



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**EFFECTO DE PRETRATAMIENTOS FISICOQUÍMICOS EN LA
BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO EN UN SUELO
INTEMPERIZADO, POR COMPOSTEO.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

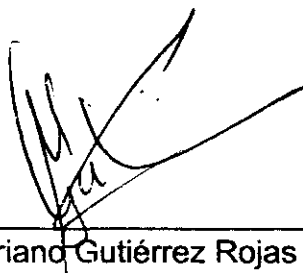
IBI. NANCY VELASCO ALVAREZ

DIRECTORES DE TESIS:

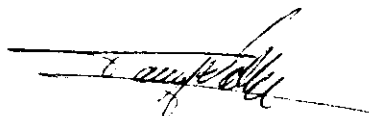
**DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS
DRA. TANIA L. VOLKE SEPÚLVEDA**

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis: Efecto de pretratamientos fisicoquímicos en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un suelo intemperizado, por composteo, que presentó la alumna de la Especialidad en Biotecnología Nancy Velasco Alvarez

Directores de Tesis:



Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa



Dra. Tania L. Volke Sepúlveda
Centro de Investigación y Capacitación Ambiental

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la Tesis: Efecto de pretratamientos fisicoquímicos en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un suelo intemperizado, por composteo, que presentó la alumna de la Especialidad en Biotecnología Nancy Velasco Alvarez

Directores de Tesis:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa

Dra. Tania L. Volke Sepúlveda

Centro de Investigación y Capacitación Ambiental

Esta tesis esta dedicada con todo mi amor
a la persona mas importante en mi vida
a ti **Ayax** por darme las fuerzas para seguir adelante
y enseñarme a luchar por lo que uno cree y quiere.

AGRADECIMIENTOS:

A mis asesores:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas, por el apoyo y buenos consejos en la realización de esta tesis, a la Dra. Tania Volke Sepúlveda por su apoyo incondicional, amistad y sabios consejos.

Al Dr. Ernesto Favela Torres por sus acertados comentarios y colaboración desinteresada.

A mis padres: Joaquin y Diana por darme la oportunidad de seguir estudiando.

A mis hermanos: Joaquin, Ulises y Diana por darme fuerzas y hacerme sentir que puedo.

A mis sobrinos: Vanne, Jenny y Alexis por hacerme ver que nada es imposible.

A mis amigos Ady, Erika, Sughey, Ana, Ilde, Alex, Nacho y Toño, por hacerme sentir como en familia, por su amistad y palabras de aliento en los momentos difíciles.

Y a todos los que hicieron posible la realización de este proyecto.

ÍNDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	8
2.1. Tecnologías para la remediación de suelos	8
2.2. El proceso de composteo	9
2.3. Etapas del composteo	10
2.4. El composteo aplicado a la biorremediación de suelos	10
2.5. Condiciones del proceso de composteo	11
2.6. Ventajas y desventajas de composteo	12
2.7. Suelos intemperizados y pretratamientos	15
2.8. Ecotoxicología	16
2.8.1. Aplicación de los bioensayos	17
2.8.2. Tipos de bioensayos	18
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. OBJETIVO	21
4.1. Objetivo general	21
4.2. Objetivos particulares	21
5. MÉTODOS Y MATERIALES	22
5.1. Preparación del suelo	22
5.2. Pretratamientos fisicoquímicos	22
5.3. Formulación de la composta	23
5.4. Preparación de las unidades experimentales (biopilas)	24
6. MÉTODOS ANALÍTICOS	25
6.1. Humedad	25
6.2. Actividad de agua	25

6.3. pH	25
6.4. Conductividad eléctrica	25
6.5. Determinación de cenizas	25
6.6. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	26
6.7. Análisis microbiológicos	26
6.7.1. Análisis respirométrico	26
6.7.2. Cuenta microbiana total	26
6.8. Análisis ecotoxicológico	27
7. RESULTADOS	28
7.1. Caracterización de la muestra original y después de los pretratamientos	28
7.2. Humedad y Actividad de agua	29
7.3. pH	30
7.4. Conductividad eléctrica.	30
7.5. Cenizas	31
7.6. Respirometría	32
7.7. Cuenta Microbiana	34
7.8. Degradación de hidrocarburos	35
7.9. Ecotoxicidad	37
8. CONCLUSIONES	40
9. BIBLIOGRAFÍA	41

RESUMEN

El abandono de sitios históricamente contaminados por hidrocarburos, provoca que los contaminantes se vuelvan inaccesibles (no biodisponibles) para los microorganismos. Estos suelos son conocidos como suelos intemperizados, los cuales se caracterizan por la acumulación y persistencia de los contaminantes. Para biorremediar este tipo de suelos, es necesario favorecer previamente la desorción de los contaminantes mediante la aplicación de uno o varios pretratamientos fisicoquímicos.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de diferentes tratamientos fisicoquímicos sobre la biodegradación de hidrocarburos del petróleo (HTP) en un suelo intemperizado, por un proceso de composteo.

Cerca de 35 kg de suelo intemperizado contaminado con HTP ($52,000 \pm 5,000$ mg/kg), fue dividido en 4 partes; de éstas una se utilizó como control sin tratar y a las tres restantes se les aplicó diferentes tratamientos para desorber los HTP: (i) surfactante (Tween 80, 0.83 g tveen/Kg de suelo, 24 h); (ii) tolueno (4.3g de tolueno/Kg de suelo, 24 h); (iii) electroquímico (1.75 mA/cm², 6 h). Posteriormente, con el fin de obtener un balance de nutrientes apropiado y para favorecer condiciones de composteo, cada parte de suelo tratado fue adicionada con compuestos orgánicos de fácil asimilación y agentes de volumen (bagazo de caña, de zanahoria, estiércol de caballo, y composta estable), para construir 4 biopilas (~25 kg). Las biopilas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 7 meses, y cada 20 días se analizó la concentración de HTP (EPA-3540C), la humedad, la conductividad, el pH y las cenizas. Una muestra de cada biopila fue utilizada para cuantificar el consumo de O₂ en línea por respirometría. Aunque la información sobre la biorremediación de suelos intemperizados es escasa, existen algunos estudios (UAM, 2001) que reportan valores de degradación de HTP entre 16 y 20% en 60 días en un suelo intemperizado con una concentración inicial de 80,000 ppm sin pretratar. En el caso de suelos no intemperizados se han reportado valores de degradación de HTP por composteo hasta de 60% (10,200 ppm) en 100 días. En el presente estudio se obtuvieron niveles de degradación significativamente mayores en las biopilas tratadas fisicoquímicamente, con respecto al control. Lo que demuestra que uno de los fenómenos que limita la biorremediación de este tipo de suelos, es la baja biodisponibilidad de los contaminantes.

Se demostró que el uso de pretratamientos fisicoquímicos para la desorción de HTP en un suelo intemperizado, favorece significativamente su biodegradación por un proceso de composteo.

Con base en la biodegradación de los HTP, el pretratamiento más eficiente después de 7 meses de composteo, fue el electroquímico, obteniéndose una degradación de 44%.

1. INTRODUCCIÓN

En México hay un número considerable de sitios contaminados con hidrocarburos, esto como resultado de fugas o descargas accidentales de petróleo crudo, así como por la disposición de recortes de perforación, lodos aceitosos y aceites lubricantes gastados (Iturbe, *et al.*, 2002), la falta de solución a estos problemas provoca que haya un número considerable de suelos intemperizados, que son aquellos que pasan mucho tiempo contaminados sin tratamiento. Como consecuencia, los contaminantes son inaccesibles para los microorganismos es decir, se encuentran no biodisponibles. Debido a la baja biodisponibilidad de estos contaminantes es necesario estudiar la aplicación de diferentes pretratamientos fisicoquímicos para incrementar la biodisponibilidad y poder así remediar el suelo (Guerin y Boyd, 1992).

Uno de los métodos de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, consiste en biorremediación con biopilas, que también se conocen como bioceldas, biomontículos o pilas de composteo. El proceso consiste en reducir las concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en los suelos a través de la biodegradación por la acción de diversos microorganismos nativos (Iturbe, *et al.*, 2002).

Un factor importante de la biorremediación, es asegurar que los productos generados no sean tóxicos. Para determinar la toxicidad de un suelo pueden realizarse bioensayos ecotoxicológicos que son una medida del impacto a los ecosistemas a través de las respuestas ocasionadas en los organismos ante su exposición a los agentes contaminantes, incluyendo alteraciones en el metabolismo, crecimiento, reproducción, mortalidad o daño genético. La información obtenida a partir de las pruebas ecotoxicológicas puede emplearse para evaluar la eficiencia de las tecnologías de remediación aplicada sobre el mismo (Sztern y Pravia, 1999).

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1. Tecnologías para la remediación de suelos

El comportamiento de un contaminante en el suelo, así como la efectividad de una tecnología de remediación, están determinadas por una variedad de factores que interactúan de manera compleja y que dependen de las características propias del contaminante (Volke y Velasco, 2002). En México existe un total de 86 empresas con registro federal, autorizadas para la restauración de suelos contaminados. De las tecnologías que ofrecen las empresas que cuentan con permisos para remediar suelos contaminados, el 54 % son tecnologías de remediación biológicas (biorremediación), el 42 % son tecnologías fisicoquímicas y solo el 4 % son empresas que realizan otro tipo de tratamientos (SEMARNAT, 2003).

Las tecnologías fisicoquímicas, utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la contaminación. Dentro de estas tecnologías se encuentran: la remediación electrocinética, lavado de suelo, extracción de vapores, estabilización y la separación física.

Para los tratamientos térmicos, se utiliza calor para incrementar la volatilidad (separación), de los contaminantes en un suelo. Algunas de estas tecnologías que utilizan calor son : desorción térmica, incineración, vitrificación y pirólisis.

Las tecnologías más usadas para la remediación de suelos en México son las de biorremediación, que han surgido como alternativas para el saneamiento de suelos contaminados, la aceptación de la biorremediación como una estrategia de limpieza viable, en muchos casos, depende de sus costos. Es decir, cuando el método biológico propuesto es menos costoso que los tratamientos físicos y químicos viables para el tratamiento de un sitio y de un contaminante en particular. Asimismo, muchas de las estrategias de biorremediación son competitivas en términos de costos y eficiencia sobre una matriz contaminada (Semple, *et al.*, 2001). Entre las tecnologías de biorremediación más comunes, se encuentran las siguientes (Deflaun, *et al.*, 2003; Volke y Velasco, 2002; Saval, 1998; Cunningham y Philp 2000):

i) Bioestimulación: Implica la adición de elementos nutricionales necesarios para estimular la actividad de los microorganismos que realizan la degradación o transformación de los contaminantes.

ii) Bioventeo: Es el suministro de aire para satisfacer los requerimientos de oxígeno de los microorganismos encargados de la biodegradación de los contaminantes presentes en el suelo.

iii) Bioaumentación: Implica la adición de microorganismos vivos para promover la biodegradación o biotransformación de los contaminantes.

iv) Fitorremediación: Es el uso de plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes de tipo orgánicos o inorgánico.

v) Composteo: Es un proceso biológico controlado, por el cual pueden tratarse suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables, para obtener subproductos inocuos estables.

2.2. El proceso de composteo

El composteo es un proceso comúnmente utilizado para el tratamiento de residuos agrícolas, sólidos municipales y de lodos (Potter, 1999). Desde hace unos 5 años, investigaciones han demostrado que el proceso de composteo, así como el uso de composta madura, es una solución de bajo costo y tecnológicamente efectiva para la biorremediación de suelos contaminados por residuos orgánicos peligrosos como hidrocarburos totales de petróleo (HTP), solventes, explosivos, pesticidas, e hidrocarburos poliaromáticos (HAP) (Velasco y Volke, 2003).

El proceso de composteo se puede definir como una técnica donde es posible ejercer un control sobre los procesos de biodegradación de la materia orgánica. La biodegradación es consecuencia de la actividad de los microorganismos que crecen y se reproducen en los materiales orgánicos en descomposición. La consecuencia final de estas actividades vitales es la transformación de los materiales orgánicos originales en otras formas químicas menos tóxicas. Los productos finales de esta degradación dependerán del tipo de metabolismo y de los grupos microbianos que hayan intervenido (Sztern y Pravia, 1999).

