antes de inocular, se favorece la desorción de hidrocarburos en un suelo intemperizado o posiblemente también que es un cosustrato que induce la producción de enzimas inespecíficas capaces de degradar hidrocarburos.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos donde se adicionó tolueno 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco, 24 horas de inocular a 30°C, en frascos serológicos, con 11 gramos de mezcla de suelo artificial seco (Sección 4.8.1) y durante 50 días, cabe mencionar que este experimento se realizo un año después del anterior y se compararon los resultados. En la Figura 5.13 se muestran los resultados de la biodegradación de HTP.

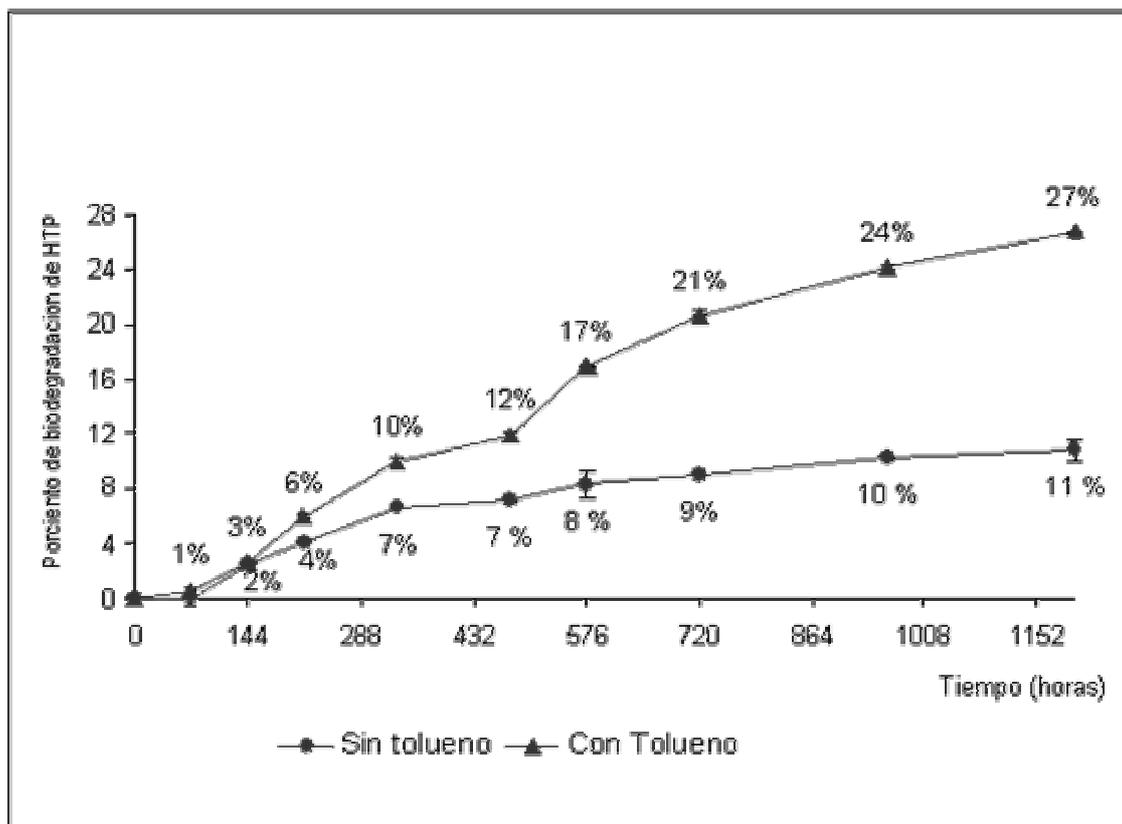


Figura 5.13 Biodegradación de HTP con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco, adicionado 24 horas de inocular y sin tolueno.

De los resultados obtenidos se observa que sin tolueno y con tolueno hay una biodegradación de extractos de HTP similar hasta las 130 horas, posteriormente en el ensayo hay una lenta biodegradación y a las 1152 horas (48 días) la biodegradación fue del 11% aproximadamente. En cambio en presencia de tolueno continúa la biodegradación de extractos de HTP y a 1152 horas (48 días) la biodegradación es del 27%.

Al final del experimento, a los 50 días se observó que al adicionar tolueno a una concentración de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo fue 2.4 veces mayor que sin tolueno, así que hubo mayor desorción de los hidrocarburos al adicionar el tolueno y menos estrés para los microorganismos al adicionar el tolueno 24 horas antes de inocular, y por eso hubo mayor biodegradación de HTP.

Rutherford y col. (1998) reportan que en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados se presenta una reducción rápida de contaminantes al inicio del proceso, seguido por una lenta disminución de material remanente, por lo que no se alcanza una degradación completa. Pignatello y Xing (1995) explican que en la fase lenta de degradación también se observa una desorción de contaminantes en suelos. Por lo tanto la fase lenta de biodegradación es más comúnmente atribuida a factores físicos como la difusión de partículas en el suelo.

Se analizaron los resultados y se observó una similitud de suma importancia en los experimentos que se realizaron en las mismas condiciones sólo que con un año de diferencia. Se adicionó una concentración de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco adicionado 24 horas antes de inocular, se relacionó el porcentaje de degradación de HTP a los 50 días con tolueno y sin tolueno(Tabla 5.4).

Tabla 5.4 Biodegradación a los 50 días de dos experimentos iguales con un año de diferencia.

Tolueno	Biodegradación Sin tolueno (%)	Biodegradación Con tolueno (%)	Relación de Biodegradación Sin Tolueno/Con Tolueno
4350 mg tol/Kg msa	15.57	38.2	0.407
4350 mg tol/Kg msa un año después	11	27	0.407

Se encontró que la relación de biodegradación de HTP (biodegradación sin tolueno/biodegradación con tolueno) en ambos experimentos es igual (0.407), Tabla 5.4, lo que indica que el efecto en la adición del tolueno en ambos experimentos fue la misma.

Los resultados que se muestran en la Tabla 5.4, se observó que los porcentajes de degradación fueron diferentes, posiblemente se deba a que el consorcio no haya sido el mismo dado que hubo una diferencia de un año entre cada experimento, aunque el consorcio se conservó en glicerol al 30% v/v y se mantuvo refrigeración a -20°C , posiblemente se extinguieron algunos microorganismos degradadores importantes y por ese motivo los resultados no hayan sido iguales.

De los resultados obtenidos en la respiración microbiana y en la degradación de HTP se interpretó un efecto importante debido a la presencia de tolueno: incrementó la desorción de los hidrocarburos del suelo e incrementó la biodisponibilidad.

La degradación de HTP y el consumo de oxígeno fueron funciones que se vieron alteradas por la adición del tolueno. La biodegradación de HTP se lleva a cabo por la oxidación (Parés y Juárez, 1997), resultando en la formación de compuestos polares (Volker y col., 1996).

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la producción de bióxido de carbono (CO_2) con el fin de determinar el efecto del tolueno sobre la respiración de los microorganismos durante la biodegradación de hidrocarburos.

5.4 Mineralización de hidrocarburos

Para determinar si los hidrocarburos fueron transformados o mineralizados se midió la producción de CO₂ durante 24 días de tratamiento.

La cinética de producción de CO₂ se realizó en frascos serológicos con tapa hermética de teflón Mininert® con 11 gramos de mezcla de suelo artificial seco (Sección 4.8.1.) con una concentración de 4350 mg tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial que se, adicionó tolueno 24 horas antes de inocular y el control (sin tolueno), a 30°C en el respirómetro, durante 24 días (576 horas).

La producción de CO₂ fue 1.95 veces mayor con tolueno que sin tolueno. Estos resultados indican que la adición de tolueno favorece la oxidación y biodegradación hasta la mineralización de los hidrocarburos del suelo. En este caso, la adición de un sustrato parcialmente soluble, el tolueno, podría estimular la biodegradación de hidrocarburos. Por ejemplo, Ressler y col. en 1995, encontraron que los compuestos poli aromáticos con 4 anillos (fluorantreno y pireno) fueron degradados más rápidamente en presencia de naftaleno.