En una pila de material en composteo, si bien se dan procesos de fermentación en determinadas etapas y bajo ciertas condiciones, lo deseable es que prealezcan los metabolismos respiratorios de tipo aerobio, tratando de minimizar los procesos fermentativos y las condiciones anaerobias, ya que los productos finales de este tipo de metabolismos no son adecuados especialmente para una posible aplicación agronómica posterior y conducen a la pérdida de nutrientes.

Lo importante no es biodegradar, sino poder conducir esta biodegradación por rutas metabólicas que permitan la obtención de un producto final lo más apropiado posible, en el menor tiempo posible. El éxito de un proceso de composteo, dependerá entonces de aplicar los conocimientos de la microbiología, manejando el proceso de composteo como un medio de cultivo (EPA 1998).

A lo largo de la historia, se han empleado distintos procedimientos en la producción de composta que han generado numerosas publicaciones de divulgación con diferentes enfoques, posiblemente debido al desconocimiento de los mecanismos íntimos del proceso. Actualmente, se conoce la base científica de este proceso, por lo que puede llevarse cabo de una forma controlada (Sztern y Pravia 1999)

2.3. Etapas del composteo

El composteo se caracteriza por el predominio de los metabolismos respiratorios aerobios y por la alternancia de etapas mesotérmicas (10-40°) con etapas termogénicas (40-75°), y con la participación de microorganismos mesófilos y termófilos respectivamente. Las elevadas temperaturas alcanzadas, son consecuencia de la relación superficie / volumen de las biopilas y de la actividad metabólica de los diferentes grupos fisiológicos participantes en el proceso, que a continuación se detallan (Dosoretz, *et al.*, 2003):

Etapas de latencia: es la etapa inicial, considerada desde la conformación de la pila hasta que se registran incrementos de temperatura, con respecto a la temperatura del material inicial. La duración de esta etapa es muy variable, y depende de numerosos factores.

Etapas mesotérmica 1 (10-40°C): en esta etapa, se destacan las fermentaciones facultativas de la microflora mesófila, así como las oxidaciones aeróbicas (respiración aeróbica). Mientras se mantienen las condiciones de aerobiosis, actúan actinomicetos (aerobios estrictos). La etapa mesotérmica es particularmente sensible al binomio óptimo humedad-aireación. La actividad metabólica incrementa paulatinamente la temperatura. La falta de disipación del calor produce un incremento aún mayor y favorece el desarrollo de la microflora termófila que se encuentra en estado latente en los residuos. La duración de esta etapa es variable y depende también de numerosos factores (EPA 1998; Madigan, *et al.*, 1998).

Etapas termogénica (40-75°C): la microflora mesófila es sustituida por la termófila debido a la acción de bacilos y actinomicetos termófilos, entre los que también se establecen relaciones del tipo simbióticas. Normalmente en esta etapa, se eliminan todos los mesófilos patógenos, hongos y esporas.

Etapas mesotérmica 2: con el agotamiento de los nutrientes, y la desaparición de los microorganismos termófilos, comienza el descenso de la temperatura. Cuando la misma se sitúa aproximadamente a temperaturas iguales o inferiores a los 40°C, se desarrollan nuevamente los microorganismos mesófilos que utilizarán como nutrientes los materiales más resistentes a la biodegradación. Esta etapa se conoce generalmente como etapa de maduración. La temperatura descenderá paulatinamente hasta presentarse valores cercanos a la temperatura ambiente. En estos momentos se dice que el material se encuentra estable biológicamente y se da por culminado el proceso.

2.4. El composteo aplicado a la biorremediación de suelos

Los procesos de composteo pueden aplicarse para tratar suelos y sedimentos contaminados con compuestos orgánicos biodegradables. El composteo se ha usado con éxito, para la remediación de suelos contaminados con clorofenoles, gasolinas, HTP, HAP, y se ha demostrado también una

reducción en la concentración y toxicidad de explosivos hasta niveles aceptables (Van Deuren, *et al.*, 1997; Semple, *et al.*, 2001).

Existen varios sistemas de composteo para la biorremediación de suelos contaminados, no obstante el objetivo de todos es el mismo, la degradación de residuos contaminantes orgánicos o residuos peligrosos por la acción de diversos microorganismos presentes. Algunos de estos sistemas son:

Biopilas mezcladas: es un sistema de composteo sencillo que consiste en largos montículos alineados en paralelo sobre una superficie predeterminada y expuesta hacia la superficie. Antes de iniciar los pretratamientos se adiciona a la biopila los nutrientes necesarios, mezclándose para lograr la homogeneidad que permita la degradación. Durante el proceso es importante mantener la temperatura interior generada por el calor metabólico, así como la distribución adecuada de aire, agua, nutrientes y contaminantes, para ello la composta se mezcla manual o mecánicamente dependiendo de la actividad microbiana (Eweis, *et al.*, 1998).

Biopilas estáticas: a diferencia de las anteriores, las biopilas estáticas no necesitan mezclarse mecánicamente, ya que la aireación y homogeneización del calor en la composta se lleva a cabo por medio de un sistema de inyección (compresor) o extracción (vacío) de aire, mediante tubos colocados en la base alineados paralelamente a lo largo de la pila. En las biopilas estáticas, normalmente se emplea un sistema de extracción de aire, ya que ello permite la captura de los vapores de cierta fracción de compuestos orgánicos volátiles que llegan a ser removidos del suelo contaminado durante el proceso de aireación. Estos vapores son enviados a un sistema de biofiltración u oxidación catalítica para su tratamiento (Eweis, *et al.*, 1998).

Reactores cerrados: es el diseño que se emplea con menor frecuencia a pesar de sus notables ventajas en el control de procesos. La mezcla de la composta es adicionada dentro de un reactor donde se permite la aireación y la homogeneización constante. El reactor permite control de emisiones al aire en el caso particular de compuestos orgánicos volátiles y de los olores desagradables que pueden en algún momento reciclarse o tratarse separadamente. Otra característica importante de este tipo de biopila es que no esta expuesta a la atmósfera y por tanto la disipación de calor es mínima, manteniendo temperaturas estables así como el contenido optimo de humedad (Eweis, *et al.*, 1998).

2.5. Condiciones del proceso de composteo

Usualmente, una biopila de composteo necesita agentes de volumen para mejorar la estructura de la biopila, incrementando la porosidad y permitiendo una mejor biodisponibilidad de oxígeno. Por esta razón es deseable el uso de agentes de volumen con la capacidad de retención de agua, los cuales mantienen un contenido de humedad adecuado (Eweis, *et al.*, 1998), así como mantener los nutrientes necesarios para estimular la actividad microbiana.

Las condiciones óptimas y el éxito de un proceso de composteo depende de diversos parámetros, los cuales pueden resumirse en tres categorías: las características del suelo, las condiciones climáticas y las características de los contaminantes. Los parámetros que deben considerarse y controlarse para aumentar la eficiencia de un proceso de composteo se resumen en la Tabla 1 (Velasco y Volke, 2003).

Tabla 1. Parámetros a considerar y sus rangos óptimos durante un proceso de composteo para el tratamiento de suelos contaminados por compuestos orgánicos.

Parámetro	Rango óptimo
Humedad	40 -85%; 50 - 80% de la capacidad de campo
pH	6 - 8; con un óptimo de 7
Relación de nutrientes (C:N:P:K) ^a	100:(3.3-10):(0.5-1):(0.1-1)
Relación C/N; C/P; C/K ^b	10 - 30; 100 - 200; 100 - 1000
Relación suelo:aditivos (peso seco)	1.5:1 a 3:1
Temperatura	25 - 35 °C
Contaminante(s)	< 50,000 mg/kg
Metales tóxicos	< 2,500 mg/kg
Cuenta bacteriana	> 1,000 UFC ^c /g suelo seco

^a C:N:P:K se refiere al contenido (en peso) de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), en relación a 100 partes (en peso) de carbono (C)

^b C/N, C/P y C/K se refiere a las relaciones (en peso) de cada elemento relativas al carbono

^c UFC: unidades formadoras de colonias

2.6. Ventajas y desventajas del composteo

Aunque se ha demostrado que el proceso de composteo es efectivo para la degradación de contaminantes orgánicos o residuos peligrosos, también es cierto que tienen algunas limitaciones. (Van Deuren, *et al.*, 1997; Eweis, *et al.*, 1998; Iturbe, *et al.*, 2002; Volke y Velasco, 2002)

Ventajas:

- ❖ El diseño y construcción son relativamente fáciles.
- ❖ El suelo remediado mediante el proceso de composteo no requiere ser confinado después.
- ❖ Las biopilas ofrecen un costo más competitivo con respecto a otras técnicas de remediación de suelos.

Limitaciones:

- ❖ Los HAP de cinco y seis anillos son difícilmente degradables en las biopilas.
- ❖ El proceso de composteo es menos efectivo para concentraciones mayores a 50,000 ppm de HTP, concentraciones mayores de HTP puede causar toxicidad e inhibir la biodegradación.
- ❖ La presencia de metales pesados puede inhibir el crecimiento de microorganismos.
- ❖ Existe el riesgo de que ciertos compuestos originalmente inocuos, sean convertidos en productos tóxicos para una u otra especie.
- ❖ Este tipo de proceso requiere de mayor tiempo que los tratamientos físico químicos.

Sin embargo, se tienen reportes de investigaciones a nivel laboratorio, piloto y a gran escala, en los que se ha demostrado que el proceso de composteo es efectivo para biorremediar suelos contaminados por residuos orgánicos peligrosos como HTP, solventes, explosivos, pesticidas, HAP (Eweis, *et al.*, 1998; Semple, *et al.*, 2001).

Iturbe, *et al.*, (2002), biorremediaron por composteo un suelo *in situ*, contaminado por HTP, HAP y MTBE, de la refinería de una zona costera de México (Francisco I. Madero). La concentración de hidrocarburos presentes en este suelo era de 35 000 ppm., el proceso de composteo se llevó a cabo por medio de una biopila estática, con un sistema de aireación, los nutrientes se aplicaron de manera que se cumpliera la relación carbono:nitrógeno:fósforo de 100:15:1. Encontraron que después de 22 semanas (154 días), la remoción promedio de los HTP fue de 81%, mientras que los HAP no fueron detectados después de este periodo. Ellos concluyen que la biopila construida con suelo contaminado por HTP tuvo una buena remoción en poco tiempo. La aireación durante 20 minutos diarios así como las cantidades de nitrógeno y fósforo fueron las adecuadas. Por lo que ellos mencionan que las biopilas son un método técnico y económicamente adecuado para remediar suelos contaminados con hidrocarburos.

Chino, *et al.*, (1999), compostearon un suelo contaminado por HTP, localizado en el desierto de Kuwait en quince meses. Utilizaron tres técnicas para la biorremediación de este suelo:

- a) "Landfarming": con 1,500 m³ de suelo con una contaminación ligera de HTP (1.87%)
- b) Pilas mezcladas: con 500 m³ de suelo con una contaminación moderada de HTP (3.94%)
- c) Pilas estáticas: con 250 m³ de suelo con una contaminación ligera de HTP (1.87%)

Observaron que la tasa de degradación en el sitio donde se utilizó la técnica de "Landfarming" fue la más alta, en comparación con las otras dos técnicas utilizadas (pilas), considerando solamente los meses iniciales. Después de 15 meses, cerca del 80% del total de los HTP fueron degradados por la técnica de "Landfarming", mientras que en el caso de las pilas (estáticas y mezcladas), se degradó un 75%. Aunque los hidrocarburos alifáticos y aromáticos fueron degradados, las resinas y asfaltenos permanecieron sin degradación. Los análisis cromatográficos mostraron una disminución en los alifáticos saturados principalmente; mientras que los HAP de 3 anillos fueron degradados, los de 4 a 5 anillos fueron degradados después de 6 semanas y 50% de los HAP de 6 anillos fueron degradados después de los 12 meses.

De los tres métodos utilizados, el "Landfarming" resultó un método que requiere de más tiempo así como de una mayor cantidad de agua. En el caso de las biopilas mezcladas, que resultó el método más costoso, el costo se generó por la remoción del suelo; la pila estática tiene un costo "bajo" en comparación, pero solo se puede aplicar a suelos con concentraciones de HTP moderadas.

Potter, *et al.*, (1999), compostearon un suelo contaminado con HAP, provenientes de Reilly y de una empresa química en el parque de San Luis, Minnesota. Utilizaron 10 reactores (208 L) de acero inoxidable, controlados para mantener las condiciones requeridas (relación C:N:P de 100:5:1, aireación de 10 L/min), para llevar a cabo un estudio de tratabilidad en los suelos contaminados. La concentración inicial de HAP fue entre 17,000 y 45,000 ppm. Cada reactor contenía aproximadamente 100 Kg de una mezcla de suelo:aditivos 70:30. Se propusieron 5 diferentes mezclas de aditivos (Tabla 2)

Tabla 2. Aditivos e inóculos utilizados para la degradación de HAP (Potter, *et al.*, 1999)

Mezcla de aditivos	Inoculo	Degradación de HAP (%)
Nutrientes + maíz	Estiércol de vaca 1%	57.5 ± 1.2
Nutrientes modificados + maíz	Estiércol de vaca 1%	73.5 ± 0.8
Nutrientes + maíz	Lodos activados 1%	62.1 ± 0.7
Nutrientes + maíz	Lodos activados 5%	59.8 ± 11.8
Nutrientes + maíz	Lodos activados estériles 5%	66.5 ± 8.8

Los reactores se muestrearon durante la 1, 2, 4, 8 y 12 semanas del experimento, los resultados que se obtuvieron al realizar los análisis mostraron que ninguno de los tratamientos son significativamente diferentes. Ellos mencionan que con el composteo los niveles de HAP pueden ser reducidos, a través de cualquiera de los pretratamientos ya que reflejan la efectividad del composteo, y de no ser significativamente diferentes entre ellos. Este grupo plantea que es necesario incrementar la remoción de HAP de 5 y 6 años, así como aumentar la remoción total de las HAP:

Abiola, *et al.*, (1997), remediaron un sitio contaminado con HTP (20,000 ppm) por composteo, durante 100 días. Utilizaron materia orgánica y surfactantes, para disminuir los niveles de concentración de HTP usando dos técnicas: pilas estáticas y pilas mezcladas. Ellos obtuvieron la mayor remoción de HTP en las pilas mezcladas tratadas con surfactante (72%), y la menor degradación se obtuvo en la biopila mezclada control (43%). Los autores concluyen que la adición de surfactante ayuda a la remoción de HTP.

Beaudin, *et al.*, (1996), biorremediaron por composteo un suelo contaminado por hidrocarburos proveniente de la compañía *Imperial Oil*, en Sarnia, Ontario, Canadá. El suelo contaminado con hidrocarburos con una concentración inicial de 17,000ppm de los cuales el 40% correspondía a compuestos alifáticos, 32% a compuestos polares y 28 % a compuestos aromáticos. Se colocó en reactores de 8 L, se utilizó como fuente de carbono alfalfa y hojas de maple, con el fin de facilitar el crecimiento microbiano y como agente de volumen. La proporción que utilizaron los autores de materia orgánica fue de: 35.4% de alfalfa, 20.2% de hojas y 5% de inoculo (composta estable de 90 días). Los autores obtuvieron 60% de degradación en aproximadamente 100 días.

Todos los artículos mencionados muestran lo efectivo que puede ser el proceso de composteo para la reducción de la concentración de los hidrocarburos presentes en los suelos contaminados.

2.7. Suelos intemperizados y pretratamientos

En suelos contaminados por largos períodos (suelos intemperizados), los contaminantes llegan a ser inaccesibles (no biodisponibles) para los microorganismos que se desarrollan entre los contaminantes y la materia orgánica del suelo (García, *et al.*, 2002). La biodisponibilidad, y por tanto la velocidad de degradación, frecuentemente están limitados por procesos fisicoquímicos, como la sorción y desorción de los contaminantes hacia y desde la matriz de suelo, la difusión en la fase sólida y la disolución de contaminantes en la fase líquida (Bosma, *et al.*, 1997). El efecto negativo de estos fenómenos es la acumulación y persistencia de los contaminantes, y depende del tipo y calidad del suelo contaminado (Guerin y Boyd, 1992).

En suelos intemperizados, es necesario facilitar la desorción de los contaminantes mediante la aplicación de uno o varios pretratamientos antes de realizar un proceso de biorremediación (Pollard, *et al.*, 1994). Entre las tecnologías más aplicadas para desorber los contaminantes de suelos intemperizados destacan: el uso de solventes no polares (ej. tolueno), el uso de surfactantes no iónicos (Brij 30, Tween 80, Triton X-100, etc.), Extracción de vapores (remoción de volátiles y semi-volátiles) y la aplicación de tratamientos electroquímicos (Volke y Velasco, 2002; García, *et al.*, 2002; Laha, *et al.*, 1992; Ko, *et al.*, 2000). A continuación se detallan estos pretratamientos:

Tratamientos con surfactantes

El uso de surfactantes no iónicos, es una de las prácticas más comunes y efectivas empleadas en la desorción de compuestos orgánicos hidrofóbicos (COH) (Kotterman, *et al.*, 1998; Ghosh, 1997; Guha, *et al.*, 1996; Laha, *et al.*, 1992). El objetivo principal del uso de surfactantes, es incrementar la solubilidad de los COH, por medio de una fase micelar (hidrofílica/hidrofóbica) que se dispersa en agua, la cual propicia la desorción de los contaminantes del suelo hacia la fase líquida, lográndose un incremento en la biodisponibilidad de los contaminantes. La solubilidad de los contaminantes se lleva a cabo solamente cuando se forma la fase micelar, la cual se crea cuando se tiene una concentración de surfactante por arriba de la concentración micelar crítica (CMC) (Stelmack, *et al.*, 1999; Ko, *et al.*, 1998).

La eficiencia de desorción de un surfactante, depende del tipo de surfactante, de la dosis empleada, de la hidrofobicidad del contaminante, de la interacción surfactante-suelo y del tiempo de contacto surfactante-suelo (Guha, *et al.*, 1996). Sin embargo, la mejor eficiencia de desorción, no está siempre relacionada con la mejor eficiencia de degradación, debido principalmente a que el empleo de una alta concentración de surfactante, puede resultar tóxica para los microorganismos (Laha, *et al.*, 1992). Stelmack, *et al.*, (1999), demostró, que el uso de surfactantes reduce la adhesión de las bacterias en la superficie hidrofóbica, dando como consecuencia una baja actividad de biodegradación. Sin

embargo, para solucionar este tipo de problema, algunos investigadores recomiendan el uso de surfactantes que sean fácilmente degradables por los microorganismos (Brij 30, Brij 35 y Tween 80) (Ghosh, 1997).

Tratamientos con solventes

La aplicación de solventes se emplea para incrementar la solubilidad de los COH (Catherine, *et al.*, 1993). Uno de los solventes que ha recibido más atención es el tolueno. Una de las características principales del tolueno es que es un excelente solvente de compuestos polares y de asfaltenos (Fenistein, *et al.*, 1998) además de ser un compuesto que puede ser asimilado por microorganismos nativos del suelo (Ortiz, *et al.*, 2003; García, *et al.*, 2002). García, *et al.*, (2002), demostraron que la adición de tolueno en suelos intemperizados, tiene un efecto positivo en la desorción de HTP y en la biodegradación de estos compuestos. De acuerdo a sus resultados la adición de 14,000 mg de tolueno/Kg de suelo, incrementó la velocidad de degradación de los HTP de un suelo contaminado con una alta concentración de hidrocarburos (292,000 mg/kg), hasta tres veces más que la del suelo sin tolueno. En 30 días de tratamiento determinaron un 45% de degradación de HTP en el suelo tratado con tolueno.

Tratamientos electroquímicos

Esta tecnología en los últimos años ha recibido una atención significativa porque involucra los principios de electrocinética para la remediación in-situ de sitios contaminados con residuos peligrosos (Shapiro, *et al.*, 1993), considerándose una técnica ingenieril emergente para la remediación de suelos contaminados. Se realiza aplicando una corriente eléctrica directa, de baja intensidad a los suelos contaminados para separar y extraer contaminantes orgánicos e inorgánicos del suelo (Jackman, *et al.*, 2001). Se ha empleado para mejorar la biorremediación de suelos limosos poco permeables, y favorece el movimiento de bacterias, agua y nutrientes a través del suelo, incrementando así la eficiencia de la biodegradación (Riser-Roberts, 1995). De acuerdo con Jackman, *et al.*, (2001), la aplicación de una densidad de corriente de 3.72 A/m^2 favorece la migración de los compuestos orgánicos y a su vez estimula el metabolismo de los microorganismos para la biodegradación de estos compuestos. Loo (1994), estudió un tratamiento biológico *in situ*, mejorado por un proceso electrocinético, para tratar suelos contaminados con gasolina, diesel y keroseno, el tratamiento consistió en calentar el suelo ($38 \text{ }^\circ\text{C}$) para promover la biodegradación *in situ*, al mismo tiempo que se adicionó una solución de nutrientes que se distribuyó en la fracción arcillosa del suelo con el uso del proceso electrocinético. En menos de 6 meses, la concentración de HTP de $2,294 \text{ m}^3$ de suelo se redujo hasta 100 ppm.

2.8. Ecotoxicología

La ecotoxicología se define como la ciencia que estudia el efecto tóxico de sustancias (naturales o artificiales) en los organismos vivos que constituyen la biosfera, especialmente en poblaciones y

comunidades que se encuentran dentro de un ecosistema, siendo las metas de esta ciencia la evaluación, monitoreo y predicción del destino de las sustancias extrañas en el medio ambiente. La ecotoxicología está basada en el efecto adverso que estos producen a corto y largo plazo así como el efecto agudo y subletal. La ecotoxicología es una ciencia multidisciplinaria, en donde se combinan las ciencias de la química, toxicología, farmacología, epidemiología y ecología para comprender las fuentes, destino y efecto de los químicos en el ambiente (Connell, *et al.*, 1999). La ecotoxicología utiliza una serie de métodos y técnicas para el estudio del contaminante, desde la exposición, así como el estudio de las dosis y efectos en el ecosistema. La toxicidad del compuesto expresada como concentración: EC50 (Concentración que causa un efecto al 50% de los organismos de la población experimental), LC50 (Concentración Letal en que se presenta el 50% de mortandad), o NOEC (No Observed Effect Concentration, concentración en la cual no se observa el efecto estudiado), ha sido utilizado ampliamente dentro de las evaluaciones de riesgo ambiental como parte del componente de Análisis a través de la evaluación del efecto del estresante sobre el sistema (Neuberger, 2002).

Los datos obtenidos a partir de las pruebas ecotoxicológicas pueden emplearse para establecer el diagnóstico del grado de contaminación presente en este medio y para evaluar la eficiencia de las tecnologías de remediación aplicadas sobre el mismo (Neuberger, 2002).

2.8.1. Aplicación de bioensayos

Los ensayos de toxicidad, son bioensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa un tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa (Sverdrup, *et al.*, 2002). Los bioensayos consisten en la exposición de grupos de organismos, a concentraciones conocidas del tóxico por un tiempo determinado. Los organismos deben estar en buenas condiciones de salud, previamente aclimatados a las condiciones del ensayo, y se mantienen en condiciones ambientales constantes. Además se dispone de grupos de control (que no se exponen al tóxico). Luego se miden y registran los efectos biológicos observados en cada uno de los grupos control y tratados y, posteriormente, se efectúa un análisis estadístico de la información.

Los efectos tóxicos a evaluar pueden ser: mortalidad, inmovilidad, inhibición del crecimiento de la población, alteración del comportamiento y peso, entre otros. Se determinan distintas variables como, por ejemplo, la concentración letal 50 (CL₅₀), que es la concentración letal para el 50 % de los individuos expuestos. Las condiciones de los cultivos y los bioensayos deben estar altamente estandarizadas para permitir la comparación de los resultados. (Gestel, *et al.*, 1990; Potter, *et al.*, 1999). Los bioensayos de ecotoxicidad, permiten establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben y comparar la sensibilidad de una o más especies hacia distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico.