Los resultados de la cinética de CO₂ se muestran en la Figura 5.14.

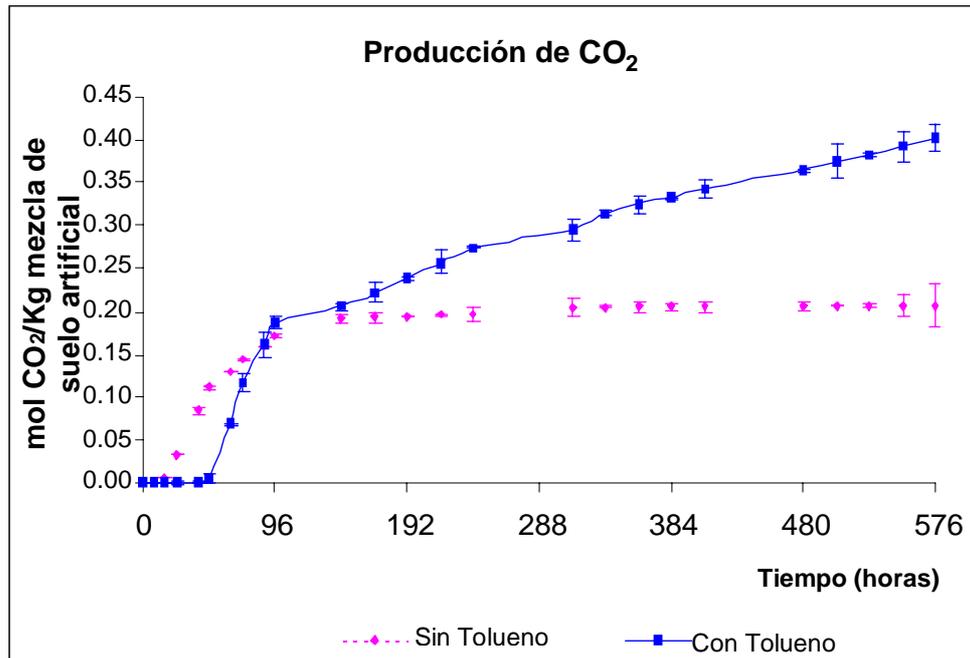


Figura 5.14 Producción de CO₂ de ensayos con 4350 mg de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno.

La biodegradación de los HTP es mayor en los ensayos que se adicionó tolueno, también fue mayor la producción de CO₂. La biodegradación de HTP a los 24 días para las muestras tratadas con tolueno fue 2.1 veces mayor que la biodegradación sin tolueno, por lo tanto la adición del tolueno favorece la biodegradación. Los valores de biodegradación fueron de 8 y 17% sin tolueno y con tolueno respectivamente.

Una limitante en la biodegradación, es la biodisponibilidad de hidrocarburos en la matriz del suelo intemperizado.

En la siguiente sección se muestran los resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja para mostrar la identificación de compuestos polares por su grupo funcional.

5.5 Espectros de compuestos polares y HTP

El objetivo de éste análisis fue mostrar la biodegradación de HTP con tolueno y sin tolueno, por medio de la espectroscopia infrarroja e identificando HTP y compuestos polares.

En la Figura 5.15 se observan tres espectros, el que se encuentra en la parte superior es del disolvente (tetracloruro de etileno), el siguiente es en el tiempo cero y el último a los 24 días de incubar, los últimos dos en presencia de tolueno (4350 mg tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial).

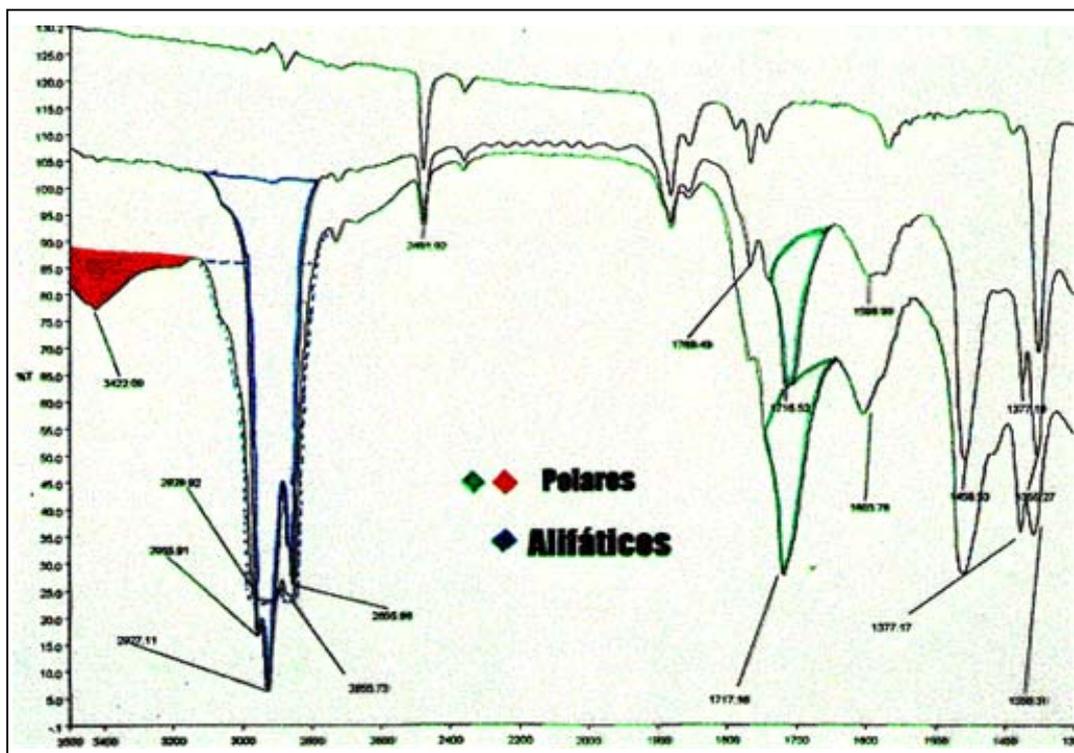


Figura 5.15 Espectro de HTP y compuestos polares a los 0 y 24 días de incubar.

En la figura 5.15 se puede apreciar de color azul y con línea punteada la cantidad de hidrocarburos saturados (alifáticos) que disminuyen después del tratamiento microbiano, mientras que la porción de compuestos polares aumentó y se señala en colores verde y rojo. Se identificaron bandas en el FT-IR de compuestos polares, principalmente compuestos con grupos funcionales C=O y OH, y una disminución en la concentración de HTP (3100 a 2800 cm^{-1}). Estas señales se encontraron también en ausencia de tolueno, sólo que las bandas de los compuestos polares fueron menores. Volker y col. en 1997 también encontraron bandas de compuestos polares por espectroscopía infrarroja debido a la biodegradación de petróleo.

En la Figura 5.16, se puede apreciar que la banda en 3100 a 2800 cm^{-1} disminuyó considerablemente por la biodegradación de los HTP. De forma similar, se observó disminución de compuestos polares (OH) por la banda de 3422 cm^{-1} , los cuales también se biodegradaron.

En la Figura 5.16 se observan tres espectros, el que se encuentra en la parte superior el disolvente (tetracloruro de etileno), el siguiente es el tiempo cero y el último a los 50 días de incubar, los últimos dos en presencia de tolueno (4350 mg tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial).

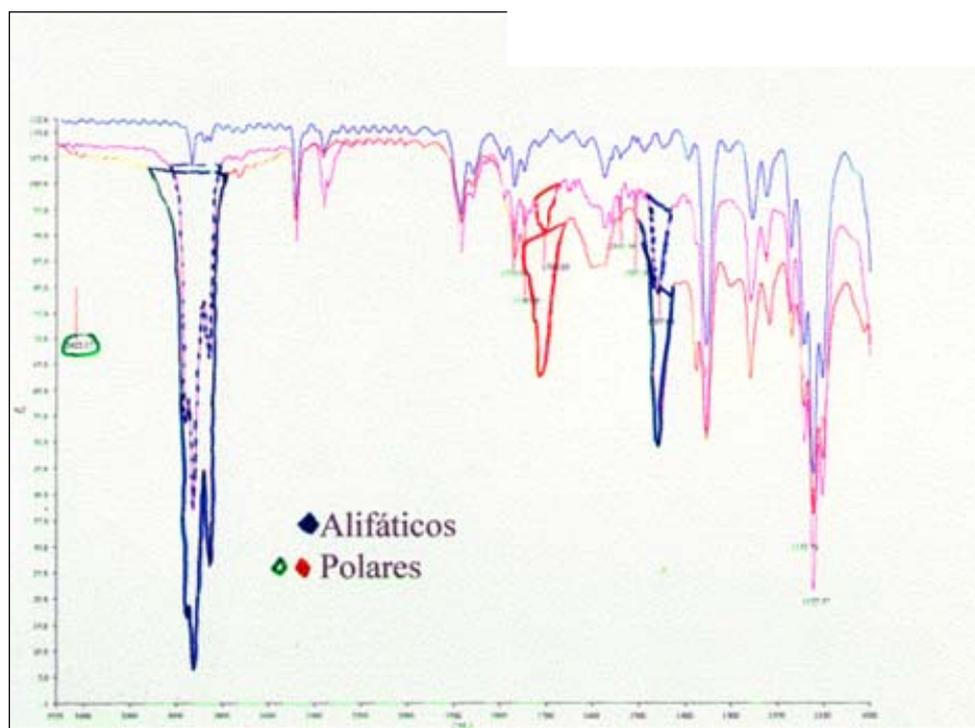


Figura 5.16 Espectro de HTP y compuestos polares a los 0 y 50 días de incubar

Para continuar analizando el efecto del tolueno se realizaron las cinéticas de: pH, humedad, cuenta microbiana y carbono orgánico total. También la concentración de asfaltenos, para después realizar un balance de HTP y carbono.

5.6 Efecto del tolueno en: pH, humedad, cuenta microbiana y carbón orgánico total

Se muestran los resultados del experimento que se adicionó tolueno a una concentración de 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco adicionado 24 horas antes de inocular, para analizar el efecto de la adición del tolueno.

5.6.1 Cinéticas de pH

En la Figura 5.17 se muestran los resultados de pH obtenidos hasta los 50 días.

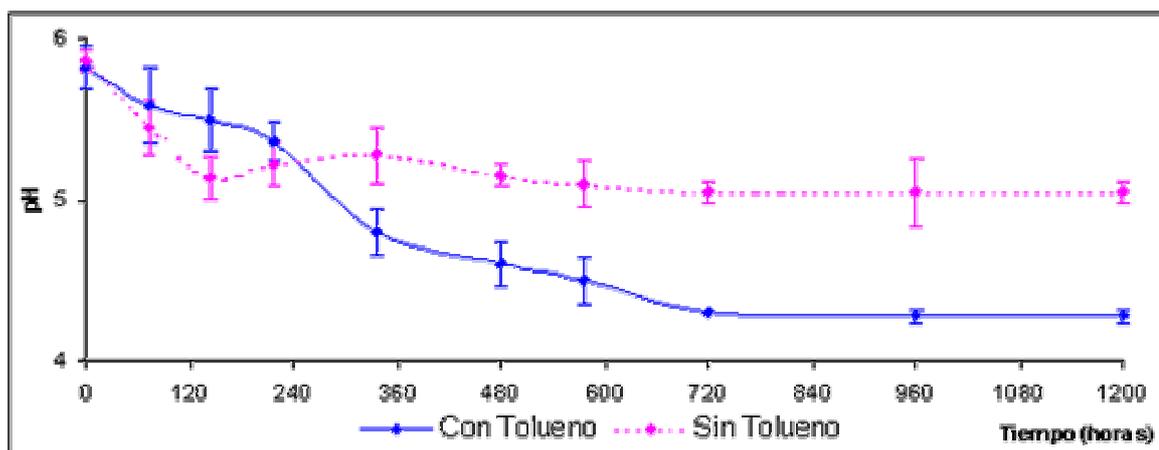


Figura 5.17 Mediciones de pH en la unidad experimental con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno.

Se observó que en las muestras con tolueno el pH varió entre 5.8 y 4.6, y sin tolueno de 5.9 y 5.1. En los ensayos sin tolueno hubo una disminución en el pH en las primeras 360 horas y posteriormente fue mucho menor. En el ensayo con tolueno la disminución de pH fue acentuada después de las 240 horas hasta 720 horas (10 a 24 días).

La disminución de pH en los ensayos sin tolueno puede atribuirse a la formación de ácidos orgánicos provenientes de la fuente de carbono de fácil, degradación (Zucconi y Bertoldi,

1986; Ferrari, 1986), sacarosa, posteriormente o simultáneamente los hidrocarburos biodisponibles.

Para el caso de las muestras con tolueno, la disminución del pH fue diferente, ya que hasta después de 240 horas (10 días) se apreció una disminución de pH, representativo de la degradación de la sacarosa y también de los hidrocarburos.

El ataque primario aerobio de hidrocarburos puede conducir a la mineralización, pero en otros casos se acumulan productos resultantes de la oxidación parcial del sustrato, como ácidos grasos que disminuyen también el pH en el medio (Abed y col., 2002).

5.6.2 Cinética de humedad

El agua es importante para el desarrollo de los microorganismos, ya que actúa como medio de transporte de nutrientes y oxígeno a la célula.

La humedad inicial fue del 50%, después de 24 días disminuyó a 48.1 y 48.7% en las muestras con y sin tolueno respectivamente (Figura 5.18).

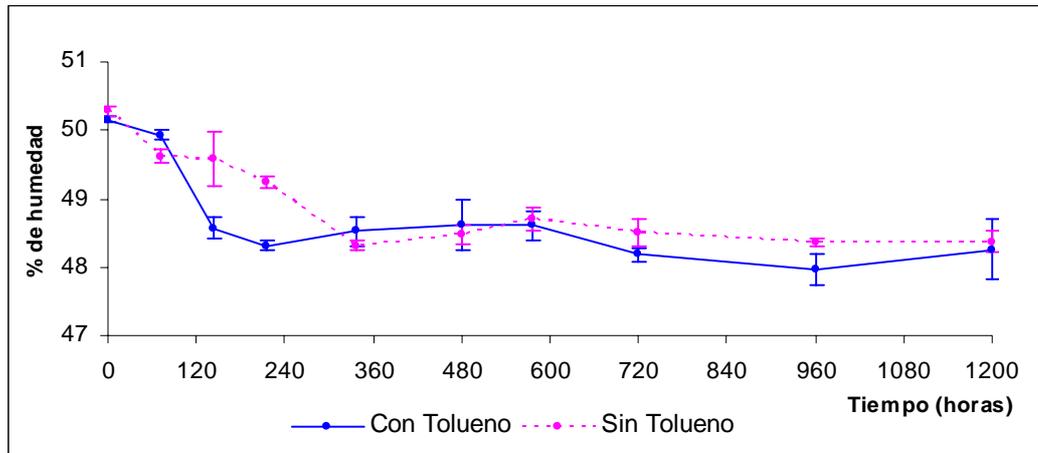


Figura 5.18 Mediciones de humedad en la unidad experimental con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno.

Para los ensayos con tolueno la mayor disminución de la humedad se presentó durante las primeras 360 horas, observándose una pendiente más pronunciada que en los ensayos sin tolueno.

El rango de humedad al que se situaron todos los ensayos fue de 48-50% de humedad. Fitzpatrick en 1993 recomienda el proceso deba mantenerse en un intervalo de 40-65% de humedad para asegurar la biodegradación.