2.8.3. Tipos de bioensayos

Los bioensayos mas utilizados en los estudios de ecotoxicidad para la valoración de la calidad del suelo son: germinación de semillas, crecimiento de plantas, crecimiento de lombrices y de microorganismos. Existen otros bioensayos menos usados como: elongación de la raíz, actividad deshidrogenasa, mutagenicidad, entre otros; los cuales son poco ocupados. A continuación se detallan los principios de algunos de los citados bioensayos (Potter, *et al.*, 1999; Lau, *et al.*, 2000).

Bioensayo de germinación de semillas y crecimiento de plantas.

Las plantas verdes son pioneras y productores primarios de todo los ecosistemas. El proceso fotosintético de las plantas y un grupo restringido de microorganismos produce oxígeno del cual dependen otros integrantes del sistema (Escalante, 2000).

Los bioensayos con plantas se han desarrollado para estimar la toxicidad aguda de los contaminantes sólidos en condiciones que asemejen lo más posible el ambiente natural, además los factores ambientales tienen efectos importantes sobre las plantas y los tóxicos, incluso la sensibilidad de las plantas varía sustancialmente con condiciones tales como el pH, temperatura, interacciones entre sustancias y cantidad de materia orgánica del suelo. Algunos estudios han demostrado que la sensibilidad de plantas y otros grupos de organismos depende del tipo de sustancia tóxica a la que se expone, del grupo taxonómico y la especie a la que pertenece (Wang, *et al.*, 1994).

Para efectuar este tipo de bioensayos se recomiendan dos tipos de especies, la semilla de lechuga (*Lactuca sativa*) y de avena (*Avena sativa*), ya que ambas especies han sido ampliamente utilizadas y se cuenta con mayor información sobre ellas.

Bioensayos con lombrices.

Las lombrices han sido utilizadas para el monitoreo de la limpieza de los suelos, dada su amplia importancia en los ecosistemas terrestres. Estos organismos aportan la mayor contribución a la biomasa edáfica, considerando su gran tamaño, y juegan un papel principal en el mantenimiento de la estructura, aireación, drenaje y fertilidad de los suelos, además de contribuir a la degradación de la materia orgánica y estimular la actividad microbiana (Sztern y Pravia, 1999). Este bioensayo provee información acerca de la toxicidad aguda de una sustancia a las lombrices ya sea por ingestión de partículas de suelo contaminado o por exposición dérmica (a través de la mucosa) (Escalante, 2000).

En el bioensayo con lombrices se determinan puntos finales, tanto de mediciones puntuales, como mortalidad y comportamiento, así como el crecimiento de los organismos reportado como la ganancia o pérdida de peso a través del tiempo de exposición.

Bioensayos con microorganismos.

Los microorganismos son los principales organismos de los ecosistemas, destacándose su participación en el ciclo de los nutrientes y su capacidad de biotransformar algunas sustancias. Éstos pueden servir como indicadores de efectos potenciales de un tóxico de tal forma que los resultados obtenidos pueden extrapolarse a organismos superiores del ecosistema (Madigan, *et al.*, 1998; Atlas, 1991).

Los bioensayos con microorganismos y en especial con bacterias, poseen numerosas ventajas con respecto a otras pruebas biológicas, debido al corto ciclo de vida de la mayoría de las bacterias, estas pruebas son rápidas y fáciles de realizar. La toxicidad de los contaminantes sobre las bacterias es generalmente medida en términos de consumo de oxígeno, niveles de ATP, formación de colonias e inhibición de crecimiento.

Los bioensayos que usan hongos filamentosos o levaduras son menos comunes que los que utilizan bacterias. Una medida directa de la toxicidad de una sustancia, en el caso de hongos filamentosos, es estimular la germinación de esporas después de un tiempo dado de exposición.

3. JUSTIFICACIÓN

México presenta un número considerable de sitios contaminados con hidrocarburos, la falta de solución a estos problemas tienen como consecuencia, que los contaminantes presentes en este tipo de suelos sean inaccesibles para los microorganismos es decir, no biodisponibles. Debido a la baja biodisponibilidad de los contaminantes es necesario estudiar la aplicación de diferentes pretratamientos fisicoquímicos para incrementar la biodisponibilidad y poder así remediar un suelo contaminado por un largo periodo de tiempo (intemperizado).

Por lo anterior en este trabajo se plantea la utilización de diferentes pretratamientos fisicoquímicos que serán utilizados para desorber los hidrocarburos totales de petróleo en un suelo intemperizado y de esta manera asegurar su biodisponibilidad para los microorganismos, permitiendo su biodegradación. Permitted evaluar el efecto de los diferentes pretratamientos fisicoquímicos sobre la biodegradación de hidrocarburos de petróleo en un suelo intemperizado.

4. OBJETIVO

4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes pretratamientos fisicoquímicos sobre la biodegradación por composteo de hidrocarburos de petróleo presentes en un suelo intemperizado.

4.2. Objetivos particulares

- Formular la composición de la composta
- Evaluar la biodegradación de los hidrocarburos totales de petróleo en un suelo intemperizado, por efecto de diferentes pretratamientos fisicoquímicos
- Evaluar la ecotoxicidad del suelo en función de los pretratamientos y del proceso de composteo

5. METODOS Y MATERIALES

5.1. Preparación del suelo

Se colectó suelo contaminado con hidrocarburos de una región pantanosa (Santa Alejandrina, Minatitlan, Veracruz). El suelo recolectado se tamizó con una malla de No. ocho y se dejó seco a temperatura ambiente. Se determinó la concentración de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) mediante el método EPA 3540 C (extracción sólido-líquido de compuestos orgánicos semivolátiles y no volátiles en suelos y sedimentos. USEPA, 1986).

5.2. Pretratamientos fisicoquímicos

El suelo tamizado y seco se dividió en cuatro partes iguales (nueve kilos) y se sometió a diferentes tratamientos fisicoquímicos (electroquímico, tolueno y surfactante).

Pretratamiento electroquímico: El suelo seco se humedeció con una solución de sulfato de amonio 0.1M hasta humedad del 30%. El tratamiento electroquímico se realizó en la celda de vidrio. (Figura 1), provista de una placa de acero inoxidable recubierta con una capa de titanio. El tratamiento se realizó haciendo pasar una corriente constante de 1.75 mA/cm^2 durante 6 horas, manteniendo el pH entre 5 y 7. (UAM, 2001).

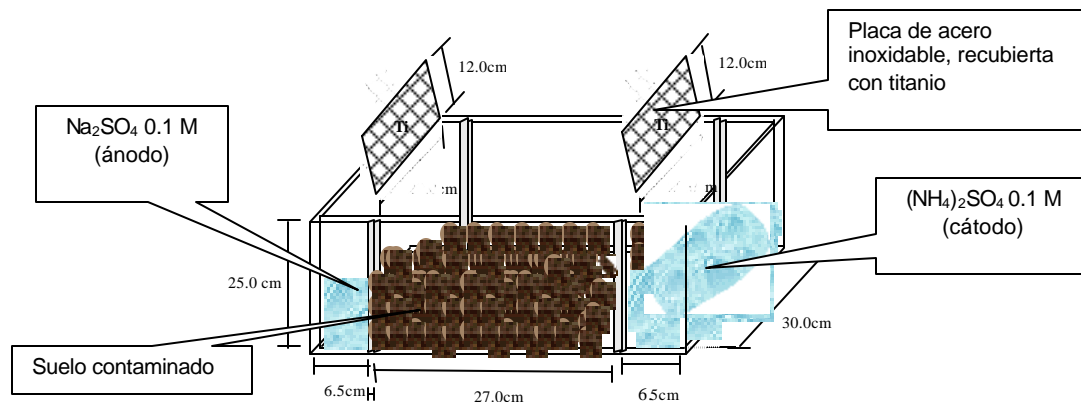


Figura 1. Representación esquemática de la celda de vidrio utilizada para el tratamiento electroquímico.

Para el tratamiento, se utilizó una solución de sulfato de amonio 0.1 M (en el cátodo) y una solución de sulfato de sodio 0.1 M (en el ánodo), para favorecer la migración de los compuestos orgánicos del ánodo hacia el cátodo.

Posteriormente el suelo se retiró de la celda, dejándose secar a temperatura ambiente.

Pretratamiento con tolueno: Para llevar a cabo el tratamiento con tolueno, el suelo se depositó en una bolsa de plástico, para posteriormente adicionar tolueno a una concentración de 0.5%

(v/peso seco). Una vez adicionado el tolueno al suelo, este se homogenizó y se mantuvo dentro de la bolsa durante 24 horas.

Pretratamiento con surfactante: Se utilizó un surfactante no iónico (Tween 80). Este tratamiento se realizó colocando el suelo contaminado en un recipiente, adicionando una solución de Tween 80 disuelto en agua (2.5 g/L) hasta llegar a una humedad del 30%. El suelo se mezcló perfectamente con el surfactante y se dejó reposar por 24 horas. Posteriormente el suelo tratado se dejó secar a temperatura ambiente.

5.3. Formulación de la composta

Para mejorar las propiedades físicas del sistema de composteo (porosidad y capacidad de retención de agua), así como para favorecer el balance de nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos, se adicionó al suelo una mezcla de compuestos orgánicos de fácil degradación como agentes de volumen (aditivos), de esta manera se eligieron los siguientes: a) estiércol de caballo (fuente de microorganismos y sales), b) bagazo de zanahoria (fuente de vitaminas y azúcares), c) composta estable (fuente de microorganismos especializados) y d) bagazo de caña (fuente de porosidad y retención de agua). Además de los aditivos mencionados, se adicionó azúcar a las biopilas con el objeto de ajustar la relación C/N a un valor de 28. La aportación de cada uno de los aditivos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Aporte de nutrientes por aditivo adicionado y para cada biopila.

Compuesto	Composición por aditivo (%)				Composición por biopila (g)			
	C	N	P	K	C	N	P	K
Suelo	2.5	0.25	-	-	221.3	22.1	-	-
HTP (50 g/kg)	85	-	-	-	391.2	-	-	-
Composta	30	1.1	1	1.25	337.5	12.4	11.3	14.1
Estiércol de caballo	43	1.6	0.4	2.43	483.8	18.0	4.5	27.3
Bagazo de zanahoria	35	1.9	0.4	-	393.8	21.4	4.5	-
Bagazo de caña	46	1.4	1.23	0.92	517.5	15.8	13.8	10.4
Azúcar	42	-	-	-	176.4	-	-	-
Total (Kg)					2521	89.6	34.1	51.8
Balance de nutrientes teórico (por biopila)					C/N=28; C/P=74; C/K=50			
Balance de nutrientes recomendada					C/N=30; C/P=100; C/K=200			

En la Tabla 3 se muestra la cantidad teórica de nutrientes aportados por cada agente de volumen adicionado a las unidades experimentales (control, electroquímico, tolueno y surfactante). Cabe mencionar que los porcentajes de cada uno de los aditivos fueron teóricos.

5.4. Preparación de las unidades experimentales (biopilas)

Cada biopila se preparó con aproximadamente 9 kilogramos de suelo seco pretratado y con aproximadamente 4.5 kilogramos (peso seco) de una mezcla de los aditivos antes mencionados (relación suelo:aditivos, 2:1). La mezcla se homogenizó y se colocó en recipientes de plástico, las cuales se identificaron de acuerdo al pretratamiento realizado: i) pretratamiento electroquímico, ii) pretratamiento con surfactante, iii) pretratamiento con tolueno y iv) control (sin pretratamiento). Posteriormente se le agregó agua a cada biopila hasta una humedad de 55 %, homogenizando perfectamente. En la Tabla 4 se resume la composición y peso final de cada biopila. (Eweis, *et al.*, 1998).