5.6.3 Cuenta microbiana

En la Figura 5.19 se muestran las cinéticas de unidades formadoras de colonias (UFC), durante 50 días. En la Figura de lado izquierdo se refiere a las bacterias y del lado derecho a los hongos. De los resultados obtenidos, se observa que tanto

en presencia como en ausencia de tolueno hubo crecimiento microbiano de bacterias y hongos.

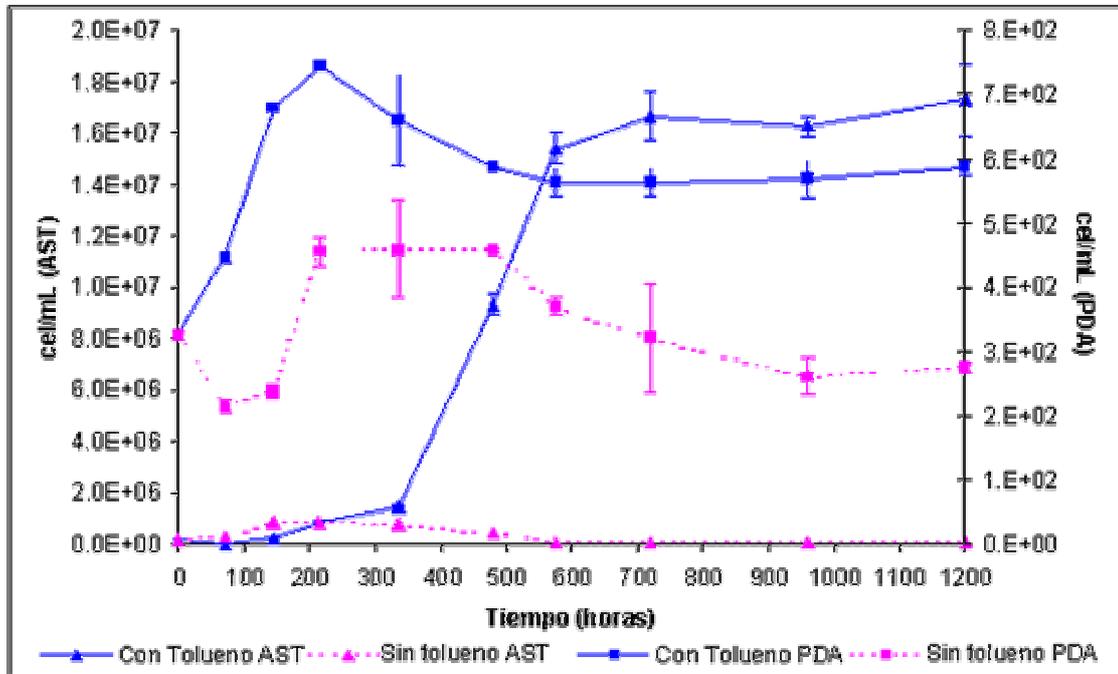


Figura 5.19 Cuenta microbiana (UFC) en el suelo de la unidad experimental con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno

El crecimiento bacteriano en las muestras que se adicionó tolueno se puede apreciar un periodo de adaptación más largo que en el que no contiene tolueno, como también lo citan Huertas y col. (2000).

En los experimentos en que no se adicionó tolueno, el crecimiento microbiano fue muy lento y llegó a una fase estacionaria más rápidamente que en los cultivos con tolueno, posiblemente por la menor biodisponibilidad de fuente de carbono.

Los hongos, como grupo, tienden a ser más tolerantes al ácido que las bacterias (Madigan y col., 1998) y se observó que en presencia de tolueno el pH fue de entre 4 y 6. Muchos grupos crecen a pH 5 o más bajo pero muy pocos lo hacen a dos.

Estos resultados indican que la adición de tolueno favorece la biodisponibilidad de los hidrocarburos y son utilizados como fuente de carbono y energía.

Huertas y col. en 1998 reportaron que el tolueno puede ser biodegradado principalmente *Pseudomonas putida* a una concentración de 10% (v/p), en fermentación en medio sólido. También realizó un conteo de células en una fermentación en medio líquido, y observó que al 0.1% (v/p) de tolueno no hubo efecto significativo en el número de células, pero al 10%(v/p) de tolueno los microorganismos sufrieron un shock porque fueron realmente sensibles a esa concentración decreciendo las células 6 órdenes de magnitud después de 24 horas.

5.6.4 Carbono orgánico total (TOC)

En la Figura 5.20 se muestran los datos obtenidos de la determinación de carbono orgánico total (TOC). Durante 50 días.

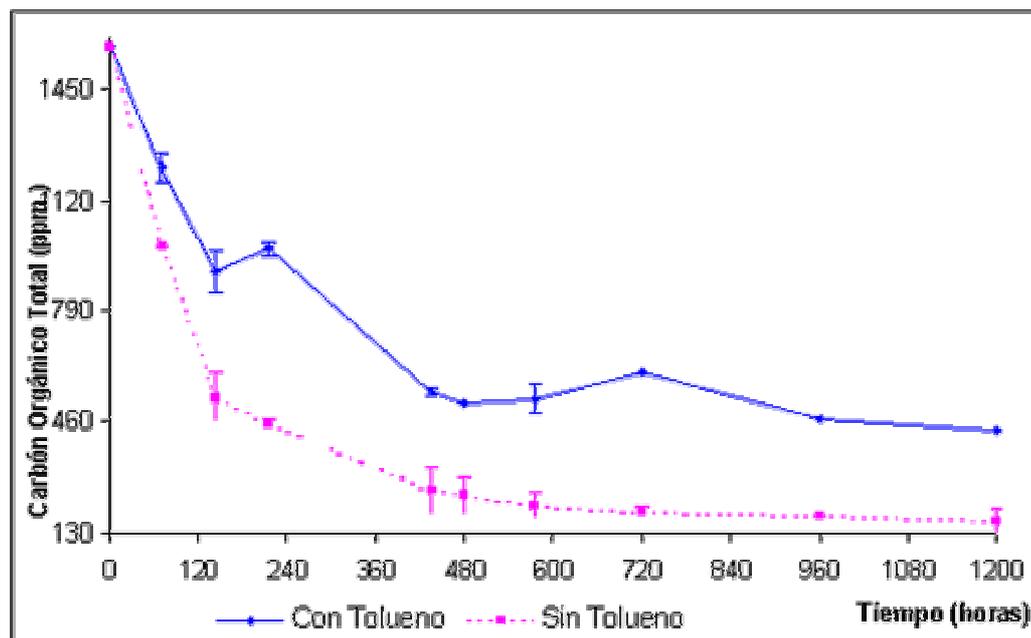


Figura 5.20 Carbono Orgánico Total de suelo en la unidad experimental con 4350 miligramos de tolueno/kg mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno

El TOC se realizó para cuantificar el carbono biodisponible en la unidad experimental y el efecto que hubo en presencia y ausencia de tolueno. Se observó que en presencia de tolueno, la cantidad de carbono orgánico fue mayor que en ausencia de tolueno.

Los datos obtenidos del TOC se usaron para el balance de Carbono que se presenta mas adelante.

A continuación se presentan la determinación de asfaltenos.

5.6.5 Concentración de Asfaltenos

La concentración de asfaltenos en los HTP se midió en los ensayos con tolueno a una concentración de 4350 mg de

tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno, durante 50 días.

Se midió la concentración de asfaltenos al inicio y al final(0 y 50 días), en todos los ensayos. La concentración fue de 29.5% al inicio y 30.5% al final. El resultado obtenido indica que es un elevado porcentaje de asfaltenos y hace constar que es un suelo intemperizado, una cantidad elevada de asfaltenos es característico de suelos intemperizados (Abelson, 1989).

La concentración de asfaltenos al principio y al final del proceso, indica que los asfaltenos incrementaron y no disminuyeron, debido a su complejidad, ya que los asfaltenos con mucha certeza es una fracción no biodegradable de los contaminantes en suelos intemperizados (Medina, 1999).

Con los datos obtenidos se realizaron dos balances uno de HTP y el otro de carbono, con tolueno a una concentración de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco y sin tolueno que se muestran a continuación.

5.7 Balances de HTP y Carbono

A continuación se muestra un balance en presencia y en ausencia de tolueno, para estimar el consumo de hidrocarburos sobre el destino final de los hidrocarburos que disminuyeron, es decir, podrían disminuir por que los compuestos producidos

en la biotransformación tengan una solubilidad distinta a la de los compuestos de los que procedieron ó por que la afinidad al suelo sea mayor. Para estimar cuanto se mineralizó y cuanto fue biotransformado se realizaron los balances de HTP y Carbono.

Se realizaron balances de carbono considerando un rendimiento biomasa sustrato ($Y_{x/s}$) de 0.5 para la sacarosa como fuente de carbón primaria, $Y_{x/s}$ de 0.8 para el tolueno y los HTP y $Y_{x/s}$ de 0.3 para la materia orgánica. Se consideró el siguiente orden de biodegradación de la fuente de carbono: sacarosa, tolueno, HTP y materia orgánica.

La duración de los experimentos fue de 50 días, porque se identificó en la cinética de HTP sin tolueno una desaceleración en la disminución de HTP y en el consumo de oxígeno, aunque en presencia de tolueno el consumo de oxígeno continuó.

En las Figuras 5.21 y 5.22, los balances de carbono encontramos mayor formación de metabolitos secundarios en los ensayos que se adicionó tolueno a 4350 mg tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco que sin tolueno.

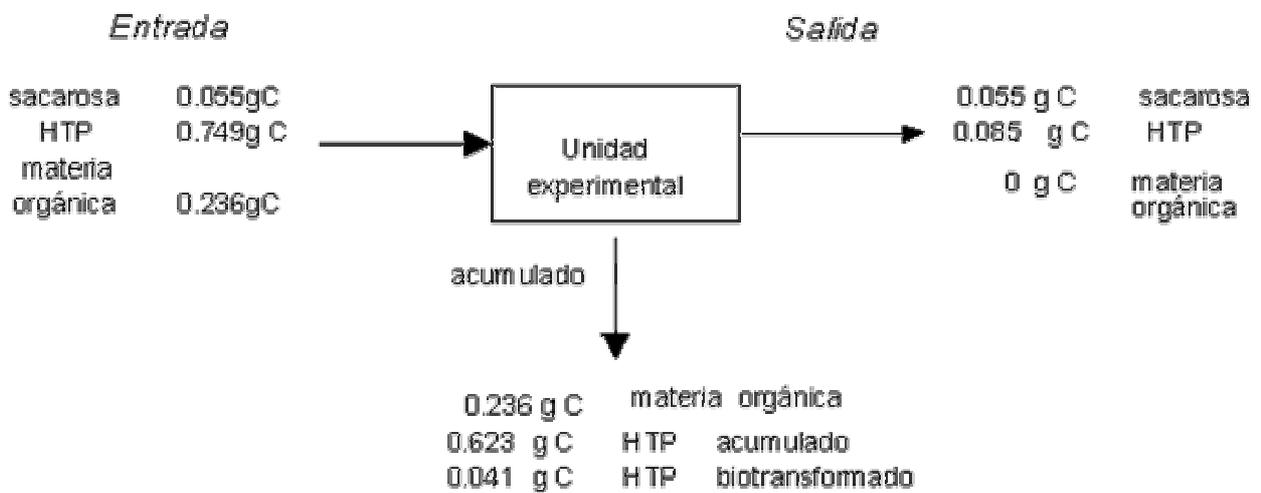


Figura 5.21 Balance general de Carbono en la unidad experimental con tolueno.

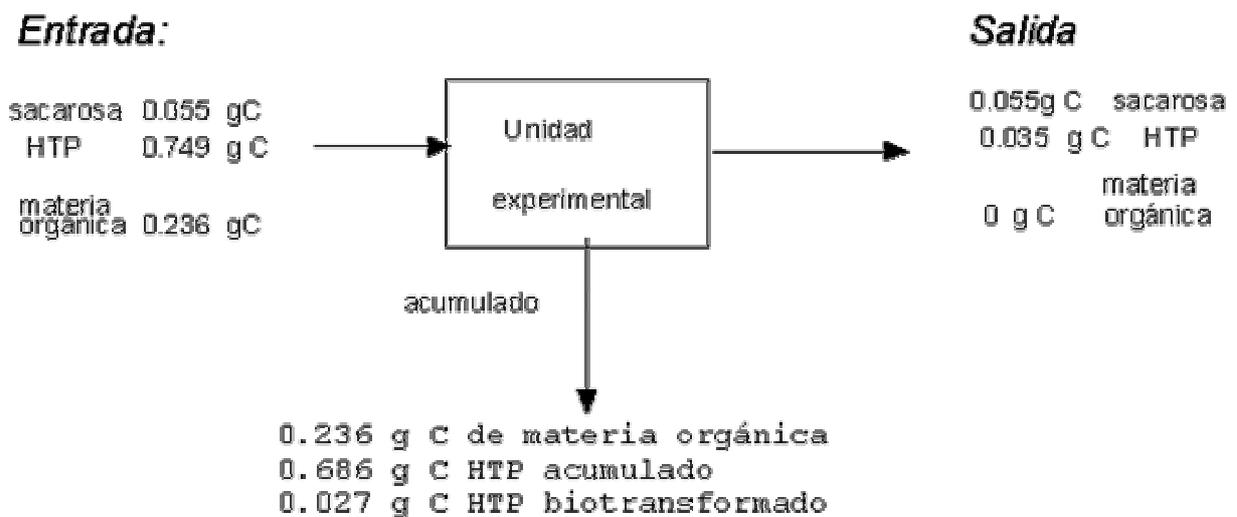


Figura 5.22 Balance general de Carbono en la unidad experimental sin tolueno.

Comparando en presencia de tolueno con ausencia de tolueno:

Se cuantificó mayor acumulación de carbono en ausencia de tolueno que con tolueno.

Toda la sacarosa fue degradada en ausencia como en presencia de tolueno.

En las Figuras 5.23 y 5.24, se presentan los balances generales de HTP en presencia y ausencia de tolueno respectivamente.

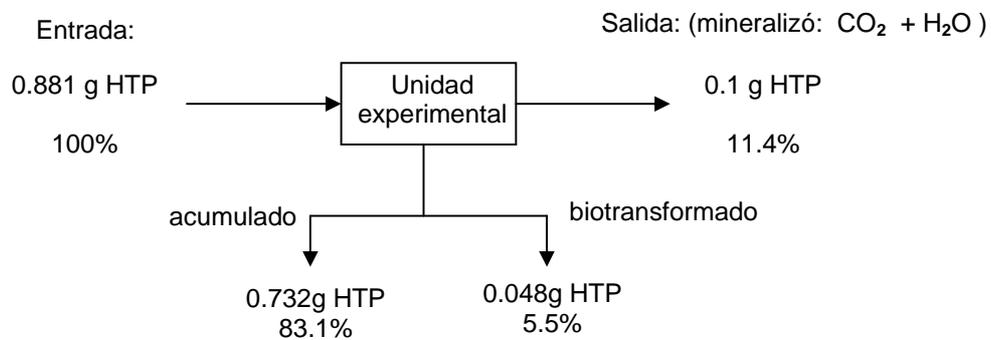


Figura 5.23 Balance general de HTP en la unidad experimental con tolueno.