Tabla 4. Cantidad de aditivos por biopila

Compuesto	MS (kg)	H (%)	MH (kg)
Suelo	8.85	2	9.03
Composta	1.125	11	1.26
Estiércol de caballo	1.125	66	3.31
Bagazo de zanahoria	1.125	84	7.03
Bagazo de caña	1.125	34	1.70
Azúcar	0.420	0	0.420
Total (kg)	14.2		28.2

MS: peso del componente en base seca, **MH:** peso del componente en base húmeda, **H:** Porcentaje de humedad

Las biopilas se mantuvieron en el área de composteo de la UAM-I durante siete meses (Figura 2).



Figura 2. Sistema experimental (biopilas)

6. MÉTODOS ANALÍTICOS

A lo largo del proceso se cuantificó la humedad, actividad de agua, pH, conductividad eléctrica, cenizas, HTP, respirometría, cuenta microbiana total y ecotoxicidad. Cada una de las variables se analizó por triplicado. A continuación se describe el procedimiento utilizado para cuantificar cada una de las variables de respuesta.

6.1. Humedad

La humedad se determinó en una termo balanza Ohaus modelo MB45, por diferencia de peso entre el material húmedo y el material seco. Una cantidad conocida de muestra húmeda (3 a 3.5 gramos), se colocó en charolas de aluminio, y se secaron a 130°C hasta peso constante.

6.2. Actividad de agua

La actividad de agua (A_w), se mide como la relación entre la presión de vapor de agua de una muestra y la presión de vapor de agua pura a la misma temperatura. Se utilizó un equipo Aqualab, modelo CX-2. La muestra se colocó en una celda para determinar la actividad de agua, y la determinación se realizó directamente en el equipo.

6.3. pH

A 1 g de suelo seco y se adicionaron 10 mL de agua destilada, la suspensión se agitó durante 10 minutos. Se tomó la lectura de pH en el sobrenadante con un potenciómetro digital (Conductronic pH 20).

6.4. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica se determinó con un conductivímetro (conductronic Modelo CL30). Para determinar la conductividad eléctrica, a 1 g de muestra seca se le adicionaron 10 mL de agua destilada (1:10 suelo:agua [p/v]). Las muestras se mantuvieron en agitación (10 minutos), y se determinó la conductividad eléctrica a temperatura ambiente.

6.5. Determinación de cenizas

Esta prueba se llevó a cabo gravimétricamente por diferencia de pesos. Se colocaron 3 g de muestra seca en crisoles de porcelana a peso constante, posteriormente fueron sometidos a calcinación (800°C) en una mufla (Fisher Scientific) durante 24 horas. Finalmente se registró el peso del crisol con la muestra calcinada.

Para llevar a cabo la corrección de biodegradación de los HTP respecto a las cenizas, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Cenizas}}{\text{Cenizas}_{t=0}} \left| \frac{\text{HTP}_{t=0}}{\text{Cenizas}_{t=0}} \right. = \text{HTP}_{\text{teóricos}}$$

Donde:

$$\text{HTP}_{\text{corregidos}} = \text{HTP}_{\text{teóricos}} - \text{HTP}_{t=x}$$

Esta fórmula relaciona la concentración de cenizas en el tiempo cero ($t=0$), las cenizas en el transcurso del tiempo ($t=x$) y la cuantificación de HTP en el $t=0$, para obtener la concentración de HTP en el $t=x$.

6.6. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP)

Los hidrocarburos presentes en la muestra fueron extraídos por Soxhlet, con diclorometano como agente de extracción y cuantificados gravimétricamente.

Para cuantificar gravimétricamente los compuestos solubles en diclorometano de la muestra, se utilizó el método EPA 3540C (extracción sólido-líquido de compuestos orgánicos semivolátiles y no volátiles en suelos y sedimentos USEPA, 1986).

- Se colocaron aproximadamente 10 g de muestra seca más sulfato de sodio anhidro (~10 g) en un cartucho de celulosa (135 x 80 mm).
- Los cartuchos se colocaron en un equipo de extracción Soxhlet (250 mL), con 160 mL de diclorometano.
- Cada muestra se mantuvo en extracción continua con reflujo durante 8 h a 70 °C.
- Posteriormente el solvente se evaporó de los matraces de vidrio (peso constante) y se determinó la concentración de HTP por diferencia de peso.

6.7. Análisis microbiológicos

6.7.1. Análisis respirométrico

Esta variable, a diferencia del resto, se realizó por duplicado durante los tres primeros meses de la investigación. Para lo cual 50 g de suelo húmedo fueron colocados en reactores de 500 g. Las muestras se colocaron en un respirómetro (Comput-OX 244) y se cuantificó el consumo de O_2 en línea durante 100 días a 28 °C.

6.7.2. Cuenta microbiana total

Para llevar a cabo el análisis, se realizan diluciones seriadas de una muestra de suelo (3 g. base húmeda), las cuales se inocularon en dos tipos de medio de cultivo: agar de soya y tripticaseína

(AST), que favorece el crecimiento de bacterias; y agar de papa y dextrosa (PDA), que favorece el crecimiento de hongos filamentosos

Se reporta el número de microorganismos, como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra de suelo original (base seca).

6.8. Análisis ecotoxicológico

Bioensayo con lombrices (*Eisenia foetida* L. (Annelida))

El bioensayo se realizó de acuerdo con la *Guía de Pruebas de Efectos Ecológicos* OPPTS 859.4100 de la EPA (USEPA, 1996b). El método se conoce como método de suelo artificial y se basa en la determinación de la toxicidad por contacto o por ingesta, utilizando suelo contaminado o suelo artificial al cual se le agrega la sustancia a estudiar.

Para llevar a cabo la prueba, se seleccionaron organismos adultos de 200-350 mg de peso, y se utilizaron 10 individuos por recipiente de prueba.

Los recipientes de prueba (frasco de vidrio de 1 L, Figuras 3 y 4) se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada (30 °C). El suelo control (artificial) y el suelo de cada una de las biopilas se colocó en los recipientes de prueba (200 g peso seco por recipiente). Se humectó con agua destilada hasta una humedad del 45 – 55 %. Las lombrices (previamente pesadas) se colocaron en la superficie del suelo y los recipientes se taparon con un plástico con orificios. Durante los 14 días que duró la prueba, los individuos no se alimentaron.



Figura 3. Recipientes utilizados para el bioensayo con lombrices



Figura 4. Recipiente con lombrices

La variable de respuesta medida en este bioensayo fue la sobrevivencia de lombrices y su peso final, además de obtener la concentración letal 50 (LC₅₀). El conteo y peso se realizó al final del bioensayo (después de 14 días). Para determinar el peso de las lombrices vivas, éstas se lavaron con agua y se registro el peso de cada una.

7. RESULTADOS

Para determinar que tan favorable fue utilizar pretratamientos fisicoquímicos (tolueno, surfactante y electroquímico) para desorber los HTP del suelo y así asegurar su biodegradación, fue necesario llevar un registro de las variables de respuesta como; las concentraciones de los HTP, pH, cenizas, conteo en placa de microorganismos, entre otras, éstas son variables importantes ya que dependiendo de los resultados obtenidos a lo largo del proceso de composteo, fue como se determino la eficacia de los tratamientos fisicoquímicos utilizados en la degradación de los HTP presentes del suelo intemperizado.

A continuación se muestran las variables de respuesta que fueron registradas antes del proceso de composteo (suelo original) y después del proceso de composteo (207 días) en las cuatro biopilas

7.1. Caracterización de la muestra original y después de los pretratamientos

La caracterización del suelo original y del los suelos una vez pretratados, con surfactante, electroquímicamente y con tolueno se muestran en la Tabla 5. Hay que recordar que el suelo que se utilizó se trata de un suelo intemperizado el cual presenta una baja biodisponibilidad de HTP y por consiguiente fue necesario pretratarlo antes del inicio del proceso de composteo, para asegurar de alguna manera la biodisponibilidad de los HTP presentes en este suelo intemperizado.

Tabla 5. Contenido de hidrocarburos (HTP), densidad, pH y conductividad eléctrica (CE) del suelo contaminado, antes (suelo original y control) y después de aplicar los pretratamientos.

Muestra	Densidad (g/mL)	HTP (mg/kg)	CE (mS/cm)
Suelo original	1.41 ± 0.01	52,319 ± 4,991	0.46 ± 0.02
Control	-	-	0.46 ± 0.02
Surfactante	-	-	0.76 ± 0.00
Electroquímico	-	-	1.65 ± 0.10
Tolueno	-	-	0.71 ± 0.01

Como se observa en la Tabla 5, el pH del suelo original se incrementó alrededor de una unidad después de realizar los pretratamientos. La conductividad eléctrica de igual manera presentó cambios con respecto al suelo control, aunque el suelo pretratado electroquímicamente tuvo un incremento hasta de tres veces con respecto al suelo control.

La CE es una medida de la cantidad total de sales o iones disueltos en el medio. La presencia de fuentes de iones (contaminantes) provoca un aumento en esta variable, de manera que el incremento registrado en el suelo por efecto de los pretratamientos, sugiere la desorción de iones o contaminantes inicialmente sorbidos.

En la Tabla 6 se muestra el contenido de HTP, pH y CE de los suelos pretratados una vez adicionados los agentes de volumen.

Tabla 6. Contenido de hidrocarburos (HTP), pH y conductividad eléctrica (CE) del suelo adicionado con agentes de volumen.

Muestra	HTP (mg/kg)	pH	CE (mS/cm)
Control	45,693 ± 4,306	7.43 ± 0.03	2.55 ± 0.34
Surfactante	43,327 ± 1,552	7.40 ± 0.13	3.70 ± 0.11
Electroquímico	42,334 ± 1,939	7.53 ± 0.02	2.97 ± 0.06
Tolueno	43,227 ± 1,214	7.86 ± 0.03	3.17 ± 0.02

Puede observarse que los cuatro parámetros presentados en la Tabla 6 registraron cambios significativos en comparación con los que se muestran en la Tabla 5 para el suelo solamente pretratado. Debido a la dilución del suelo con los agentes de volumen, se registró una disminución en el contenido de compuestos extraíbles por el método Soxhlet. Los valores de CE aumentaron con respecto al suelo original, debido posiblemente a un aumento en la cantidad de sales solubles aportadas por los materiales adicionados.

7.2. Humedad y actividad de agua

A lo largo del proceso de composteo, las unidades experimentales mantuvieron una humedad entre 43 y 53 % (Figura 5). Cerca de los 120 días se registró una disminución de la humedad, debido a que en este tiempo se aplicó un segundo pretratamiento al material, por lo que fue necesario dejar secar un poco las biopilas (se detalla mas adelante). Sin embargo, como puede observarse en la Figura 6 la actividad de agua se mantuvo constante, durante todo el proceso (0.997 – 0.999), aunque en un inicio la A_w era baja (0.894 – 0.935).

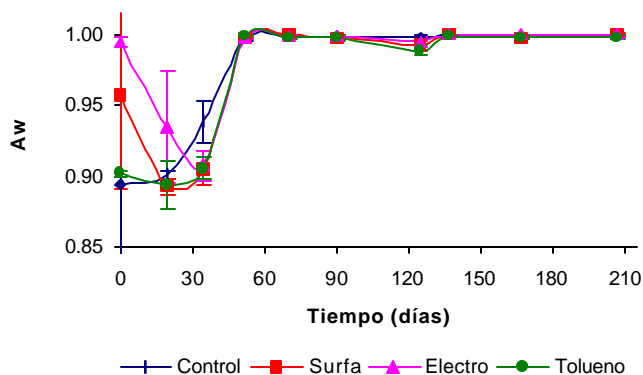


Figura 5. Cinéticas de humedad de las biopilas durante el proceso de composteo

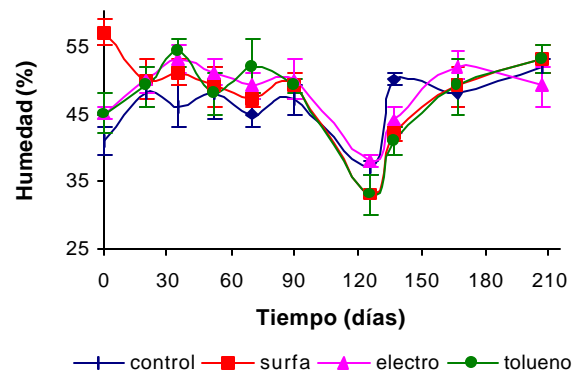


Figura 6. Actividad de agua para las biopilas durante el proceso de composteo

Para tener una gran variedad de microorganismos, es recomendable mantener una actividad de agua entre 0.9–0.99. Para bacterias entre 0.85 y 0.99, levaduras entre 0.75 - ≤ 0.9 y hongos entre 0.6 y 0.9 (Madigan, *et al.*, 1998; Atlas, 1991). Cuando la A_w disminuye por debajo de los

valores reportados, la actividad metabólica de estos microorganismos puede verse afectada, además que el medio puede hacerse selectivo para ciertos microorganismos.