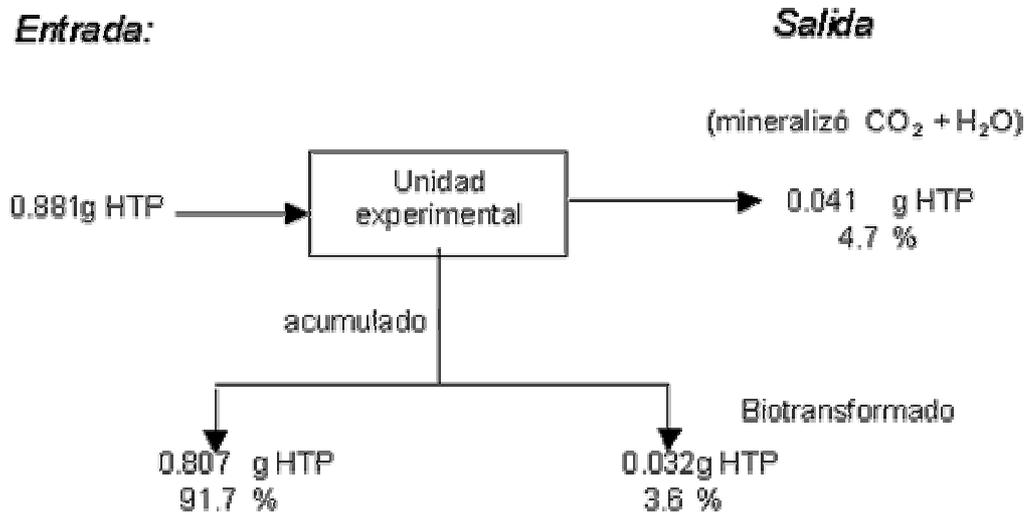


Figura 5.24 Balance general de HTP en la unidad experimental sin tolueno.

Comparando los balances en presencia de tolueno con ausencia de tolueno:

Es mayor la mineralización 2.3 veces con tolueno que sin tolueno.

Hubo mayor formación de metabolitos secundarios sin tolueno (0.839g HTP), que con tolueno (0.78g HTP).

En un suelo intemperizado hay baja biodisponibilidad, al adicionar tolueno se incrementan la movilidad y la transferencia de contaminantes mejorando la biodegradación.

CONCLUSIONES

1. El efecto del tolueno al inicio de los experimentos es positivo en la degradación de HTP en suelos intemperizado en concentraciones de 2175, 4350 y 8700 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco.
2. Al adicionar tolueno el consumo de oxígeno y la biodegradación de HTP en un suelo intemperizado es dos veces superior con respecto al que no tiene tolueno.
3. Se encontró conveniente efectuar la adición de tolueno 24 horas antes de inocular, para obtener los mejores resultados en la biodegradación de HTP.
4. La concentración más adecuada para la degradación de los HTP, fue de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco.
5. Hubo el mismo efecto en la degradación de HTP, con la adición de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco, en experimentos de un año de diferencia.

6. Hubo mayor mineralización en ensayos que se adicionó el tolueno que en sin tolueno (control).

RECOMENDACIONES

Algunos de los aspectos que durante el trabajo de tesis no se cubrieron, por estar fuera de los objetivos planteados, pero podría ayudar a complementar la información generada en éste trabajo son:

- La realización del fraccionamiento de hidrocarburos al inicio, intermedio y final del proceso para conocer como se biodegrada cada fracción.
- La utilización de un pretratamiento con tolueno a bajas concentraciones, es decir, antes de iniciar el experimento inocular en medio mineral con tolueno durante 10 días, y esto es para favorecer el crecimiento de colonias adaptadas y evitar el estrés repentino, con la que se podría lograr una fase de adaptación sea mas corta.
- La adición de tolueno a una concentración de 4350 mg de tolueno/Kg de mezcla de suelo artificial seco cada determinado periodo de tiempo, no sólo al inicio del proceso, para observar si es que favorece la biodegradación de HTP y la desorción de los mismos.

- Identificación de metabolitos producidos cuando se adiciona tolueno y caracterización de la toxicidad de los compuestos residuales al tratamiento.

1. Abelson P.H. *Nature* **1990.**, 244, 629
2. Alexander, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34; 4259-4264.
3. Alexander, M. Transformación de hidrocarburos. Microbiología de suelos. AGT Editor. **1998**, 219-238. México.
4. Alvarez, P. Y Vogel, T. Substrate interactions of benzene, toluene and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, 37:2981-2985.
5. Abed, R., Safi, N., Köster, J., Beer, D., El Nahhal, Y., Rullkötter, J. y García, F. Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**. 68: 1674-1683.
6. April, T. M., y Abbott, S. P. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae). *Environ. Sci. Technol.* **1998**, 28:152-163
7. Arocha, A Marco., Alan, P. Jackman y McCoy, Ben J. Adsorption Kinetics of toluene on Soil Agglomerates: Soil as a Biporous Sorbent. *Environ. Sci. Technol.* **1996** 30 (5) 1500-1507.
8. Baugh, P.J. (1993) Gas Chromatography. A practical Approach. Oxford University Press Department of Chemistry and Applied Chemistry.
9. Birman, I. y Alexander, M. Optimizing biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**. 45:267-272.
10. Boldu, F., Vervoort, J., Grontehuis, J y Van Groenestijin, J. Substrate interactions during the biodegradation of Benzene, Toluene Ethylbenzene and Xylene (BTEX) Hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp strains T1. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**. 68:2660-2665.
11. Boopathy, R. y Manning, J. Surfactant-enhanced bioremediation of soil contaminated with 2,4,6- trinitrotoluene in soil slurry reactors. *Water Environ. Res.* **1999**, 31: 248-252.
12. Brubaker, G.R. In situ bioremediation of PAH-contaminated aquifers. In: Proceeding of the Petroleum Hydrocarbons y Organic Chemicals in ground water: Prevention, Detection y Restoration. **1991**. Houston, Texas. 377-390
13. Canby, T.Y. Bacteria, teaching old bugs new tricks. **1993**. *National Geographic*. Agosto.
14. Carmichael, L. M; Christman, R.F. y Pfaender, F. K. Desorption and mineralization kinetics of phenanthrene and chrysene in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, 31: 126-132.

15. Catherine, A.P. y Luthy, R. Coal tras dissolution in water-miscible solvents: experimental evaluation. *Environ. Sci. Technol.* **1993**. 27(13):2831-2843.
16. Castaldi, F. J. Bio-slurry reaction system and process for hazardous waste treatment. USA. Patent. **1993**, 5, 232, 596.
17. Cresser, M; Killham, K. y Edwards, T. Soil chemistry and its applications. Cambridge Environmental Chemistry Series. Cambridge University Press. **1993**. pp.58
18. <http://www.drcalderonlabs.com/Publicaciones/Respirometria.htm>; 2004
19. Efroymson, R. y Alexander, M. Biodegradation by an *Athrobacter* species of hydrocarbons partitioned into an organic solvent. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**.57: 1441-1447.
20. Espinat, D. Colloidal structure of asphaltenes solutions and heavy-oil fractions studied by small-angle neutron and X-ray scattering. SPE No. 25187. New Orleans. **1993**. 365-373.
21. Eweis, J. B., Ergas, S. J., Chang, D. D. y Schroeder, E. D. Principios de biorrecuperación. Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. Mc graw-Hill, Madrid. **1998**.
22. Fava, F. y Gioia, D. Soya lecithin effects on the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in an artificial contaminated soil. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**. 72: 177-187.
23. Ferrari. G. Oxygen, water and temperature in the decomposition of an organic substance during composting. Compost: production, quality y use. Ed. Bertoldi, Ferranti, L'Hemite y Zucconi. Elsevier Appl. Sci. Publisher. **1986**.
24. Ferrer, M. I. Selección de tecnologías de restauración biológica para lodos de perforación en tres campos petroleros. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Ing. Ambiental, Instituto Politécnico Nacional. **1997**. México, D.F.
25. Fitzpatrick, G. E. A program for determining cocompost blending ratios. *Compost Sci. and Utilization.* **1993**. Verano: 30-33.
26. Fu, J. y Luthy R. Effect of organic solvent on sorption of aromatic solutes onto soils. *J. Environ. Eng.* **1986**, 112:346-366.
27. García-Rivero, M; Saucedo-Castañeda , G; Flores-DE-Hoyos, S; y Gutiérrez-Rojas, M. Mass transfer and hydrocarbon biodegradation of aged soil in slurry-phase. *Biotechnol. Prog.* **2002**. 18, 728-733.
28. García T, Antonio. **Experimentos en microbiología del suelo**. Compañía Editorial Continental, S.A. México. **1981** 28-31.

29. Geerdink, M., Van Loosdrecht, M. y Luyben K. Model for microbial degradation of nonpolar organic contaminants in soil slurry reactor. *Environ. Sci. Technol.* **1996**.30(3): 779-786.
30. Gray, M; Dudas M. y Pickard, M. Protocols to enhance biodegradation of hydrocarbon contaminants in soil. *Biorem. J.* **2000**, 4:249-257.
31. Gutiérrez-Rojas Mariano. Edited by Eugenia J Olguin, Gloria Sánchez and Elizabeth Hernandez. Environmental Biotechnology and Cleaner Bioprocesses. Chapter: Increasing bioavailability of recalcitrant molecules in contaminated soils. First published by Taylor and Francis Grant Britannic **2000**, (13) 167-177.
32. Hasset, J. Y Wagne, L. The sorption of nonpolar organics by soils and sediments. *Reactions and movement of organic chemicals in soils.* Sawhney and Brown. Eds; Soil Science Society of America Inc. Wisconsin, USA. **1989** 40-41.
33. Heipieper, H., F. Weber, J. Sikkema, H. Kewelah, y J. de Bont. Mechanisms of resistance of whole cells to toxic organic solvents. *Tibtech.* **1994**, 12: 409-415.
34. Huertas, María Jose., Duque, Estrella., Molina, Lázaro., Rossello-Mora, Ramón., Mosqueda, Gilberto., Godoy, Patricia., Christensen, Bjarke., Molin, Soren., y Ramos, Julián. Tolerance to sudden organic solvents shock by soil bacteria and characterization of *Pseudomonas putida* strains isolated from polluted sites. *Environ. Sci. Technol.* **2000** 34: (16) 3395-3400.
35. Huesemann, M. H; y Moore, K. O. Compositional changes during landfarming of weathered Michigan crude oil-contaminated soil. *J. Soil. Contamination.* **1993**, 2(3): 245-264.
36. Inoue, A. Y Horikoshi, K. A. *Pseudomonas* thrives in high concentration of toluene. *Nature.* **1989**, 338: 264-266.
37. Isken, S; De Bont, J. A. M. Growth of microbial cells on hydrocarbons. *J. Bacteriol.* **1996**, 178, 6056-6058.
38. Isken, S; Derks, A; Wolffs, P., y Bont, J. Effect of organic solvents on the yield of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, 65(6):2631-2635.
39. Jiménez, I. y Bartha, R. Solvent-augmented mineralization of pyrene by *Mycobacterium sp.* *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**.31:2311-2316.
40. Keiji, Sugura., Masami, Ishihara., Toshitsugu, Shimauchi; y Shigeki, Harayama. Physicochemical Properties y biodegradability of crude oil. *Environ. Sci.* **1997**, Vol 31:1.

41. Kelsey J: Kottler B. y Alexander M. Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* **1997**. 31:214-217.
42. Kim H. Tan. Environmental soil science. Marcel Dekker Inc. USA. **1994**, pp.20-22, 51-52,97 y 116.
43. Laha, S. y Luthy, R.G. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-water system. *Biotechnol. Bioeng.* **1992**, 11, 1367-1380.
44. Ledesma, J. L., L., Arroyo y J. L. Hernández. Toxicología ambiental, análisis de la contaminación ambiental por derrames de hidrocarburos en el estado de Tabasco y su biorremediación por medio de tecnología de punta. **1994**. Instituto Tecnológico de Minatitlán, Minatitlán, Veracruz.
45. Lee, Kenneth and Francois, Xavier, Merlín. Bioremediation of oil on shoreline environments: development of techniques and guidelines. *Pure Appl. Chemical.* **1999**. Vol. 71, No. 1, 161-171. IUPAC.
46. Lin, S. Biosurfactants: Recent Advances. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **1996**, 66: 109-120.
47. Liu, Z; Jacobson, A. y Luthy, R. Biodegradation of naphthalene in aqueous nonionic surfactant system. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**. 61: 145-151.
48. Madigan, Matinkoy Parker. Brock, *Biología de los microorganismos.* **1998**. 8a Edición Prentice Hall .
49. Mansoori, G.A. Arterial blockage in the petroleum y natural gas industries heavy organic (asphaltene/bitumen, resin, organometallics, paraffin/wax, diamondoids, etc) deposition from petroleum fluids. An Internet publication. **1992**. http://www.uic.edu/~mansoori/HOD_html
50. Mansoori, G.A. Asphaltene, resin y wax deposition from petroleum fluids. *J. Arab Sci.* **1996**, 21 (48) 707-723.
51. Mata-Sandoval, JC., Kornis, J y Torrents, A. The influence of surfactants and biosurfactants on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants in subsurface environments. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **2000**. 16(4): 193-203.
52. Medina Moreno Alejandro. Lavado y composteo ex-situ de un suelo intemperizado con hidrocarburos. Tesis para obtener el grado de maestro en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa **1999**.
53. Método EPA 3540. U. S. Environ. Protection Agency. **1986**.
54. Método EPA 8440. U. S. Environ. Protection Agency. **1996**.

55. Munro, D. y Daugulis, A. The use of an organic solvent and integrated fermentation for improved xenobiotic degradation. *Res. Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32: 3785-3789.
56. Murado, M. A., Mirón, J. y González, M. P. Tratamiento microbiológico de la contaminación por petróleo en ambientes marinos. Estudio de su posible optimización. In: M M A (Eds), seguimientos de la contaminación producida por el accidente del buque AEGEAW. Monografías del Ministerio de Medioambiente, Madrid, pp 168-185. **1996**.
57. Nam, K; Chung, N. y Alexander, M. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. *Environ. Sci. Technol.* **1998**. 32: 3785-3789.
58. Knedi-kizza, P. Rao, P. y Hornsby A. Influence of organic cosolvents on leaching of hydrophobic organic chemicals through soils. *Environ. Sci. Technol.* **1987**.21:1107-1111.
59. Parés, I, F, R. y Juárez, G, A. Bioquímica de los microorganismos. Editorial Reverté, S.A. Barcelona. **1997**, 216-252.
60. Petróleos Mexicanos, en Noveno Congreso Internacional de CONIECO. Enviro-Pro TECOMEX **2001**.
61. Pignatello, J., y Xing B. Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* **1995**, 30:1-11.
62. Pirt. S. J. Principles of microte cell cultivation. Blackwell Sc. Pub. London. **1975**.
63. Ramos, J. L., Duque, E., Rodriguez-Herva, J. J., Godoy, P., Haidour, A., Reyes, F., y Fernyez-Barrero, A. Mechanisms for Solvent Tolerance in Bacteria. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272: 3887-3890.
64. Reardon, K; Mosteller, D. Y Rogers, B. Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixwd substrates for *Pseudomonas putida* Fl. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, 69:385-400.
65. Reiser-Roberts, Remediation of petroleum contaminants soils. Lewis Publishers, Washington. **1997**.pp 150.
66. Ressler; Weissenfels WD; Beyer, M., Klein, J. Degradation of phenantrene, fluorene y fluoranthene by pure bacterial cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, 32: 479-484.
67. Riis, V, Miethe, D y Moder, M. Analytical characterization of the persistent residues after microbial degradation of mineral oils. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1996**, 356:378-384.
68. Riser-Robers, E. Remediation of petroleum Contaminated Soils. Biological Physical, and Chemical Processes. Ed. LLC. **1996**.
69. Robertson, B. Y Alexander, M. Mitigating toxicity to permit bioremediation of constituents of nonaqueous-phase liquids. *Environ.*