7.3. pH

Al iniciar el tratamiento de composteo, los valores de pH en las unidades experimentales, se encontraban entre 7.4 – 7.8, aunque entre los 20 y 42 días se observó un incremento del pH, entre 8.9 y 9.2 (Figura 7). El incremento del pH pudo deberse a una inadecuada aireación de las unidades experimentales, provocando condiciones anóxicas, y esto se ve reflejado en el aumento del pH. Debido a este aumento, se adicionó a las biopilas periódicamente una solución de ácido fosfórico (0.5%), con la finalidad de reducir gradualmente el pH. Esta adición se suspendió cuando se registró una disminución (~ 1 unidad) manteniendo las biopilas en un rango entre 6 y 8, que es el rango en el cual se ve favorecido el crecimiento de la gran mayoría de los grupos microbianos. Valores de pH inferiores a 6 (ácidos) inhiben el crecimiento de la gran mayoría de los grupos microbianos, lo mismo pasa con valores mayores de 8 (alcalinos).

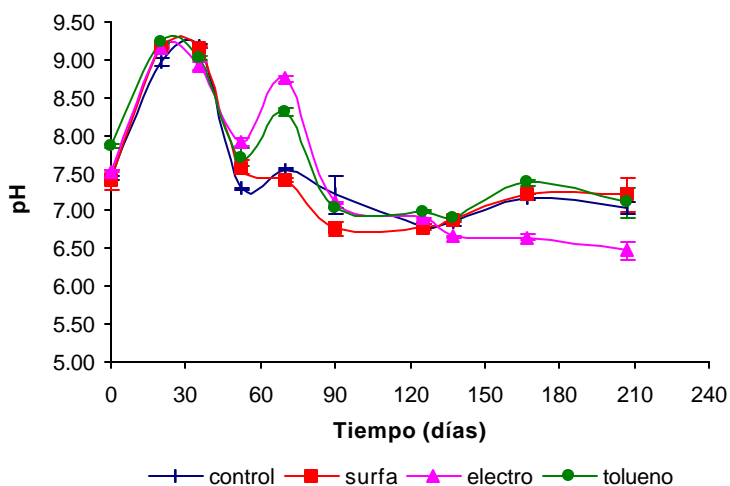


Figura 7. Valores de pH registrados en las biopilas durante 10 días.

7.4. Conductividad eléctrica

Como se puede observar en la Figura 8, la conductividad eléctrica (CE) tuvo una disminución de aproximadamente una unidad, durante los primeros 90 días durante el proceso de composteo en las cuatro biopilas, aunque las biopilas con pretratamientos (electroquímico, tolueno y surfactante), registraron valores por encima de la biopila control, como se había mencionado anteriormente.

Después de los 90 días del proceso de composteo se observó un incremento en la conductividad eléctrica en todas las biopilas (hasta de 1.2 unidades).

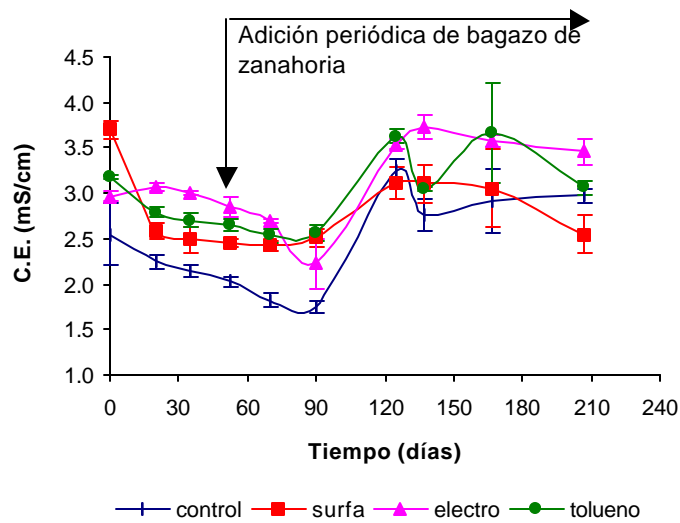


Figura 8. Cambios en la conductividad eléctrica (CE) en función de los pretratamientos, durante el proceso de composteo.

Es importante recalcar que la conductividad eléctrica es una medida de sales disueltas en el medio, por lo que puede suponerse que al inicio del proceso la disminución en la CE, se debe a la asimilación de las sales por efecto de la acción de los diversos microorganismos presentes en las biopilas. El aumento observado a partir de los 90 días sugiere una concentración de las sales en las biopilas, esto quizá también se deba a la adición periódica de bagazo de zanahoria (1.5 Kg base húmeda) a partir del día 52 del proceso de composteo (se detalla mas adelante).

El valor de CE en un suelo es importante para establecer valores críticos de salinidad, ya que de esta manera se puede determinar la concentración de sales que puede dañar a las plantas y/o microorganismos (CE crítica). En investigaciones realizadas con procesos de composteo y vermicomposteo se demostró que valores mayores a 8 mS/cm puede provocar efectos negativos en lombrices y poblaciones microbianas así como en la biotransformación de compuestos orgánicos (Santamaría, *et al.*, 2001)

7.5. Cenizas

La determinación de cenizas es una medida indirecta del consumo de la materia orgánica. Esta determinación se realizó con el objetivo de hacer correcciones a lo largo del proceso de composteo, con respecto a la degradación de hidrocarburos.

Como se observa en la Figura 9, la concentración de cenizas se mantuvo en ascenso hasta los 52 días, lo que indica una biodegradación de materia orgánica, después de este tiempo la

concentración de cenizas comenzó a ser constante, lo que sugiere una disminución en la biodegradación de materia orgánica.

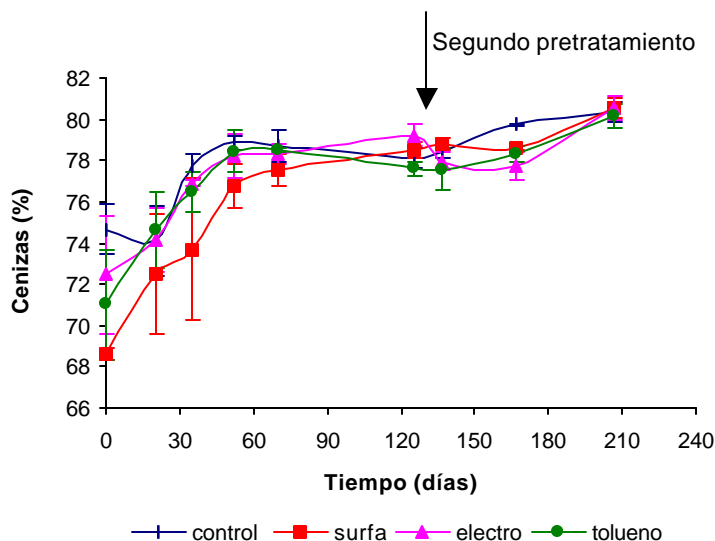


Figura 9. Contenido de sales en las unidades experimentales durante 210 días

7.6. Respirometría

Se estima que para oxidar un gramo de petróleo, se requieren 0.333 gramos de O_2 (Iturbe, *et al.*, 2001). En las Figuras 10 y 11, se muestra el consumo y velocidad de consumo de O_2 en las biopilas durante los primeros 100 días de tratamiento.

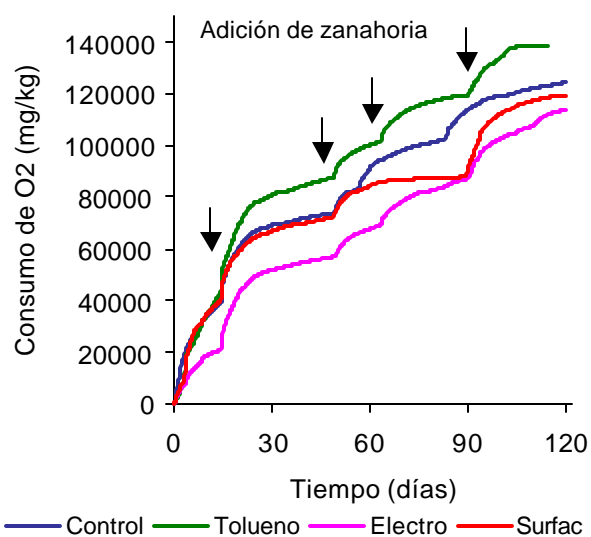


Figura 10. Cinéticas de consumo de oxígeno de las biopilas durante 100 días de tratamiento.

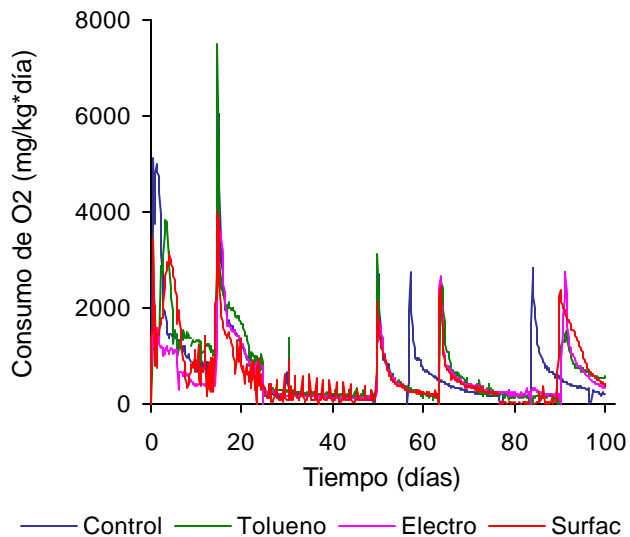


Figura 11. Velocidades de consumo de oxígeno durante 100 días de tratamiento biológico.

La adición de bagazo de zanahoria a las biopilas se realizó en cada toma de muestra, a partir de los 52 días de tratamiento (1.5 kg de zanahoria base húmeda), se realizó con fin de mantener activa la microflora presentes en las biopilas. En la Figura 10 se muestra como el consumo de oxígeno aumenta en cada una de las adiciones de bagazo de zanahoria, lo que nos indica que la adición de la zanahoria estimula la actividad de los microorganismos, favoreciéndose un incremento en la población microbiana y de manera indirecta, la biodegradación de los HTP presentes en las biopilas.

Aunque los resultados muestran que la biopila pretratada con tolueno es la que tuvo el mayor consumo de oxígeno, seguida por el control, surfactante y finalmente la biopila con tratamiento electroquímico, hay que destacar que estos resultados no corresponden al orden de biodegradación obtenida para las biopilas, ya que la biopila que mayor biodegradación presentó fue la tratada electroquímicamente, siendo la de menor degradación la biopila control.

Las velocidades iniciales de consumo de oxígeno (Tabla 7) que se observaron durante los 10 primeros días del tratamiento biológico, fueron menores para las biopilas pretratadas (~ 3 ordenes de magnitud) respecto al control, esto quizá se debió a la desorción de los hidrocarburos del suelo por efecto de los pretratamientos, produciendo un retraso en el arranque de la biodegradación por efecto de la mayor concentración inicial de HTP (Chino, *et al.*, 1999)

En la Tabla 7 se muestra el consumo de oxígeno total después de 100 días de tratamiento, donde se observa que la biopila tratada con tolueno fue la que presentó el mayor consumo de oxígeno. Sin embargo, las diferencias entre las tres biopilas restantes no es significativa.