- Sci. Technol.* **1996**, 30: 2066-2070.
70. Roldan-Martin, G. A. Remoción de hidrocarburos en un sistema de Biopilas con adición de texturizantes. Centro de Investigación de Estudios Avanzados del IPN. Tesis Doctoral. CINVESTAMBIENTE. **2003**.
 71. Rutherford, P, M; Banerjee, S, M; Luther, M, R; Gray, M, J; McGill, M, A; Pickard; y M, J, Salloum. Slurry-phase bioremediation of creosote and petroleum-contaminated soils. *Environ. Tech.* **1998**, 19: 683-696.
 72. SEMARNAP. Los Suelos de Tabasco Restauración, Conservación y Uso. Gobierno Constitucional del Estado de Tabasco. **1996**.
 73. Sikkema, J; De Bont, J. A. M; y Poolman, B. Mechanics of membrane toxicity of cyclic hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* **1995**, 59: 201-222.
 74. Silverstein, R, M; Clayton, B, G y Morrill, C, T. Identificación espectrométrica de compuestos orgánicos. **1981**. Editorial Diana, México.
 75. Tezak, J; Miller, J; Lawrence, A; Keffer, R. y Weightman, R. Bioremediation evaluation of surface soils contaminated with organic compounds. Society of Petroleum Engineers. Conference Proceedings. SPE 029195, **1994**, 345-353.
 76. Tissot B. S. y D. H. Welte. El petróleo su formación y localización: nuevas investigaciones para explotación de gas y petróleo. **1982** CONACyT, México.
 77. Vinalay, C., L. Diagnóstico sobre el manejo y disposición de lodos de perforación en la zona lacustre Julivá-Santa Anita, Tabasco, México. **1998**, Tesis de licenciatura en Ing. Ambiental. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
 78. Villemur, R; Deziel, E; Benachenhou, A; Marcoux, J; Gauthier, E; Lepine, F; Beaudet, R. y Comeau, Y. Two liquid-phase slurry bioreactors to enhance the degradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Biotechnol. Prog.* **2000**. 16:966-972.
 79. Volker, R; Dietmar, M; Möder, M. Analytical characterization of the persistent residues after microbial degradation of mineral oils. *Fresenius J Anal. Chem.* **1996**, 356: 378-384.
 80. Weber, F. J., Isken, S., y De Bont, J. A. M. *Microbiol.* **1994**, Vol 140, pp. 2013-2017.
 81. Wery, Jan; Budi, Hidayat; Jasper, Kieboom y Jhan A. M, Bont . An insertion sequence prepares *Pseudomona putida* S12 for severe solvent stress. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (8):5700-706.
 82. Yong, R. N; A. M. O. Mohamed y B. P. Warkentin. Principles of Contaminant Transport in Soils. **1992**. Elsevier Science Publishers. Netherlands.

83. Zhu X, Venosa, A. D., Cuidan, M. T. y Lee. K. Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati (USA). **2001**.
84. Zucconi, F & M. de Bertoldi Compost specifications for the production and characterization of compost from municipal solid waste."Compost: production, quality and use" ed. Bertoldi, Ferranti, L'Hemite y Zucconi. Elsevier Applied Science Publisher **1986**

Revisión Bibliográfica

Objetivos

Hipótesis

Materiales y Métodos

Resultados y Discusión

Conclusiones

Recomendaciones

Referencias Bibliográficas

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

SE LO DEDICO CON TODO MI AMOR A:

Sinuhé,

Nati y Emilio

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

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

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos y en especial a mi madre por todo su amor, apoyo y comprensión que me han dado.

A mis segundos padres Araceli y Victor, a Tía Pili, Tía Lili, por gran apoyo y comprensión.

Al Dr. Mariano y Dra. Tania, por su gran paciencia y sugerencias para la realización de la tesis.

Al Maestro Jorge Haro porque con el aprendí mucho y siempre conté con su apoyo.

A la Dra. Mayola quiero agradecer el interés, apoyo críticas y sugerencias que me brindó durante el desarrollo de la tesis.

Al Dr. Sergio Huerta por sus críticas gracias a las cuales se mejoró éste trabajo.

A mis compañeros y amigos de generación, también a Moni Montiel, Mayo, Ady, Laura, Alexis, Raúl y Lilus por la gran amistad que me han brindado, gracias por sus acertados comentarios y por los momentos especiales que compartimos.

A mis compañeros de la planta piloto y a los del laboratorio W108 Alejandro, Ildefonso, Erika por su amistad, apoyo y comprensión que me brindaron durante la estancia en los laboratorio.

A los profesores que durante los cursos de posgrado y licenciatura que contribuyeron en mi formación profesional.

Dedicatorias y Agradecimientos	i
Resumen	1
Índice de contenido	3
Índice de figuras y tablas	6
Introducción	9
Justificación	13
1 Revisión bibliográfica	
1.1 Composición del petróleo	16
1.2 Suelo contaminado con petróleo y derivados en México	19
1.3 Biodegradación del petróleo	20
1.4 Suelos contaminados e intemperizados y biodisponibilidad	27
1.4.1 Adición de surfactantes y biosurfactantes	29
1.4.2 Adición de disolventes orgánicos	30
1.5 Extracción y cuantificación de HTP	35
1.6 Productos intermediarios durante la biodegradación de hidrocarburos	36
1.7 Respirimetría	38
2. Objetivos	
2.1 General	41
2.2 Particulares	41
3. Hipótesis	42
4. Materiales y Métodos	
4.1 Reactivos	43
4.2 Medios de cultivo	43
4.3 Consorcio microbiano	44
4.3.1 Obtención y conservación	44
4.3.2 Propagación de microorganismos	44
4.3.3 Producción de esporas	45
4.4 Caracterización del suelo intemperizado	45
4.5 Unidad experimental	46

4.5.1	unidad experimental con agrolita	46
4.5.2	unidad experimental con tezontle	47
4.6	Extracción y cuantificación de HTP, en suelos intemperizados	47
4.6.1	Extracción de HTP en suelo intemperizado	47
4.6.2	Cuantificación de HTP por gravimetría	48
4.6.3	Cuantificación de HTP por espectroscopía infrarroja	49
4.7	Espectros de compuestos polares	50
4.8	Estudios de sorción	50
4.8.1	Sorción de HTP en agrolita	50
4.8.2	Sorción del tolueno en función de la humedad	51
4.8.3	Cuantificación del tolueno en la fase gaseosa	52
4.8.4	Sorción del tolueno en la unidad experimental	52
4.9	<i>MÉTODOS ANALÍTICOS</i>	53
4.9.1	pH del suelo	53
4.9.2	Determinación de humedad	54
4.9.3	Cuenta microbiana	54
4.9.4	Carbono Orgánico Total (COT)	55
4.9.5	Cuantificación de asfaltenos	55
4.10	Respirometría	56
4.10.1	Cuantificación del consumo de O ₂ en el respirómetro	56
4.10.2	Cuantificación del consumo de O ₂ y producción de CO ₂ por cromatografía de gases	56
5.	Resultados y Discusión	
5.1	Cuantificación de HTP, en suelos intemperizados	57
5.2	Estudios de sorción	61
5.2.1	Sorción de HTP en agrolita	61
5.2.2	Sorción de tolueno en función de humedad	62
5.3	Efectos en la adición de tolueno	66
5.3.1	En la respiración microbiana	66
5.3.2	En la biodegradación de HTP	79
5.4	Mineralización de hidrocarburos	85
5.5	Espectros de compuestos polares y HTP	87
5.6	Efecto del tolueno en: pH, humedad, cuenta microbiana y carbono orgánico total	90
5.6.1	Cinéticas de pH	90
5.6.2	Cinética de humedad	92

ÍNDICE DE CONTENIDO

5.6.3 Cuenta microbiana	93
5.6.4 Carbono orgánico total (TOC)	95
5.6.5 Concentración de Asfaltenos	97
5.7 Balances de HTP y carbono	98
6. Conclusiones	101
7. Recomendaciones	103
8. Referencias bibliográficas	105