Como se mencionó anteriormente, el consumo de oxígeno se determinó con el fin de evaluar, diferencias en la actividad respiratoria de las poblaciones microbianas presentes, en función de los diferentes pretratamientos del suelo y de la adición periódica de bagazo de zanahoria.

Tabla 7. Consumo total de oxígeno después de 100 días de tratamiento y velocidades iniciales de consumo de oxígeno con los diferentes pretratamientos.

Muestra	Consumo total de O ₂ (mg/kg)	Vel. inicial de consumo de O ₂ (mg/kg·día)	R ²
Control	119034	7850	0.999
Surfactante	112216	3197	0.991
Electroquímico	102382	2775	0.993
Tolueno	134057	2619	0.986

7.7. Cuenta microbiana

La biodegradación de los HTP se lleva a cabo principalmente por dos grupos de microorganismos: bacterias y hongos. Las bacterias tienen un crecimiento muy rápido y una mayor capacidad de adaptación a los medios contaminado (Iturbe, *et al.*, 2001). Sin embargo, la presencia de hongos nativos en el suelo contaminado incrementa la probabilidad de éxito en la biodegradación de contaminantes (Seprum, *et al.*, 2000).

En las Figuras 12 y 13 se muestran las cuentas totales de microorganismos (UFC/g), durante el proceso de composteo en las diferentes biopilas.

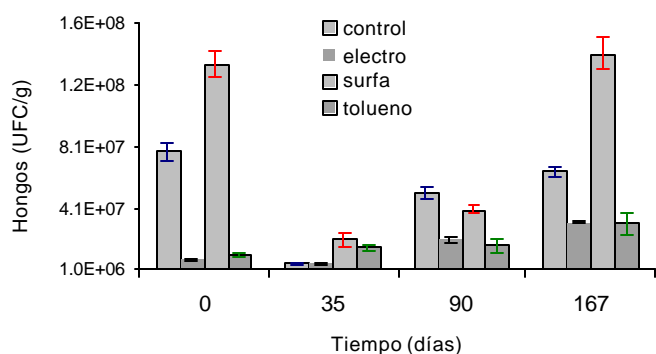


Figura 12. Unidades formadoras de colonias durante el proceso de composteo para hongos (medio PDA)

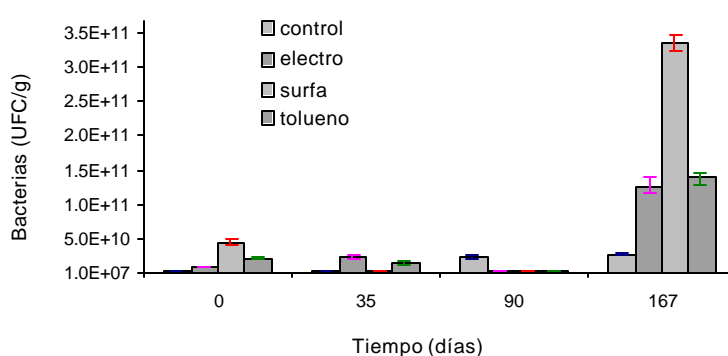


Figura 13. Unidades formadoras de colonias durante el proceso de composteo para bacterias (medio AST)

El número de bacterias (UFC/g) al inicio del proceso de composteo fue menor en la biopila control (aproximadamente 1 orden de magnitud) respecto a las demás (Figura 13). Sin embargo, se puede observar que entre los 35 y los 90 días, hubo una disminución en el crecimiento tanto de bacterias como de hongos en todas las biopilas.

Estas disminuciones en el número de colonias puede deberse a que el pH tuvo un incremento entre 8.9 y 9.2 (sección 7.3), debido probablemente a una inadecuada aireación de las biopilas, provocando una disminución en el número de colonias para bacterias y hongos. A partir de los 90 días, se observó un incremento en el número de microorganismos así como una disminución en el pH.

Es importante controlar los rangos de pH entre 6 y 8 (microorganismos neutrófilos), para evitar una disminución en el crecimiento microbiano o que el medio sea selectivo a ciertos microorganismo, ya que de esta manera se puede tener una disminución en la biodegradación de los contaminantes presentes en el suelo.

En la Tabla 9 se muestran algunos valores del número de microorganismos, normalmente presentes en suelos contaminados y no contaminados.

Tabla 9. Cuentas microbianas típicas reportadas en dos suelos diferentes.

Tipo de suelo	UFC/g suelo
Libre de contaminación	$10^8 - 10^{12}$
Contaminado con hidrocarburos	$2 \times 10^6 - 4 \times 10^7$ (AST)
	$2 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ (PDA)

Seprun, *et al.*, 2000; Alef, *et al.*, 1995

De acuerdo a la Tabla 9 se pueden distinguir al menos tres niveles:

1. Si UFC/g suelo $< 10^6$, el suelo es pobre en microorganismos.
2. Si UFC/g suelo $10^6 - 10^7$ el suelo tiene una población microbiana típica
3. Si UFC/g suelo $> 10^7$, el suelo es rico en microorganismos.

De acuerdo al conteo de microorganismos realizado en las biopilas (Figuras 12 y 13), se puede considerar que éstas tienen una población típica de microorganismos para un suelo contaminado con hidrocarburos con respecto a los hongos, sin embargo es un suelo rico en cuanto al contenido de bacterias (Atlas, *et al.*, 1991; Alef, *et al.*, 1995).

7.8. Degradación de hidrocarburos

De acuerdo a los resultados obtenidos después de 207 días de composteo, se observaron diferencias significativas en la biodegradación de hidrocarburos por efecto de los pretratamientos en todas las biopilas. En la Figura 14 se muestran las cinéticas de biodegradación de HTP en función de los pretratamientos.

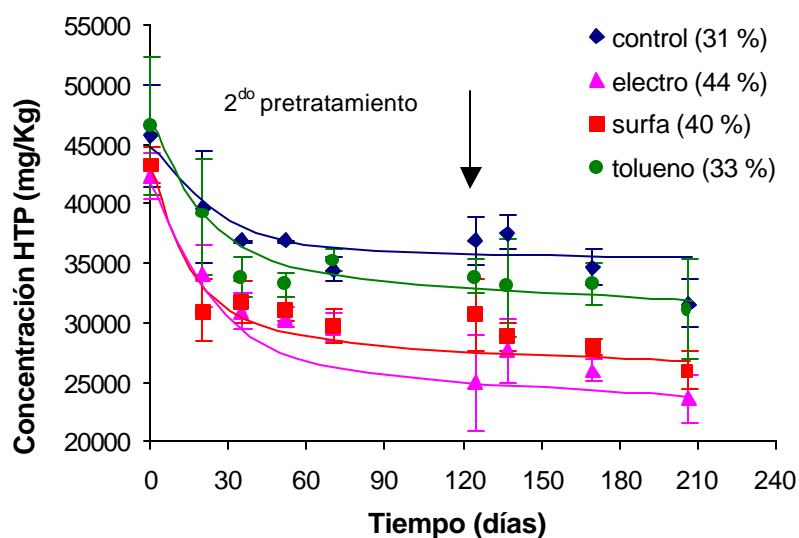


Figura 14. Biodegradación de HTP después de 207 días de composteo (tratamiento biológico) en función de los diferentes pretratamientos del suelo.

Como puede observarse (Figura 14) las biopilas pretratadas con surfactante y electroquímicamente, registraron niveles de biodegradación significativamente mayores (40 y 44%, respectivamente) a los observados para la biopila con tolueno y control (33 y 31% respectivamente) después de 207 días de composteo.

Sin embargo es importante mencionar que la mayor biodegradación en las biopilas se llevó a cabo durante los 52 primeros días del proceso de composteo, siendo las de mayor biodegradación la biopila pretratada con tolueno, seguida por las biopilas pretratadas electroquímicamente, con surfactante y finalmente la biopila control (29, 28, 28 y 19 %, respectivamente).

Entre los días 52 y 120 días del proceso se observó, en base a los resultados de cenizas (sección 7.5) y la biodegradación de los hidrocarburos (sección 7.8), que aparentemente ya no se estaba llevando a cabo la asimilación de los hidrocarburos presentes en el suelo, ya que los resultados se mostraban constantes (Figura 9 y 14), a partir de estos resultados surgieron las siguientes preguntas:

¿No hay HTP biodisponibles?

¿No hay microorganismos degradadores de HTP?

Para resolver estas dudas se decidió llevar a cabo nuevamente los pretratamientos: electroquímico, surfactante y con tolueno, así como la inoculación de las cuatro biopilas con microorganismos degradadores de petróleo. Los pretratamientos se realizaron después de los 120 días de experimentación.

A continuación se discuten los resultados observados después del segundo pretratamiento fueron los siguientes:

El pH no tuvo un aumento significativo, éste se mantuvo en un rango de 6.5 a 7.3, por lo contrario a la CE, en donde se observó una disminución de aproximadamente 0.5 veces ordenes de magnitud.

En el contenido de cenizas se observó un incremento, lo que indica que hubo biodegradación de la materia orgánica presente (HTP). Respecto al contenido de los hidrocarburos se puede apreciar (Figura 12), que hubo una nueva disminución en su concentración. Los cambios observados en todos estos parámetros indican que el segundo pretratamiento realizado, así como la inoculación a las biopilas favoreció el proceso. Aunque no se observó una degradación tan alta como al inicio del proceso de composteo, esto puede deberse al tipo de hidrocarburos presentes en las biopilas después de 52 días de biodegradación, ya que los microorganismos degradan primero los compuestos alifáticos que son compuestos de fácil asimilación, en comparación con los compuestos poliaromáticos y asfaltenos, ya que entre mas larga la cadena y mayor numero de anillos, más largo es el tiempo de degradación (Atlas, 1984). Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son metabolizados de diferentes maneras. A medida que aumenta el número de anillos, la degradación se

hace más difícil, por lo tanto la degradación depende del grupo funcional del compuesto y del aceptor de electrones que éste presente (Raymond, 1993).

Teniendo en cuenta lo anterior puede suponerse que los compuestos presentes en las biopilas después de 52 días de biodegradación son compuestos de difícil asimilación, es por ello que la biodegradación en el segundo pretratamiento se observa mas lenta en comparación con el primero.

Sin embargo, aunque la información sobre la biorremediación de suelos intemperizados es escasa, existen algunos estudios (UAM, 2001) que reportan valores de degradación de HTP (80,000 ppm) entre 16 y 20% en 60 días en un suelo intemperizado sin pretratar.

García, *et al.* (2002), demostraron que la adición de tolueno en suelos intemperizados, tiene un efecto positivo en la desorción de HTP y en la biodegradación de estos compuestos, obteniendo una degradación del 45% en 30 días en el suelo tratado con tolueno. Por otra parte, Hyo-Sang y Lee (2001), realizaron un estudio aplicando una corriente de 1.8 $\mu\text{S}/\text{cm}$ durante ocho días, en un suelo (no intemperizado) contaminado con diesel (4,000 ppm), donde observaron una biodegradación del 60 %, utilizando *Pseudomonas*.

Esto resultados demuestran que la utilización de pretratamientos fisicoquímicos ha sido favorable para la desorción de los hidrocarburos, incrementando significativamente la biodegradación. Hay que destacar que el suelo que se utilizó para este estudio también se trataba de un suelo intemperizado.

7.9. Ecotoxicidad

Para esta prueba se utilizó *Eisenia foetida* L., ya que varios estudios recomiendan su uso para este tipo de bioensayos (Potter, *et al.*, 1999; Salanitro, *et al.*, 1997). El parámetro toxicológico relevante de la prueba es la LC_{50} o concentración letal media, que se define como la concentración a la cual muere el 50% de la población. La determinación de un valor de toxicidad de corto tiempo, como LC_{50} , de una sustancia química es un indicador útil del efecto biológico potencial de éste si se libera al ambiente (Escalante, 2001).

En la Tabla 10 se presentan los resultados del porcentaje de mortalidad de las lombrices a los 14 días de exposición con el suelo de las biopilas.

Tabla 10. Mortalidad de *Eisenia foetida* L. A los 14 días de exposición a diferentes concentraciones de HTP al final del proceso de composteo (207 días), en función de los pretratamientos fisicoquímicos.

Tratamiento	HTP inicial (ppm)	Toxicidad HTP (ppm)	LC ₅₀ (% suelo composteado)
Control	31598 ± 2001	28438	91
Surfactante	23637 ± 1691	21338	82
Electroquímico	26021 ± 2026	14891	63
Tolueno	31223 ± 4208	26539	85

El las concentraciones mas bajas (10, 25 y 50 %) se observó muerte de las lombrices. Sin embargo, a partir de la concentración 75% hubo mortalidad de lombrices en todas las biopilas pretratadas. La biopila pretratada electroquímicamente fue la que presentó el mayor porcentaje de muerte en lombrices, calculándose una LC₅₀ de 63% (suelo electrotratado:suelo artificial), esta dilución corresponde a una concentración de ~ 15,000 ppm de HTP. La biopila con surfactante presentó una LC₅₀ del 82% que corresponde a una concentración de HTP 21,000 ppm, la biopila con tolueno una LC₅₀ del 85% correspondiente a una concentración de HTP de 26,500 ppm y finalmente la biopila control que fue la de menor grado de toxicidad con una LC₅₀ de 88% correspondiente a una concentración de HTP de 27,800 ppm.

Como puede observarse los resultados de toxicidad son mas altos en las biopilas que fueron tratadas con respecto al control, esto quizá se debió a diferentes factores como: la desorción de los hidrocarburos presentes en el suelo después de los pretratamientos, la inmadures de la composta a este respecto, Lau, (2000) realizó un estudio acerca de la toxicidad del estiércol



Figura 13. *Eisenia foetida* L. A los 14 días de exposición a diferentes concentraciones de HTP al final del proceso de composteo (207 días), en el suelo control



Figura 14. *Eisenia foetida* L. A los 14 días de exposición a diferentes concentraciones de HTP al final del proceso de composteo (207 días), en los suelo pretratados

como material de composteo, con semillas de lechuga, encontrando que el estiércol fresco inhibía el crecimiento de las semillas de lechuga con respecto al estiércol seco. Ellos asumen esto a que los compuestos que contiene el estiércol fresco se encuentran inestables por lo que causa algún efecto de toxicidad en el crecimiento de semillas.

8. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este experimento se puede concluir lo siguiente:

- Se demostró que el uso de pretratamientos fisicoquímicos para la desorción de HTP en un suelo intemperizado, favorece significativamente su biodegradación por un proceso de composteo.
- Con base en la biodegradación de los HTP, el pretratamiento más eficiente después de 7 meses de composteo fue el electroquímico obteniéndose una degradación de 44%.
- Todas las biopilas excepto la de tratamiento electroquímico, (este tratamiento fue tóxico desde el inicio) fueron tóxicas después del proceso de composteo.
- El empleo de desechos orgánicos de fácil biodegradación como agentes de volumen son muy útiles y económicos en el proceso de composteo, mejorando la estructura de la biopila, incrementando la porosidad, permitiendo una mejor biodisponibilidad de oxígeno y un contenido de humedad adecuado, manteniendo activa las poblaciones microbianas.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abiola A. y Olenyk, M. 1997. Effects of amendment surfactants on bioremediation of hydrocarbon contaminated soil by composting. 34th. Annual Soil Science Workshop.
2. Alef, K. y Nannipieri, P. 1995. Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry, Academic Press, U.S.A.
3. Atlas, R. M., 1984. Petroleum Microbiology, Edit. Macmillan Publishing Co., New York, pp. 5-26.
4. Atlas, R. 1991. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 52: 149-156
5. Beaudin, R., Caron, R. F., Legros, R., Ramsay, J., Lawlor, L., Ramsay, B. 1996. Cocomposting of weathered hydrocarbon-contaminated soil, Compost Science & Utilization Vol. 4, No. 2, pp. 37-45
6. Bosma, T.; Middeldorp, P.; Schraa, G. y Zehnder, A. 1997. Mass transfers limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. Environ. Sci. Technol. 31: 248-252.
7. Catherine, A. P. y Luthy, R. 1993. Coal tars dissolution in water-miscible solvents: experiment evaluation. Environ. Sci. Technol. 27(13): 2831-2843.
8. Chino, H. Tsuji, H. Ishikawa, Y. Matsubara, T. Al-awadhi, M. Talaat Balba, R. y Aldaher, R. 1999. Bioremediation of oil-contaminated soil in Kuwait (Part 1): ex situ biological treatment technologies. The Fifth International *in situ* and on site Bioremediation Symposium.
9. Chino, H. Tsuji, H. Ishikawa, Y. Matsubara, T. Al-awadhi, M. Talaat Balba, R. y Aldaher, R. 1999. Bioremediation of oil-contaminated soil in Kuwait (Part 2): ex situ biological treatment technologies. The Fifth International *in situ* and on site Bioremediation Symposium. pp 249-256
10. Connell, D., Lam P., Richardson B. y Wu R. 1999 Introduction to Ecotoxicology. Blackwell Science Ltd. Great Britain. 170pp
11. Cunningham, C. y Philip, J. 2000. Comparison of bioaugmentation and biostimulation in ex situ treatment of diesel contaminated soil. Land Contamination and Reclamation, 8(4). 261-269 pp.
12. DeFlaun F. M., Steffan, J. R., 2003., Encyclopedia of Environmental Microbiology. Envirogen, Inc., Lawrenceville, New Jersey
<http://www.mrw.interscience.wiley.com/eem/articles/env131/sect7.htm1>
13. Dosoretz G. C., Mandelbaum R. y Hadar Y., 2003, Compost: Biodegradation of toxic organic compounds., Encyclopedia of Environmental Microbiology.
14. Escalante E. E., 2000., Estudio de ecotoxicidad de un suelo contaminado con hidrocarburos., Tesis, Maestría en Biotecnología.
15. EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
16. Eweis, J.B.; Ergas, S.J.; Chang, D.P y Schroeder, E.D. 1998. Bioremediation Principles. McGraw-Hill International Editions. 296 pp.
17. Fenistein, D.; Barré, L.; Broseta, D.; Espinat, D.; Livet, A.; Roux, J. y Scarsella, M. 1998. Viscosimetric and neutron scattering study of asphaltene aggregates in mixed toluene/heptane solvent. Langmuir. 14: 1013-1020.

18. García, R. M.; Saucedo, C.G.; Flores, H. S. y Gutiérrez, R. M. 2002. Mass transfer and hydrocarbon biodegradation of aged soil in slurry phase. *Biotechnol. Prog.* 18: 728-733.
19. Gestel, Van C.A.M., y Wei-chun, Ma., 1990., An approach to quantitative structure – activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies., *Chemosphere*. Vol. 21. No. 8, pp. 1023-1033.
20. Guha, S. y Jaffé, P. R. 1996. Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. 30: 1382-1391.
21. Guerin, W. F y Boyd, S. A. 1992. Differential bioavailability of soil sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1142-1152.
22. Ghosh, M. M. 1997. Kinetic considerations in surfactant-enhanced bioavailability of soil-bound PAH. 1997. *In Situ and On Site Bioremediation*. 2: 575-580.
23. Hyo-Sang L. y Lee K., 2001., Bioremediation of Diesel-Contaminated soil by bacterial Cells transported by electrokinetics., *Journal Microbiology and Biotechnology.*, 1038 – 1045.
24. Iturbe Argüelles R., Flores Torres C., Chávez López C., Roldán Martín A. 2002. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería Investigación y Tecnología III*. 1, 25-35. Instituto de Ingeniería, UNAM.
25. Jackman, A. S., Maini, G., Sharman, K. A., Sunderland, G., y Knowles J. C., 2001. Electrokinetic movement and biodegradation of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in silt soil., *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 74 No. 1 pp.40-48
26. Ko, S.-O.; Schlautman, M. A y Carraway, E. R. 2000., Cyclodextrin-enhanced electrokinetic removal of phenanthrene from a model clay soil.. *Environ. Sci. Technol.* 34: 1535-1541.
27. Kotterman, M. J. J.; Rietberg, H.-J.; Hage, A. y field J. A. 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55 in the presence of nonionic surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*. 57(2); 220-227.
28. Laha, S. y Luthy, R. G. 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-Water systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 40: 1367-1380
29. Lau S.S.S., y Wong C.W.J., 2001., Toxicity evaluation of weathered coal fly ash-amended manure compost., *Water, Air, and Soil Pollution* 128: pp 243-254.
30. Loo, W.W. 1994. Electrokinetic enhanced passive in-situ bioremediation of soil and groundwater containing gasoline, diesel and kerosene. *Proc. 11th HAZMACON 94, Haz. Mater. Mgmt. Conf. Exhib.* pp: 254-264.
31. Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. 1998. *Brock: Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall. Octava Edición. pp 1064.
32. Neuberger Cywiak L. 2002. La ecotoxicología como herramienta en las evaluaciones de riesgo ecológico. Universidad Nacional Experimental Marítima del Caribe
33. Ortiz, I.; Auria, R.; Sigoillot J-C., Revah, S. 2003a. Enhancing phenanthrene biomineralization in a polluted soil using gaseous toluene as a cosubstrate. *Enviro. Sci. Technol.* ASAP Article 10.1021/es0260061 S0013-936X(02)06006-6 Web Release Date: January 15, 2003.

34. Pollard, S. J. T.; Hrudey, S. E y Fedorak, P. M. 1994. Bioremediation of petroleum and creosote contaminated soils: A review of constraints. *Waste Management & Research*. 12: 173-194
35. Potter Carl L., Glaser John A., Chang Lina W., Meier John R., Dosani Majid A., Herrmann Ronald F., 1999. Degradation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons under Bench-Scale Compost Conditions. *Environ. Sci. Technol* 33 pp 1717-1725
36. Raymond C. L. Geotechnical practice for waste disposal en "Biorremediación de suelos". Capítulo 22. 1993
37. Registro de empresas autorizadas para la remediación de suelos contaminados. 2003 SEMARNAT.
38. Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soils. Lewis Publishers. USA.
39. Saval, S. 1998. Biorremediación de suelos y acuíferos. Situación actual y perspectivas en México. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Vol.3, pp. 71-76.
40. Santamaría Romero S., Ferrera Cerrato R., Almaraz Suárez J. J., Galvis Spinola A., Boullard Barois I., 2001., Dynamics and relationships among microorganisms, C-Organic and N-Total during Composting and Vermicomposting., *Agrociencia* Vol 35 pp. 377-384.
41. Shapiro P. Andrew., y Probststein F. Ronald., 1993., Removal of contaminants from saturates clay by electroósmosis, *Environ. Sci. Techno.*, pp. 283-291
42. Semple, K.T.; Reid, B.J. y Fermor, T.R. 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. *Environ. Pollution*, 112: 269 - 283.
43. Stelmack L. P., Gray R. M., y Pickard A. M., 1999., Bacterial Adhesion to Soil contaminantes in the presence of surfactants. *Applies and Environmental Microbiology.*, pp163-168.
44. Seprun, S. M., Kharkevich, E. S., Nogina, T. M., Parhkomenko, Yu. M., Zhdanova, N. N. And Donchenco, G. V. 2000. Perspectives on the use of hydrocarbon-oxidizing *Micromycetes and Rhodococci* for purification of oil-polluted soils. En *Bioremediation of Contaminated Soils*. Capítulo 28. Marcel Dekker, Inc. New York.
45. Sztern D., Pravia A. M., 1999., Manual para la elaboración de compost bases conceptuales y procedimientos.
46. Sverdrup, E. L., Nielsen, T., y Krogh, H. P., 2002., Soil Ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility., *Environmental Science & Technology*. Vol 36. no. 11 pp. 2429-2435.
47. UAM. 2001. Programa de investigación multidisciplinario: Estudios de tratabilidad para la remediación de suelos intemperizados contaminados con hidrocarburos.
48. Van Deuren, J.; Wang, Z. y Ledbetter, J. 1997. Remediation technologies screening matrix and reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office
49. Velasco, T. J. y Volke S. T., 2003., Composteo y biorremediación de suelos., *Gaceta ecológica*, INE-SEMARNAT No. 66
50. Volke S. T. y Velasco T. J. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados., Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT).