



CENICA
Centro Nacional de Investigación
y Capacitación Ambiental

**Dirección de Investigación en Residuos
y Proyectos Regionales**

**“BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL
PETRÓLEO EN SUELOS INTEMPERIZADOS MEDIANTE
COMPOSTEO”**

*Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda
M en C. Juan Antonio Velasco Trejo*

Noviembre 2003

INDICE

1.	RESUMEN EJECUTIVO	2
2.	INTRODUCCIÓN	3
3.	MARCO TEÓRICO	4
3.1.	<i>Biorremediación</i>	4
3.2.	<i>Electrorremediación.....</i>	7
3.3.	<i>Biorremediación mejorada con el uso de surfactantes y solventes</i>	8
4.	ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION.....	10
4.1.	<i>El composteo como una alternativa para la biorremediación de suelos.....</i>	10
4.2.	<i>Estudios con suelos intemperizados</i>	11
5.	OBJETIVOS.....	14
5.1.	<i>Objetivo general</i>	14
5.2.	<i>Objetivos específicos</i>	14
6.	MÉTODOS Y MATERIALES.....	14
6.1.	<i>Obtención de suelo contaminado con hidrocarburos.....</i>	14
6.2.	<i>Pretratamientos fisicoquímicos.....</i>	14
6.3.	<i>Caracterización y preparación del suelo</i>	15
6.4.	<i>Condiciones de cultivo a nivel semi-piloto (biopilas).....</i>	17
6.5.	<i>Métodos analíticos.....</i>	17
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
7.1.	<i>Caracterización de la muestra original y después de los pretratamientos</i>	19
7.2.	<i>Pruebas de biorremediación.....</i>	20
7.3.	<i>Biodegradación de hidrocarburos.....</i>	25
8.	CONCLUSIONES.....	29
9.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	30

1. RESUMEN EJECUTIVO

En el presente documento se describen los resultados obtenidos durante un año de investigación acerca de la biorremediación por composteo de un suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos del petróleo (45,000 mg/kg). Con el objeto de incrementar la biodisponibilidad de los contaminantes para los microorganismos degradadores, y antes de comenzar el proceso de biorremediación por composteo, el suelo intemperizado fue sometido a tres tratamientos fisicoquímicos: (i) electroquímico (EQ), (ii) adición de surfactantes (S) y, (iii) adición de solventes (tolueno). El primero, se realizó con una humedad de 30% durante 6 horas a una densidad de corriente de 1.25 mA/cm² (consumo de energía de 0.5 W/h·kg). Para el tratamiento con surfactantes, el suelo se mezcló con una solución de Tween 80 (2.5 g/L) hasta una humedad de 30% y se mantuvo en esas condiciones durante 24 h. Para el tratamiento con tolueno (T), 24 horas antes del arranque del sistema de composteo se adicionó el solvente a una concentración de 0.5 % (v/p).

Cada porción de suelo tratado se mezcló con cuatro aditivos (bagazo de caña, de zanahoria, estiércol de caballo y composta) con el objeto de incrementar el contenido de nutrientes y de microorganismos en los sistemas de composteo utilizados (biopilas alargadas). Las tres biopilas con suelo tratado, más una biopila control con suelo sin tratar (30 kg/biopila), se mantuvieron protegidas de la intemperie durante 206 días y se realizaron muestreos periódicos para determinar la eficiencia de cada tratamiento en la biodegradación de los hidrocarburos (HTP) presentes en el suelo.

A partir del primer muestreo, a los 20 días, se observó una biodegradación significativa de HTP en las biopilas tratadas (S: 27%; EQ: 22%; T: 12%), en comparación con el control (10%). Después de 206 días, los valores de biodegradación fueron: 48% (± 1) para EQ, 46% (± 4) para S, 39% (± 1) para T y 36% (± 3) para el control, equivalente a una disminución en el contenido de HTP de 20304, 19892, 16712 y 14852 mg/kg, respectivamente. Los valores de degradación obtenidos en los sistemas de biopilas fueron muy satisfactorios, considerando que el tiempo del tratamiento fue de 7 meses y que se utilizó un suelo intemperizado, en el cual los contaminantes se encuentran sorbidos, limitando su biodisponibilidad y con ello su biodegradación. El incremento en la biodegradación en las biopilas tratadas en comparación con un control, indican que los pretratamientos aumentaron la biodisponibilidad de los contaminantes inicialmente sorbidos.

Por los resultados derivados del presente estudio, puede sugerirse el uso del composteo como un método eficiente para la biodegradación de HTP en suelos contaminados, además de la posibilidad del empleo de desechos domésticos, alimenticios, agrícolas (estiércoles) y lignocelulósicos, lo cual implica una opción económica y factible para las condiciones del país. Asimismo, para el caso de suelos intemperizados, puede recomendarse la aplicación de un surfactante o de un tratamiento electroquímico para mejorar la biodegradación de contaminantes orgánicos como son los hidrocarburos del petróleo.

Este estudio se realizó en colaboración con la Universidad Autónoma Metropolitana, con su ejecución, una estudiante del Posgrado en Biotecnología de dicha Universidad obtuvo el grado de "Especialidad en Biotecnología", además, se participó con un trabajo en el "X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería".

2. INTRODUCCIÓN

En México existen extensas áreas contaminadas con hidrocarburos del petróleo debido principalmente a derrames, así como a las actividades propias de la industria petrolera. Este tipo de compuestos, se acumulan en ecosistemas marinos y en suelos, siendo responsables de su deterioro. Algunos suelos contaminados, principalmente en el sureste de México, contienen concentraciones de hidrocarburos hasta de 450,000 mg/kg (Gallegos-Martínez y col., 2000). Por dichas razones, hoy en día una de las preocupaciones de las autoridades ambientales es el desarrollo de tecnologías eficientes y económicamente factibles que permitan la eliminación de este tipo de contaminantes.

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados es una opción que presenta ventajas con respecto a métodos físicos y químicos: (i) son sencillas de implementar; (ii) efectivas y ambientalmente seguras; (iii) los contaminantes se destruyen o transforman; (iv) generalmente no se requieren tratamientos adicionales; (v) económicas (80 - 150 USD/m³). Una de las técnicas desarrolladas con el objeto de biorremediar suelos contaminados con petróleo, es el composteo del suelo con materiales orgánicos de fácil degradación, generalmente conocido como co-composteo. Los microorganismos que normalmente participan en este tipo de proceso, son parte de la flora natural de los sustratos orgánicos, así como de los microorganismos nativos del suelo. Una gran ventaja de estos sistemas, es el empleo de agentes de volumen como desechos domésticos, agrícolas, alimenticios, lodos industriales, estiércol, etc. De esta manera, además de la posibilidad de descontaminar suelos contaminados con hidrocarburos, el co-composteo representa una alternativa para la degradación de una gran variedad de desechos sólidos.

Por otra parte, en suelos contaminados por largos períodos, conocidos como suelos intemperizados, los compuestos contaminantes llegan a ser inaccesibles (no biodisponibles) para los microorganismos nativos debido a las fuertes interacciones que se producen entre dichos compuestos y la materia orgánica del suelo (De Jonge y col., 1997). La restauración de un suelo contaminado, se inicia con la desorción del contaminante de la fase sólida en la que se encuentra alojado, dicha desorción de contaminantes, en suelos intemperizados, se ha resuelto mediante la incorporación de surfactantes sintéticos y biológicos (Volkering y col., 1995; Harms y Zehnder, 1995). Otra alternativa ha sido el uso de disolventes no polares que incrementan la solubilidad de los contaminantes y aparentemente, su biodisponibilidad (Jiménez y Bartha, 1996; Chen y Taylor, 1995).

Con base en lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de diferentes pretratamientos fisicoquímicos sobre la biodegradación por composteo de hidrocarburos del petróleo presentes en un suelo intemperizado. El presente documento plantea las bases teóricas de los tratamientos, tecnologías y estrategias utilizadas para la biorremediación (Capítulo 3); posteriormente se introduce al trabajo de investigación, con base en estudios previos relacionados (Capítulo 4). En el Capítulo 6 se describen los métodos utilizados para el análisis de las diferentes variables durante el desarrollo experimental del proyecto. Finalmente, se detallan y discuten los resultados obtenidos durante siete meses del tratamiento de composteo y se plantean algunas conclusiones, así como recomendaciones basadas en dichos resultados.

3. MARCO TEÓRICO

El acelerado incremento en la población mundial, ha dado como resultado la demanda de mayores cantidades de combustibles fósiles (hidrocarburos). Aunque muchos de estos compuestos se utilizan para generar energía, un alto porcentaje se libera al ambiente, por cuestiones de extracción, refinado, transporte y almacenamiento, lo cual representa un riesgo potencial para los ecosistemas (Semple y col., 2001). Aunado a lo anterior, durante los años 50s y 60s, se instalaron a nivel mundial cientos de miles de tanques para el almacenamiento de productos del petróleo y químicos peligrosos. Muchos de ellos, se abandonaron o excedieron su vida útil, por lo que hoy en día representan una fuente de contaminación de suelos, acuíferos, ríos, lagos y mares (Fan y Krishnamurthy, 1995). En México existen extensas áreas contaminadas con hidrocarburos del petróleo (HTPs), por lo cual hoy en día una de las mayores preocupaciones de las autoridades ambientales es encontrar y/o desarrollar tecnologías que permitan la eliminación de este tipo de contaminantes.

En diferentes países del mundo, la contaminación de suelos generalmente se ha tratado de solucionar con el uso de procesos fisicoquímicos, que son altamente eficientes para eliminar altas concentraciones de contaminantes. Sin embargo, cuando se tratan bajas concentraciones de contaminantes, estos procesos son poco factibles debido a sus costos de operación (Riser-Roberts, 1998).

El uso de métodos biológicos (biorremediación) para el tratamiento de sitios contaminados, es una tecnología que representa varias ventajas con respecto a los métodos físicos y químicos tradicionales. De acuerdo con estudios realizados en los EE.UU. y Reino Unido, el mercado de la biorremediación de suelos se ha incrementado debido a que los costos pueden reducirse entre 65 y 80%, con respecto a los métodos fisicoquímicos (Zechendorf, 1999)

3.1. Biorremediación

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, etc.) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos. Esta estrategia biológica depende de las actividades catabólicas de los organismos, y por consiguiente de la utilización de los contaminantes como fuente de alimento y energía. Para que esto ocurra, es necesario favorecer las condiciones para el crecimiento y la biodegradación (Van Deuren y col., 1997).

La meta final de la biorremediación, es la mineralización del contaminante. Es decir, la completa degradación de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos (CO₂, agua y formas inorgánicas de N, P y S) y componentes celulares (Alexander, 1994; Eweis y col., 1998). Su aceptación como una estrategia de limpieza viable, en muchos casos, depende de sus costos. Sin embargo, muchas de las estrategias de biorremediación son competitivas en términos de costos y del impacto sobre la matriz contaminada (Semple y col., 2001).

Entre las ventajas que las tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados presentan sobre los métodos fisicoquímicos tradicionales, se encuentran: (i) disminución en costos de operación; (ii) los contaminantes son destruidos o transformados; y (iii) normalmente no se requiere o se necesita un mínimo de tratamientos adicionales.

Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biorremediación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados con HTPs, solventes, explosivos, clorofenoles, pesticidas, conservadores de madera e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) (Van Deuren y col., 1997; Semple y col., 2001).

3.1.1. Tecnologías de biorremediación de suelos

La biorremediación de suelos puede llevarse a cabo *in situ*, o bien, el material puede ser excavado y tratado *ex situ*. La principal ventaja de los tratamientos *in situ* es que permiten tratar el suelo sin necesidad de excavar ni transportar, dando como resultado una disminución en costos. Sin embargo, este tipo de tratamientos generalmente requiere de periodos de tratamiento largos y es menos seguro en cuanto a la uniformidad del tratamiento debido a la heterogeneidad propia del suelo. Las tecnologías de biorremediación *in situ*, incluyen el bioventeo, la bioaumentación, la bioestimulación, la biolabranza, la atenuación natural y la fitorremediación (Van Deuren y col., 1997).

La principal ventaja de las tecnologías *ex situ*, es que generalmente requieren de periodos más cortos que los anteriores, son más seguros en cuanto a la uniformidad del tratamiento, ya que el sistema puede homogeneizarse y mezclarse continuamente. Otra ventaja, es que los productos permanecen dentro de la unidad de tratamiento hasta la obtención de productos no peligrosos. Sin embargo, los tratamientos *ex situ* requieren de la excavación del suelo. Las tecnologías de biorremediación *ex situ*, incluyen procesos de composteo (biopilas) y el uso de biorreactores (de lodos y en fase sólida) (Van Deuren y col., 1997).

3.1.2. Composteo

El composteo es un proceso biológico controlado, por el cual los contaminantes orgánicos pueden convertirse en subproductos inocuos estables. El material contaminado se mezcla en pilas, con sustancias orgánicas sólidas biodegradables, como paja, aserrín, estiércol y desechos agrícolas. Estos materiales son adicionados como agente de volumen, para mejorar el balance de nutrientes (C/N) para la actividad microbiana, y para asegurar la generación del calor necesario para el proceso. Los sistemas de composteo incluyen tambores rotatorios, tanques circulares, recipientes abiertos y biopilas (Alexander, 1994; Eweis y col., 1998; Semple y col., 2001).

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, gasolina, HTPs, HAPs, y se ha demostrado también una

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

En la práctica y en general, una de las tecnologías de composteo más utilizada para el tratamiento de extensas áreas de suelos contaminados, principalmente por HTPs, se lleva a cabo en condiciones aerobias y se conoce como biopilas, bioceldas, pilas de composteo o sistemas de co-composteo (Iturbe-Argüelles y col., 2002). Las biopilas, son una forma de composteo en el cual se forman pilas con el suelo contaminado y agentes de volumen. El sistema, que puede ser abierto o cerrado, se adiciona con nutrientes y agua y se coloca en áreas de tratamiento, que incluyen sistemas para coleccionar lixiviados y alguna forma de aireación (Eweis y col., 1998).

La elección del tipo de sistema de biopilas depende principalmente de las condiciones climáticas y de la composición de compuestos orgánicos volátiles presentes en el suelo contaminado. Generalmente las biopilas se diseñan como sistemas cerrados, ya que éstas permiten mantener la temperatura y evitar la saturación de agua debido a lluvias, además de disminuir la evaporación de agua y de compuestos orgánicos volátiles (Eweis y col., 1998).

Dos de los sistemas de biopilas más empleados para el tratamiento de suelos contaminados, son las biopilas alargadas (Figura 1) y las biopilas estáticas (Figura 2). La diferencia entre ambas tecnologías radica en el método de aireación que se emplea para proveer de oxígeno el proceso de composteo (Eweis y col., 1998). En los sistemas estáticos, el material a compostear se airea por inyección (sopladores) o extracción (bombas de vacío) a través de tuberías perforadas, colocadas debajo de las pilas. En estos sistemas, la aireación implica aireación forzada a través del suelo por inyección o extracción a través de tuberías perforadas. En el caso de las biopilas alargadas, el material es mezclado periódicamente con el uso de un equipo móvil (tractores o máquinas diseñadas especialmente para este fin), este tipo de biopilas se considera actualmente como la alternativa más económica de composteo (Potter, 1997; Van Deuren y col., 1997).

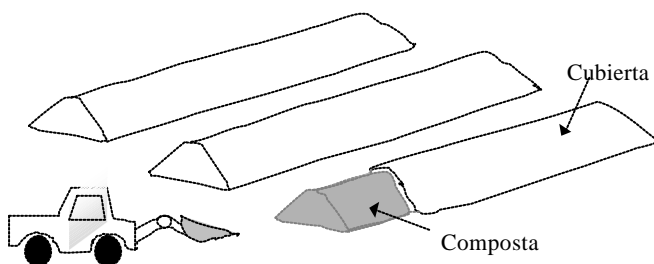


Figura 1. Representación esquemática de un sistema de biopilas alargadas (*windrows*).

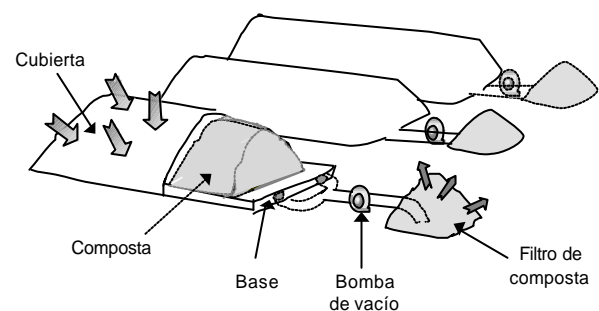


Figura 2. Representación esquemática de un sistema aireado de biopilas estáticas.

3.2. Electrorremediación

El tratamiento electroquímico es una tecnología emergente de biorremediación *in situ*, altamente efectiva en la remoción de metales pesados y compuestos orgánicos altamente solubles en agua (Ko y col., 1992). El tratamiento electroquímico de un suelo contaminado (electro-remediación), involucra la aplicación de una corriente directa de bajo voltaje o de un gradiente de potencial bajo a través de un electrodo positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo) que se insertan en el suelo (Figura 3) (Riser-Roberts, 1998).

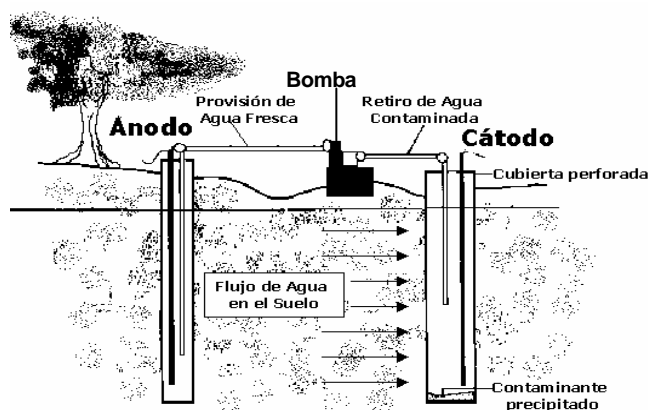


Figura 3. Tratamiento electroquímico aplicado directamente en el subsuelo *

Durante la aplicación de una corriente eléctrica se crea un campo eléctrico entre los dos electrodos, en donde las sustancias altamente solubles se orientan similarmente a las moléculas de agua y tienden a emigrar hacia uno de los dos electrodos de acuerdo a las cargas, polaridad y movilidad de los contaminantes. La migración de estos compuestos depende principalmente del efecto del campo eléctrico para remover especies químicas cargadas, por medio de la electromigración (transporte de iones), electro-ósmosis (transporte del agua de solvatación de iones) y/o electroforesis (arrastre mecánico de coloides y/o microorganismos) (Ko y col., 2000). El proceso dominante durante la electro-remediación es la electro-ósmosis, en la cual, la corriente directa produce el flujo de agua a través del suelo (Van Cauwenberghe, 1997; Paillat y col., 2000).

Dentro de los contaminantes que pueden tratarse por procesos electroquímicos, se encuentran: metales pesados (Pb, Hg, Cd, Ni, Cu, Zn, Cr); especies radioactivas (^{137}Cs , ^{90}Sr , ^{60}Co , Ur); aniones tóxicos (NO_3^- , SO_4^-); mezclas de contaminantes orgánicos/iónicos; hidrocarburos del petróleo (gasolina, diesel y aceites); hidrocarburos halogenados (PCBs); hidrocarburos poliaromáticos (HAPs); benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX); cianuros y explosivos (Van Cauwenberghe, 1997).

* Imagen proporcionada por la Dra. M.T. Oropeza Guzmán del Dpto. de Ingeniería y Procesos Hidráulicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

3.3. Biorremediación mejorada con el uso de surfactantes y solventes

Al hacer referencia a la biorremediación, además de considerar las vías degradativas y la regulación de los microorganismos que llevan a cabo la detoxificación de los contaminantes, también es necesario considerar otros factores que influyen en el rendimiento de la biorremediación. Es decir, no es suficiente adicionar cepas con altas eficiencias degradadoras, si existen factores que limiten su verdadero potencial. Además de la eficiencia de las rutas catabólicas y los procesos microbianos de mineralización, debe tenerse en cuenta que la etapa limitante de la biodegradación o detoxificación de la mayoría de compuestos en el medio ambiente se relacionan con su biodisponibilidad. Si un compuesto no se encuentra disponible para la célula, ésta no lo podrá utilizar como sustrato; esto es lo que sucede con los hidrocarburos que son altamente insolubles en agua o bien, pueden encontrarse unidos hidrofólicamente con otros sustratos. Por las razones anteriores, actualmente en el campo de investigación en biorremediación se han hecho esfuerzos importantes en la búsqueda de nuevas técnicas que permitan aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes. Dos técnicas que pueden emplearse con este fin, es el uso de surfactantes y el de solventes (Majer y col.1999).

3.3.1. Surfactantes

Los detergentes, también conocidos como surfactantes debido a que reducen la tensión superficial del agua, son moléculas “anfipáticas” formadas por grupos polares (cabeza) y largas cadenas carbonadas hidrofóbicas (cola) (Figura 4). Sus grupos polares forman puentes hidrógeno con las moléculas de agua, mientras que las cadenas carbonadas se agregan debido a interacciones hidrofóbicas. En soluciones acuosas, los surfactantes forman estructuras esféricas organizadas llamadas micelas (Figura 4), que por su naturaleza anfipática, tienen la capacidad de solubilizar compuestos hidrofóbicos (Bhairi, 2001).

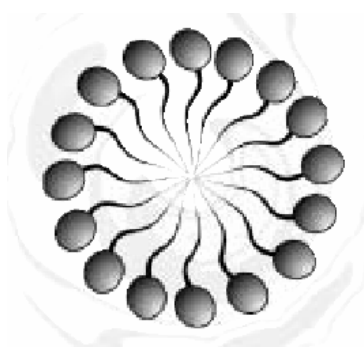


Figura 4. Estructura de una micela de surfactante en agua

El empleo de surfactantes, se ha propuesto como una técnica para incrementar la biodisponibilidad de contaminantes orgánicos hidrofóbicos (HOCs) como HTPs, PCBs, explosivos, clorofenoles, pesticidas, entre otros, y así facilitar su biodegradación (Majer y col.1999). Los surfactantes pueden ser sintetizados químicamente o bien por algunos microorganismos, en este último caso se les conoce como biosurfactantes. Estos compuestos incrementan la solubilidad de los HOCs a través de una fase micelar (hidrofílica/hidrofóbica), la cual propicia la desorción de los contaminantes del suelo hacia la fase líquida, lográndose así un incremento en la biodisponibilidad de los HOCs. La solubilización de los contaminantes se lleva a cabo solamente cuando se forma la fase micelar, la cual se obtiene cuando la concentración del surfactante es superior a la concentración micelar crítica (CMC), es decir, arriba de la concentración máxima a la cual el monómero del surfactante aún se

mantiene en solución (Ko y col., 2000). En la Tabla 1, se presentan algunas propiedades de los surfactantes no iónicos comerciales más comunes.

Los valores de CMC mostrados en la Tabla 1, indican la concentración máxima en la que el monómero del surfactante se mantiene en solución. La CMC es una propiedad muy sensible a la temperatura y polaridad del medio, y generalmente su valor se reporta a temperaturas entre 20 y 25°C. El número de agregados para formar una micela, es el valor promedio del número de monómeros en una micela.

Tabla 1. Propiedades de algunos surfactantes no iónicos comerciales.

Surfactante	P.M. promedio del monomero (U)*	CMC (g/L, 25°C)	Agregados para formar la micela
BRIJ-35	1200	90	40
Genapol X-100	641	150	88
Tergitol NP 10	682	36-55	100
Triton X-100	625	150	140
Tween 20	1228	59	-
Tween 80	1310	12	58

*U: unidades de masa atómica

Fuente: *University of Texas health center at Tyler* <http://psyche.uthct.edu/shaun/SBlack/detergnt.html#refs>

3.3.2. Solventes

El uso de solventes, se ha empleado principalmente para solubilizar HOCs en suelos, mediante tratamientos de lavado *in situ*. Esta técnica implica la inyección de solventes, los cuales, al igual que los surfactantes son capaces de incrementar la solubilidad de los contaminantes. Los solventes empleados más comúnmente con este fin, son los alcoholes (metanol, etanol y propanol), los cuales tienen la propiedad de ser miscibles en agua y en la fase hidrofóbica de los contaminantes. Es decir, cuando se agregan grandes cantidades de alcohol a un suelo contaminado, el solvente crea una interfase entre el agua y el contaminante, incrementando de esta manera la movilidad y la solubilidad de la fase no acuosa de los HOCs. Además de los alcoholes, algunos otros solventes usados para desorber HOCs son el diclorometano, acetona, tolueno, ciclohexano, N,N-dimethylformamida y etilacetato (Brinch y col., 2002). Aunque la aplicación de los solventes, comúnmente se ha empleado para incrementar la solubilidad de los HOCs, existen estudios que demuestran que su adición puede incrementar la degradación de algunos contaminantes en la fase hidrofóbica (Birman y col., 1996).

Una de las claves del éxito de esta técnica es la selección adecuada del solvente (Kueper y col., 1997). Dentro de los criterios que deben considerarse para la selección de un solvente, se encuentran: (i) capacidad para disolver cantidades adecuadas del contaminante, (ii) baja toxicidad en concentraciones traza (ausencia de carcinogenicidad); (iii) fácilmente biodegradable; (iv) rutas de degradación conocidas y (v) costo unitario (Block, 2000).

4. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

4.1. El composteo como una alternativa para la biorremediación de suelos

En los últimos años se han realizado diversos estudios de restauración de suelos contaminados con HTPs (hasta 20,000 ppm) por procesos de composteo, obteniendo niveles de degradación de 60 a 98% entre 98 y 120 días (Schulz y Poetzsch, 1995; Beaudin y col., 1996; Laine y Jorgensen, 1997). En un estudio realizado con concentraciones mayores de hidrocarburos (20,000 - 55,000 ppm) con un suelo arcilloso, se demostró una biodegradación de 60 a 70%, entre 2 y 3 años. Este estudio se realizó con un suelo contaminado con lodos oleosos, en parcelas en campo (Loehr y col., 1992 reportado por Salanitro y col., 1997).

Otros grupos de trabajo, han estudiado el uso de otros sistemas sólidos para la degradación de HTPs. Colombo y col. (1996), estudiaron la degradación de HTPs en el suelo, por microorganismos nativos y por hongos filamentosos. Encontraron niveles de degradación significativos (26-35 %) en 90 días de cultivo. Chaineau y col. (1995), encontraron un 75% de degradación de HTPs en un suelo contaminado (2,000 ppm) inoculado con la flora nativa del mismo suelo. Por las razones aquí presentadas, es importante resaltar que la biorremediación en fase sólida es una de las tecnologías de remediación para suelos contaminados, con excelentes perspectivas de aplicación. En la Tabla 2 se resumen algunos estudios de aplicaciones de sistemas de composteo para la remediación de suelos contaminados por HTPs.

Tabla 2. Resultados de algunos estudios realizados a escala piloto y gran escala, en donde se han aplicado procesos de composteo para la biorremediación de suelos contaminados por HTPs.

Tipo de biopila	Suelo (m ³)	Contaminante inicial (mg/kg)	Tiempo (días)	Remoción (%)	Concentración final (mg/kg)	Referencia
Alargada Estática	100	HTPs: 20,000	104	43 50	11,200 10,000	Abiola y col., 1997
Alargada Estática	500 250	HTPs: 40,000 HTPs: 20,000	450	70	12,000 6,000	Chino y col., 1999
Alargada	0.4	Diesel: 50,000	45	94	6,000	Cunningham y Philip, 2000
Estática	27	HTPs: 30,000	154	80	6,000	Iturbe y col., 2002

En investigaciones recientes (2002) realizadas en el CENICA (datos no publicados), se determinó que la adición de compuestos orgánicos de fácil degradación como agentes de volumen (bagazo de zanahoria, bagazo de caña, estiércol de caballo y composta madura) a un suelo contaminado con HTPs, propician una mejor degradación de este tipo de contaminantes. De acuerdo, a los resultados obtenidos, la degradación de HTPs en las muestras de suelos con estos tipos de agentes de volumen se incrementó hasta en un 14%, con respecto a una muestra control sin agentes de volumen.

4.2. Estudios con suelos intemperizados

En suelos contaminados por largos períodos (suelos intemperizados), los contaminantes llegan a ser inaccesibles (no biodisponibles) para los microorganismos debido a las interacciones (por ejemplo, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals) que se producen entre los contaminantes y la materia orgánica del suelo (Jonge y col., 1997). La biodisponibilidad, y por tanto la velocidad de degradación, frecuentemente están limitados por procesos físicoquímicos, 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 y col., 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).

Particularmente, en el caso de 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 y col., 1994). Algunas de las tecnologías que pueden aplicarse para desorber contaminantes hidrofóbicos de suelos intemperizados son: el uso de solventes no polares (tolueno), el uso de surfactantes no iónicos (Brij 30, Tween 80, Triton X-100, etc.) y la aplicación de tratamientos electroquímicos (García y col. 2002; Laha y col., 1992; Ko y col., 2000). En las siguientes secciones se incluyen algunos antecedentes al respecto.

4.2.1. Tratamientos con surfactantes

El uso de surfactantes no iónicos, es una de las prácticas más comunes y efectivas empleadas para la desorción de compuestos orgánicos hidrofóbicos (HOCs) (Kotterman y col., 1998; Ghosh, 1997). La eficiencia de desorción de un surfactante depende de su naturaleza, de la dosis empleada, de la hidrofobicidad del contaminante, de la interacción surfactante-suelo y del tiempo de contacto surfactante-suelo (Guha y col., 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 inhibir la degradación (Laha y col., 1992). Stelmack y col. (1999), demostraron que el uso de surfactantes reduce la adhesión de las bacterias en la superficie hidrofóbica, dando como resultado una baja actividad de biodegradación. Para solucionar este tipo de problema, algunos investigadores recomiendan la utilización de surfactantes fácilmente biodegradables, como el Brij 30, Brij 35 y Tween 80 (Ghosh, 1997).

Abiola y col. (1997), determinaron que el uso de surfactantes favorece la remoción de HTP en un suelo contaminado con 20,000 mg/kg de suelo. Los sistemas experimentales fueron biopilas estáticas y alargadas con y sin surfactante. El grupo observó que solamente en las biopilas alargadas adicionadas de surfactante se favoreció la biodegradación de hidrocarburos.

Kotterman y col. (1998), evaluaron la oxidación de PAHs utilizando diversos surfactantes. En este estudio se determinó que el surfactante Tween 80 (1 - 2.5 g/L), presentó la menor toxicidad sobre el sistema ligninolítico de la bacteria *Bjerkandera* sp., así como un mayor estímulo en la velocidad de oxidación del antraceno y del benzo(a)pireno. Por su parte, Ghosh en 1997, evaluó la biodegradación de PAHs en suelos utilizando cuatro diferentes surfactantes no iónicos, en este estudio observó degradaciones de fenantreno de 70 - 80% en 98 días, al emplear concentraciones de surfactantes de 2.5 g/L o mayores; este resultado fue atribuido principalmente a que arriba de este valor se presenta la formación de micelas, además de que se aumenta el tiempo de vida del surfactante en el suelo.

4.2.2. Tratamientos con solventes

La aplicación de solventes ha sido básicamente empleada para incrementar la solubilidad de los HOCs (Catherine y col., 1993). Sin embargo, se ha observado también que el empleo de solventes mejora la biodegradación de los contaminantes en la fase hidrofóbica (Birman y col., 1996). El tolueno ha sido uno de los solventes empleados con este fin, siendo una de sus principales características que es un excelente solvente de compuestos polares y asfaltenos (Fenistein y col., 1998). Por otra parte, este tipo de compuestos resulta extremadamente tóxico para los microorganismos, ya que disuelven la membrana celular, por lo que un punto crítico para el uso del tolueno es precisamente la tolerancia de los microorganismos. Los microorganismos degradadores de tolueno no son inmunes a su efecto tóxico general y son sensibles a su presencia, sin embargo, también son capaces de recuperarse y colonizar nuevamente una matriz (Huertas y col, 1998).

García y col. (2002), demostraron que la adición de tolueno en suelos intemperizados, tiene un efecto positivo en la desorción de HTPs y en la biodegradación de estos compuestos. De acuerdo con sus resultados, la adición de 14,000 mg de tolueno/kg de suelo, incrementó la velocidad de degradación de HTPs en un suelo contaminado (292,000 mg/kg) hasta tres veces con respecto a la velocidad observada para un suelo control (sin tolueno). En 30 días de tratamiento se obtuvo 45% de degradación de HTPs en el suelo tratado con tolueno.

4.2.3. Tratamiento electroquímico

Esta técnica puede emplearse para iniciar o mejorar procesos de biorremediación en acuíferos o suelos *in situ* por medio de electro-ósmosis o electro-migración (Van Cauwenberghe, 1997). A través de esta tecnología es posible activar poblaciones microbianas capaces de transformar contaminantes orgánicos con la aplicación de nutrientes que promueven su crecimiento, reproducción y metabolismo y se ha empleado para mejorar la biorremediación de suelos limosos poco permeables. Los procesos electro-cinéticos favorecen el movimiento de bacterias, agua y nutrientes a través del suelo, incrementando así la eficiencia de la biodegradación (Riser-Roberts, 1998).

Es una tecnología normalmente empleada para el tratamiento de suelos contaminados con metales que poseen carga. Sin embargo, se ha demostrado que interacciones bipolares entre moléculas de agua y partículas de suelo conducen a un fluido electro-osmótico de agua hacia el cátodo, lo que favorece el transporte de compuestos orgánicos que no poseen carga. El concepto del movimiento de contaminantes orgánicos hacia áreas que contienen microorganismos degradadores resulta novedoso y atractivo, debido al potencial para mover los contaminantes hasta una zona degradativa inoculada y para desorberlos cuando se encuentran sorbidos en los microporos del suelo (intemperizados), además de la capacidad para reunir contaminantes dispersos (Jackman y col., 2001).

De acuerdo con Lageman y col. (1995), el crecimiento microbiano (y con ello la biorremediación) se estimula con los procesos electrocinéticos. Este grupo encontró un incremento de 50% en el crecimiento microbiano, después de aplicar una corriente (22.5 V/m) en un suelo. 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 °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 HTPs en 2,294 m³ de suelo se redujo hasta 100 ppm.

Maini y col. (2000), estudiaron la remediación electrocinética en pequeña escala (973.2 g suelo seco), de un suelo históricamente contaminado con HAPs y BTEX. Después de 23 días (3.72 A/m²), se observó un movimiento de HAPs, con una reducción de 94% en la concentración, en el suelo más cercano al ánodo. En un experimento a gran escala (46.7 kg suelo seco), utilizaron un arreglo hexagonal de ánodos tubulares rodeando un cátodo tubular central. El tratamiento de 112 días provocó la acidificación del suelo (pH 2.6) cerca del ánodo y se observó un movimiento de PAHs y BTEX hacia el cátodo. La concentración de HAPs se redujo de 720 a 4.7 mg/kg después de 22 días. Los PAHs (28 mg) y benceno se recuperaron en columnas de carbón activado granular.

En investigaciones recientes (UAMI, 2001), se demostró que un tratamiento electroquímico puede provocar una disminución significativa (~10,000 ppm) de hidrocarburos en suelos intemperizados, al aplicar una densidad de corriente de 1.25 mA/cm² durante 6 h. En este caso, se presentó una desorción de los HTPs del suelo provocando una alta concentración de hidrocarburos disponibles en el suelo y una pequeña fracción de volátiles.

5. OBJETIVOS

5.1. *Objetivo general*

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

5.2. *Objetivos específicos*

- Seleccionar y realizar diferentes pretratamientos fisicoquímicos al suelo intemperizado con el objeto de desorber los hidrocarburos del suelo.
- Evaluar la degradación de HTPs mediante composteo (biopilas) con agentes de volumen de fácil degradación a nivel semipiloto.
- Seleccionar el pretratamiento fisicoquímico más adecuado, en cuanto a la eficiencia de degradación de HTPs, para proponer su aplicación a gran escala en sistemas de composteo para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

6. MÉTODOS Y MATERIALES

6.1. *Obtención de suelo contaminado con hidrocarburos*

El suelo intemperizado contaminado con hidrocarburos, se obtuvo de la rizósfera de una planta nativa en el pantano de “Santa Alejandrina” en Minatitlán, Veracruz. El suelo se tomó de la rizósfera con el objeto de obtener poblaciones microbianas adaptadas a altas concentraciones de hidrocarburos, y de esta manera aumentar la eficiencia del proceso de biorremediación.

6.2. *Pretratamientos fisicoquímicos*

Los pretratamientos fisicoquímicos propuestos en este trabajo experimental, se seleccionaron en base a los resultados obtenidos durante la fase experimental del proyecto multidisciplinario “Estudios de tratabilidad para la remediación de suelos intemperizados contaminados con hidrocarburos”, apoyado por la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM-I, 2001); además de información obtenida a partir de publicaciones de revistas de investigación. El objetivo principal de cada pretratamiento fue el de desorber del suelo intemperizado los hidrocarburos contaminantes.

6.2.1. **Pretratamiento con surfactante**

El surfactante utilizado fue Tween 80 (grado reactivo, HYCEL), elegido debido a que su CMC (12 g/L) es baja con respecto a otros surfactantes (Tabla 2). Esta baja CMC, permite la formación de micelas a bajas concentraciones de surfactante. De acuerdo con los resultados presentados por Ghosh (1997), este surfactante puede ser adsorbido por el suelo y degradado por los microorganismos hasta en un 99.6%, durante los primeros 10 días de un tratamiento de biorremediación.

La concentración de Tween 80 adicionada al suelo fue de 2.5 g/L disuelto en agua (0.833 g Tween/kg suelo), hasta una humedad de 30%. El suelo se mezcló con la solución y se dejó reposar por un periodo de 24 h. Posteriormente, el suelo se dejó secar a temperatura ambiente durante 48 h.

6.2.2. Pretratamiento con tolueno

El suelo seco se adicionó con 0.5% (v/p) de tolueno (4.33 g tolueno/kg suelo), se homogeneizó y se colocó en bolsas de plástico, las cuales se cerraron herméticamente. El procedimiento se realizó 24 horas antes de iniciar el tratamiento de biorremediación por composteo (UAM-I, 2001).

6.2.3. Pretratamiento electroquímico

Este pretratamiento se utilizó con el objetivo de favorecer la desorción de los HTP del suelo, a través de una diferencia de potencial eléctrico (Figura 5). Se utilizó una celda modelo construida con placas de vidrio, con una malla de acero inoxidable como cátodo y una de fieltro de grafito como ánodo. Los compartimentos catódico y anódico se mantuvieron al mismo nivel para evitar que el fluido se desplazara por una diferencia de presión hidráulica. Las soluciones usadas fueron: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 M en el lado anódico y NaOH 0.1 M en el lado catódico. La corriente se impuso a un valor constante de 1.75 mA/cm^2 durante 6 horas. Posteriormente, el suelo se secó a temperatura ambiente.

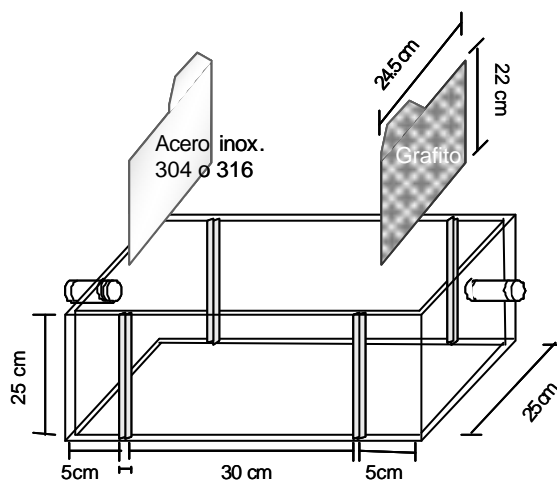


Figura 5. Representación esquemática de la celda modelo de vidrio utilizada en el tratamiento electroquímico del suelo contaminado con hidrocarburos.

6.3. Caracterización y preparación del suelo

Antes de su utilización, las muestras de suelo se tamizaron con malla No. 10, recolectando la porción de suelo con tamaño de partícula menor a 2 mm. Esta porción de suelo se almacenó a temperatura ambiente en botes de plástico hasta su utilización. Una fracción del suelo se caracterizó para obtener información acerca de la salinidad (conductímetro), pH (EPA 9045C), hidrocarburos totales del petróleo (EPA 3540C) y carbono soluble (EPA 9060).

Con el objetivo de mejorar las propiedades físicas del sistema (porosidad y capacidad de retención de agua), así como para favorecer el balance de nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos, se le adicionó al suelo una mezcla de compuestos orgánicos de fácil degradación como agentes de volumen: (i) bagazo de caña; (ii) bagazo de zanahoria; (iii) estiércol de caballo y (iv) composta madura. Estos agentes se seleccionaron con el criterio de que fueran residuos biodegradables sin valor agregado y con facilidad para su obtención. Cada uno, se adicionó al suelo en proporción tal que, de acuerdo al contenido de C, N, P y K de cada uno (Tabla 3), se obtuviera un balance de nutrientes apropiado (C/N= 30, C/P=100 y C/K=200) (Von Fahnstock y col., 1998).

El bagazo de caña se seleccionó por su contenido de C y P, además de ser un excelente agente de volumen; el bagazo de zanahoria se adicionó por su alto contenido de N y azúcares solubles, además de ser un material fácilmente biodegradable. El estiércol de caballo se utilizó principalmente para aumentar el contenido de K y por ser un material que puede incrementar la microflora del sistema, además de ser un buen agente de volumen. Con la finalidad de favorecer aún más la microflora en las biopilas, se adicionó composta madura proveniente de un sistema que posee un consorcio microbiano adaptado a la presencia de compuestos como solventes e hidrocarburos (UAMI, 2001). La Tabla 3 muestra la composición química aproximada (C, N, P y K) teórica de los agentes de volumen y del suelo estudiado, así como el contenido de humedad real de cada componente.

Tabla 3. Composición química aproximada (aporte de C, N, P y K) y contenido de humedad de los aditivos y del suelo en estudio.

Compuesto	Composición por biopila			Composición elemental (%) por aditivo				Composición elemental (g) por biopila			
	MS (kg)	H (%)	MH (kg)	C	N	P	K	C	N	P	K
Suelo	8.85	2	9.03	2.5	0.25	-	-	221.3	22.1	-	-
HTP (50 g/kg)	0.460	0	0.46	85	-	-	-	391.2	-	-	-
Composta	1.125	11	1.26	30	1.1	1	1.25	337.5	12.4	11.3	14.1
Estiércol de caballo	1.125	66	3.31	43	1.6	0.4	2.43	483.8	18.0	4.5	27.3
Bagazo de zanahoria	1.125	84	7.03	35	1.9	0.4	-	393.8	21.4	4.5	-
Bagazo de caña	1.125	34	1.70	46	1.4	1.23	0.92	517.5	15.8	13.8	10.4
Azúcar	0.420	0	0.42	42	-	-	-	176.4	-	-	-
Agua	-	100	5.00	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (kg)	14.2		28.2					2,521	89.6	34.1	51.8
Balance de nutrientes teórico (por biopila)								C/N= 28; C/P=74; C/K= 50			
Balance de nutrientes recomendado								C/N= 30; C/P=100; C/K=200			

H = Humedad, MH = materia húmeda, MS = materia seca

De acuerdo con la Tabla 3, el peso teórico total de cada biopila (suelo más aditivos), en base húmeda fue de 28.2 Kg y la densidad fue de 0.570 kg/L. Para determinar las relaciones carbono-nitrógeno, -fósforo y -potasio (C/N, C/P y C/K), se dividió la cantidad total de carbón contenida en el suelo y aditivos (2,521 g) entre las cantidades totales de cada elemento (89.6, 34.1 y 51.8 g) respectivamente. La adición de azúcar en la composta, se realizó para ajustar la relación C/N a un valor de 28. Por otra

parte, comparando el balance de nutrientes teórico y el recomendado, se puede observar que existe una diferencia significativa entre la relación C/K, la cual se debe al alto contenido de potasio presente en el estiércol de caballo.

6.4. Condiciones de cultivo a nivel semi-piloto (biopilas)

Cada biopila se preparó con ~ 9 kg (peso seco) de suelo pretratado, adicionado con 1.125 kg (peso seco) de cada agente de volumen (Tabla 3). Se prepararon 3 biopilas diferentes, con el fin de evaluar el efecto de cada pretratamiento, más una biopila control con suelo sin tratar.

Una vez que se mezcló el suelo con los agentes de volumen, y el azúcar (sacarosa) necesaria para ajustar la relación C/N a 28, el material de cada biopila se colocó en recipientes de plástico (capacidad para 50 kg) y se adicionó agua suficiente para obtener una humedad cercana al 50%. Las biopilas se identificaron como sigue: (i) control (suelo sin tratar); (ii) electroquímico (tratamiento electroquímico); (iii) surfactante (tratamiento con surfactante); (iv) tolueno (tratamiento con tolueno).

El peso total final para cada biopila fue de alrededor de 30 kg (peso húmedo). Todas las unidades experimentales (recipientes con el material a compostear) se mantuvieron a temperatura ambiente (en un invernadero) durante siete meses. Por otra parte, cada unidad experimental fue periódicamente (cada 30 días) adicionada con bagazo de zanahoria (5% del peso de la pila), con la finalidad de mantener un cierto contenido de materia orgánica de fácil asimilación y de esta forma asegurar la actividad y diversidad de la población microbiana.

6.5. Métodos analíticos

A continuación se describen los métodos analíticos que se llevaron a cabo a lo largo del presente estudio. Todas las variables, con excepción del consumo de oxígeno, fueron analizadas por triplicado a partir de tres muestras independientes tomadas de cada biopila, para cada tiempo de muestreo. Las pruebas respirométricas se realizaron por duplicado durante 120 días. Los muestreos de cada biopila se llevaron a cabo al arranque del estudio (tiempo cero), y después de 20, 35, 52, 70, 90, 124, 136, 167 y 206 días. Todos los datos presentados corresponden al promedio de tres mediciones independientes. Los análisis de varianza se realizaron con el uso del programa estadístico SAS, con un α de 0.05, utilizando la prueba de Duncan.

Respirometría. Durante los cuatro primeros meses de la investigación, se determinó la actividad microbiana en tiempo real del proceso de composteo, mediante la medición del consumo de oxígeno en un respirómetro (Comput-Ox 244, N-CON).

Hidrocarburos totales del petróleo (HTPs). El contenido total de HTP en las muestras de suelo, se determinó gravimétricamente mediante el método EPA 3540C con diclorometano como agente de extracción. La determinación de HTP se realizó de acuerdo a la siguiente ecuación.

$$\text{HTPs} = (W_{\text{MHTPs}} - W_{\text{M}}) / W_{\text{s}} = \text{mg de HTPs/gr de suelo seco}$$

En donde:

W_s = peso del suelo de extracción.

W_M = peso del matraz de extracción a peso constante.

W_{MHTPs} = peso del matraz + los HTP extraídos del suelo.

pH. Se utilizó el método EPA 9045C, que consiste en mezclar el suelo con agua destilada por 5 min., con la finalidad de solubilizar los compuestos que dan la característica ácida o básica del suelo. La relación suelo:agua que se empleó para determinar el pH, fue de 1:5 (2 g suelo:10 mL agua).

Carbono orgánico total en fase acuosa (TOC). Se empleó el método EPA 9060, a partir del mismo extracto utilizado para la determinación de pH. Mediante este método, se determina el carbono orgánico soluble en agua, contenido en el suelo.

Conductividad eléctrica (CE). Se determinó por conductimetría, con el extracto obtenido de acuerdo al método EPA 9045C. La CE es una propiedad que se cuantifica por medio de la conductancia (resistencia⁻¹) determinada en una sección transversal a través del cual pasa una corriente eléctrica. Esta variable cuantificada en un suelo, generalmente se utiliza como una medida de su salinidad.

Humedad (%H). Se cuantificó gravimétricamente por la diferencia de peso entre las muestras húmedas y secas. El secado de las muestras se realizó en una estufa a 60 °C, durante 24 horas.

Actividad de agua (A_w). Es una medida de la disponibilidad de agua utilizable por los microorganismos. La A_w , es la razón entre la presión de vapor del aire en equilibrio con una sustancia o solución y la presión de vapor del agua a la misma temperatura (Madigan 1998). Los valores pueden variar entre 0 (suelo seco) y 1 (agua pura). Se determinó directamente en las muestras tomadas de las biopilas, con el uso de un equipo digital (Aqualab CX-2).

Cenizas y materia orgánica volátil. Las cenizas se cuantificaron por diferencia de peso, después de someter una muestra seca (2.5 g) a calcinación en una mufla (800 °C, 24 horas). La diferencia entre el peso inicial de la muestra y sus cenizas, se considera como materia orgánica volátil presente en las muestras. El contenido de cenizas de las muestras fue utilizado además como un factor de corrección para obtener la cantidad real de materia orgánica degradada, además de la degradación de HTP.

Mineralización (CO_2 producido). La mineralización de HTP y de la materia orgánica contenida en las biopilas, se determinó por la pérdida de materia orgánica (MO) durante el tiempo del tratamiento, empleando la siguiente ecuación:

$$MO = 100 - \text{Cenizas (\%)}$$

$$\% \text{ Mineralización} = \frac{MO_{\text{inicial}} - MO_{\text{final}}}{MO_{\text{inicial}}}$$

Es importante aclarar que para realizar esta determinación, se parte de la consideración de que la materia orgánica que se pierde durante el proceso en forma gaseosa, es principalmente CO_2 .

Cuenta microbiana (unidades formadoras de colonias). La cuenta microbiana (cuenta en placa) se refiere al número de células viables o fragmentos miceliares en una muestra, que son capaces de crecer sobre un medio de cultivo determinado. En este método, el número de microorganismos se reporta como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de muestra (base seca). En este caso, se utilizó un medio de cultivo que favorece el crecimiento de bacterias (agar soya tripticaseína, AST); y uno que favorece el crecimiento de hongos (agar papa dextrosa, PDA), al cual se le adicionó cloramfenicol para evitar el crecimiento bacteriano. Las condiciones de la prueba fueron las siguientes:

- ♦ Muestra de suelo: 3 g
- ♦ Diluciones: 1:10 (volumen: 30 mL)
- ♦ Repeticiones por dilución: 3
- ♦ Tiempo de incubación: AST 2 días; PDA 5 días
- ♦ Temperatura: 30 °C
- ♦ Criterio para el conteo de colonias: 20-200 por caja

El número de UFC/g de suelo (peso seco) se obtuvo de la siguiente manera:

$$\text{UFC/mL} = (\text{No. de colonias} / 0.1 \text{ mL de inóculo}) \times \text{factor de dilución}$$

$$\text{UFC/g} = (\text{UFC/mL}) \times (27 \text{ mL}) / \text{peso de la muestra (g)}$$

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

En la Tabla 4, se muestran algunos de los parámetros analizados en el suelo original contaminado con hidrocarburos (control), así como en los suelos después de los pretratamientos con surfactante, tolueno y electroquímico.

Tabla 4. Variables analizadas en el suelo original y en los suelos después de aplicar los diferentes pretratamientos. Se muestran los valores promedio y desviaciones estándar de tres mediciones independientes de cada variable.

Tratamiento	Cuenta microbiana (UFC/g) ^a		pH*	CE* (mS/cm)
	Hongos*	Bacterias*		
Control	7.8E+07 ± 6.4E+06 B	2.5E+09 ± 2.0E+08 C	6.66 ± 0.09 C	0.46 ± 0.02 C
Surfactante	1.3E+08 ± 8.7E+06 C	4.6E+10 ± 3.4E+09 A	7.93 ± 0.03 A	0.76 ± 0.00 B
Tolueno	1.1E+07 ± 9.8E+05 C	2.1E+10 ± 1.9E+09 B	7.53 ± 0.11 B	0.71 ± 0.01 B
Electroquímico	7.1E+06 ± 7.6E+05 A	1.0E+10 ± 8.0E+08 C	7.44 ± 0.03 B	1.65 ± 0.10 A

^a UFC/g: unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Además de las variables que se presentan en la Tabla 4, se cuantificó el contenido de HTP y la densidad inicial del suelo. Sin embargo, estos datos no se muestran debido a que solo se cuantificaron en el suelo control, ya que ninguno de los pretratamientos modifica dichos parámetros. La densidad inicial del suelo original fue de 1.41 kg/L (± 0.01 g/mL) y el contenido de HTP fue de 52,319 mg/kg de suelo seco ($\pm 4,991$ mg/kg).

Como se puede observar, el pH del suelo se incrementó alrededor de una unidad después de realizar los tres pretratamientos. Otra variable que presentó cambios significativos posteriores al pretratamiento fue la CE, observándose el mayor incremento (1.19 mS/cm^2) para el suelo tratado electroquímicamente. La CE es una medida de las sales presentes en el medio, lo que sugiere que por las condiciones del tratamiento electroquímico, así como por su mismo efecto sobre los iones presentes, el contenido de sales disponibles (disueltas) es mayor que para el resto de los suelos.

Con respecto a la cuenta microbiana, se observó que en general la cuenta bacteriana fue entre 1 y 3 órdenes de magnitud mayor que la cuenta de hongos, y que la cuenta microbiana total aumentó significativamente en el suelo tratado con surfactante con respecto al control sin tratar. La mayor cuenta de bacterias con respecto a la de hongos, puede deberse al aporte de un alto contenido de las mismas por la adición del estiércol.

7.2. Pruebas de biorremediación

En las siguientes Secciones se presentan los resultados obtenidos durante 210 días de tratamiento biológico (composteo) en el suelo contaminado por hidrocarburos.

7.2.1. Humedad y actividad de agua (A_w)

La humedad es una de las variables más importantes para favorecer la degradación de contaminantes orgánicos por los microorganismos. El rango de humedad recomendado para sistemas de composteo aplicados en la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos es de 40 a 60%. Un valor de humedad por arriba de este rango puede provocar condiciones de anaerobiosis, y con ello una degradación más lenta de los contaminantes y la producción de malos olores, mientras que valores por de bajo de este rango pueden inhibir la actividad microbiana (Von Fahnstock y col., 1998; Madigan, 1998).

Por otra parte, los valores de A_w indican la cantidad de agua disponible para que los microorganismos puedan desarrollar sus funciones metabólicas, la mayoría de ellos requiere valores mayores a 0.9 para su crecimiento, es decir, si un microorganismo se encuentra en un substrato con una A_w menor a la requerida, su crecimiento se inhibe. El valor mínimo de A_w para bacterias es de 0.90, para levaduras de 0.85 y para hongos filamentosos de 0.80 (Madigan 1998).

Al inicio del tratamiento biológico, la humedad en las biopilas fue ajustado a valores entre 40 y 60% (Figura 5), lo que dio como resultado valores de actividad de agua (A_w) en un rango de 0.90 a 0.99 (Figura 6). Tanto los niveles de humedad como lo valores de A_w para todas las biopilas, se mantuvieron en los niveles aceptables y recomendados para sistemas de composteo eficientes, durante todo el tiempo del estudio: humedad superior a 40% y A_w cercana a 1.

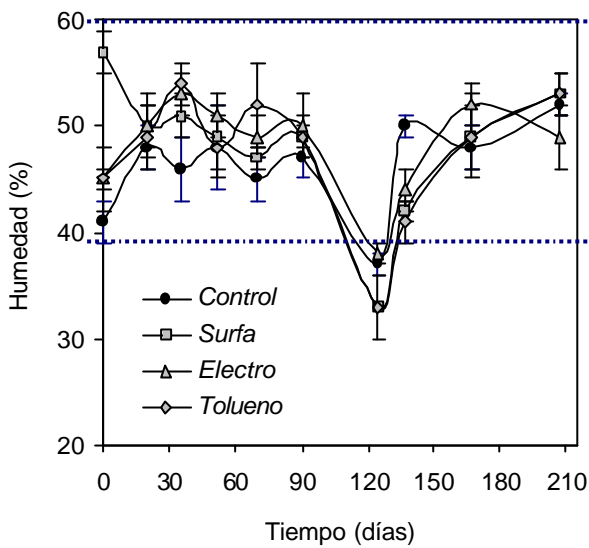


Figura 5. Contenido de humedad en las biopilas durante 210 días de tratamiento. Las líneas punteadas muestran el rango de humedad recomendado.

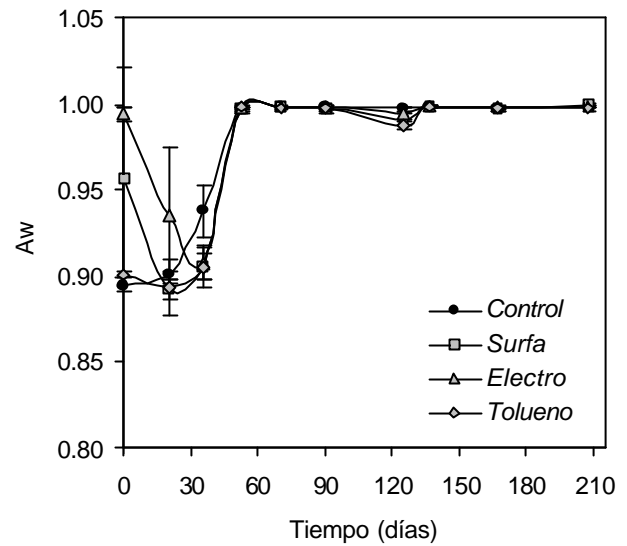


Figura 6. Actividad de agua (A_w) en las biopilas durante 210 días de tratamiento biológico.

El mantenimiento de la humedad por arriba de 40% durante 210 días del tratamiento se consiguió debido a la adición periódica de agua, con la finalidad de compensar la evaporación durante la etapa termofílica del composteo (temperaturas mayores a 40 °C) y/o a las altas temperaturas registradas en el invernadero (hasta 45°C durante el verano) en donde se mantuvieron las biopilas.

La baja humedad registrada en las biopilas entre los 90 y 120 días, puede atribuirse a la alta evaporación que se presentó durante el periodo de verano. Sin embargo, es importante resaltar que la A_w en este mismo periodo se mantuvo en los niveles adecuados para favorecer la actividad microbiana de todas las especies presentes.

7.2.2. pH

Al iniciar el tratamiento de composteo, después de la adición de los agentes de volumen, el pH inicial en todas las biopilas fue cercano a 7.5 (Figura 7). Sin embargo, a los 20 días de tratamiento, se detectó un aumento significativo (~ 1.5 unidades) en el pH de todas las biopilas. El rango de pH recomendado para que se lleve a cabo una buena degradación de hidrocarburos en suelos se encuentra entre 5 y 9, con un óptimo en 7 (Dragun, 1988; Von Fahnstock y col., 1998). En base a lo anterior, a partir de los 23 días de tratamiento se procedió a reducir el pH de las biopilas mediante la adición por aspersión, de una solución de ácido fosfórico al 5% cada tercer día. Este procedimiento se suspendió a los 52 días de tratamiento, una vez que se obtuvieron valores de pH cercanos a 8. Posteriormente, los valores de pH se mantuvieron entre 6.5 y 7.5 hasta los 210 días del tratamiento.

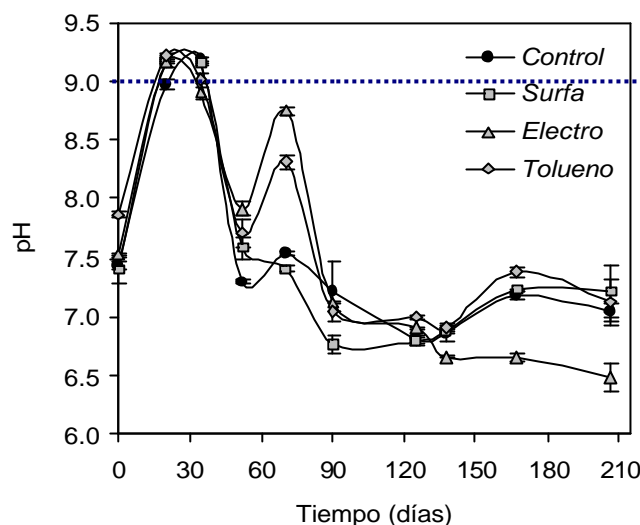


Figura 7. Valores de pH en las cuatro diferentes biopilas durante 210 días de composteo. La línea punteada muestra el nivel superior de pH recomendado para la biodegradación de hidrocarburos.

El incremento de pH observado puede atribuirse a una intensa actividad microbiana, lo que a su vez pudo provocar un ineficiente intercambio gaseoso y por consiguiente una baja cantidad de oxígeno en el interior de las biopilas durante los primeros días del tratamiento. Esto pudo conducir a condiciones anaerobias en las biopilas, favoreciéndose reacciones de desnitrificación (reducción de nitratos a amonio/amoniaco e incluso a nitrógeno molecular), las cuales tienden a incrementar el pH en un sistema.

7.2.3. Conductividad eléctrica (CE)

La conductividad eléctrica es uno de los parámetros más utilizados para estimar la salinidad en suelos. Para distinguir suelos salinos de no salinos, se han sugerido varios límites arbitrarios de salinidad en función de los efectos que pueda tener en las plantas. En investigaciones realizadas con cultivos de tomate en Israel, se observó que el rendimiento del cultivo disminuye en un 10%, cuando se siembra en un suelo poco salino ($CE = 2 \text{ mS/cm}$), mientras que en un suelo altamente salino ($CE = 9.5 \text{ mS/cm}$), el rendimiento del cultivo puede verse afectado hasta en un 50% (Miller y Donahue, 1995). En la mayoría de los estudios, se reporta que las plantas se ven afectadas de manera adversa cuando la CE es mayor de 4 mS/cm (Madigan, 1998).

En la Figura 8 se muestran los valores de CE obtenidos para las cuatro biopilas durante 210 días de tratamiento biológico. Puede observarse que inicialmente la CE de las biopilas aumentó (entre 2 y 6 veces) con respecto a la CE del suelo original pretratado, esto debido a la adición de materiales con un cierto contenido de sales solubles, como el estiércol de caballo.

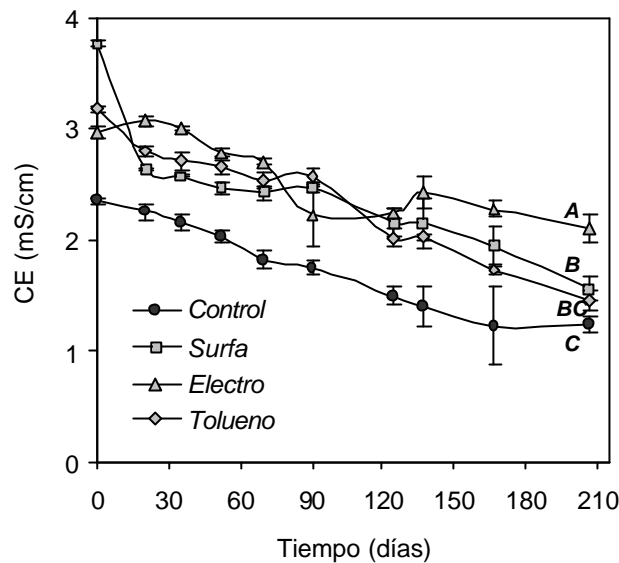


Figura 8. Comportamiento de la CE en función de los diferentes pretratamientos durante 210 días de composteo. Los valores promedio correspondientes a 206 días, marcados con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

La CE en las biopilas con suelo pretratado se mantuvo durante todo el tiempo del tratamiento por arriba de la CE de la biopila control. Pudo observarse que en todos los casos, la CE disminuyó significativamente (hasta 2 unidades) con respecto al valor detectado inicialmente para cada biopila. El ligero aumento en la CE observado después de los 120 días en las tres biopilas pretratadas, puede atribuirse a una nueva desorción de contaminantes debido a una nueva aplicación de cada uno de los pretratamientos al material composteado.

Los resultados obtenidos para la CE, como una medida de compuestos solubles, indican que el tratamiento biológico en las condiciones estudiadas, fue eficiente para disminuir la cantidad de este tipo de contaminantes. Si bien la CE no puede identificar un contaminante en particular, es una medición de gran utilidad para determinar la distribución y la concentración de contaminantes como sales, ácidos o bases en un suelo.

7.2.4. Consumo de O₂

Cuando la velocidad de degradación de un compuesto es relativamente lenta, como en el caso de los hidrocarburos, el proceso puede seguirse continuamente por la cuantificación del CO₂ producido y/o el O₂ consumido (respirometría). La cantidad de CO₂ producido en un medio con hidrocarburos como única fuente de carbono, es una medida directa de su mineralización (Starnecker y Menner, 1996). Por otra parte, los pasos iniciales durante la biodegradación de hidrocarburos dependen del oxígeno molecular (O₂), debido a que las principales rutas degradativas para hidrocarburos alifáticos y aromáticos involucran enzimas oxigenasas.

En la Figura 9 se muestra el consumo de oxígeno para las diferentes biopilas. Se observó que durante los primeros 100 días del tratamiento, las biopilas que presentaron mayor consumo de O₂ fueron la biopila control y la tratada con tolueno, a diferencia de la tratada electroquímicamente, en donde se observó el menor consumo después de 100 días (Tabla 5).

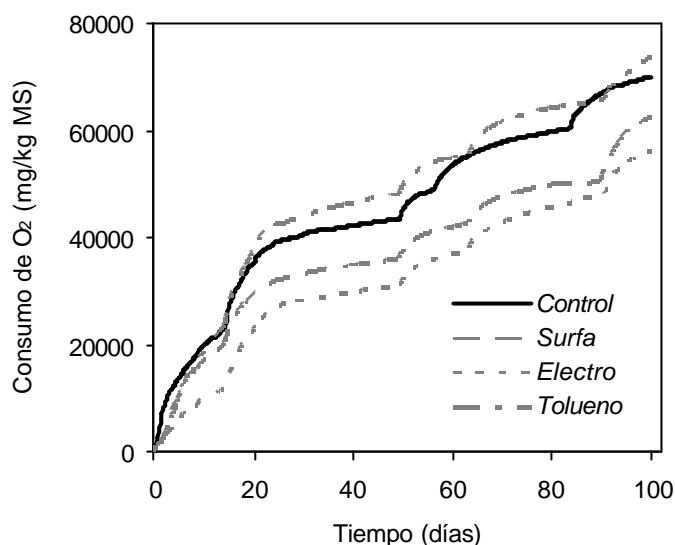


Figura 9. Consumo de O₂ de muestras del material de cada una de las biopilas, durante 110 días de incubación a 30°C.

Por otra parte, se observó una diferencia entre la velocidad inicial de consumo de O₂ (2 días) de la biopila control con respecto al material de las biopilas pretratadas (Tabla 5). Estas diferencias, junto con el menor consumo total de O₂ en la biopila tratada electroquímicamente, pueden relacionarse con una mayor desorción de hidrocarburos del suelo por la aplicación de los pretratamientos, especialmente el electroquímico.

Tabla 5. Consumo total de O₂ después de 100 días de incubación a 30 °C y velocidades iniciales de consumo de O₂ (48 h).

Tratamiento	Consumo total de O ₂ (mg/kg SS)	Consumo inicial de O ₂ (mg/kg SS·día)	R ²
Control	70230	4631	0.999
Surfactante	62703	1570	0.988
Electroquímico	56310	1526	0.993
Tolueno	73732	1440	0.986

De acuerdo con los resultados obtenidos, es posible que la concentración inicial de HTP desorbidos haya sido mayor en las biopilas con suelo tratado que en la biopila control. Puede suponerse que este efecto en la respiración se deba a un aumento en la concentración inicial de hidrocarburos, ya que

desde el inicio de la etapa de incubación se presentó esta disminución en la respiración en todas las biopilas tratadas. Se ha reportado que condiciones extremas (shock químico, pH y temperaturas extremos, presencia de toxinas) y altas concentraciones de contaminantes o sus productos pueden inactivar o alterar metabólicamente las células microbianas (Fan y Krishnamurthy, 2000).

Es importante aclarar que la cantidad total de O₂ consumido no tiene una relación directa con la degradación de HTP, ya que las biopilas contenían además otros compuestos orgánicos fácilmente biodegradables. Sin embargo, es un parámetro importante para estimar la actividad microbiana, así como para evaluar el posible efecto de la desorción de HTP y de los diferentes pretratamientos sobre los microorganismos presentes en las biopilas.

7.3. Biodegradación de hidrocarburos

A partir del vigésimo día de tratamiento biológico hasta los 210 días, se observaron diferencias significativas en la biodegradación de hidrocarburos, por efecto de los diferentes pretratamientos fisicoquímicos del suelo contaminado (Figura 10). En todos los casos, la biodegradación de hidrocarburos después de 210 días de composteo fue mayor de 35% (Tabla 6). Este resultado indica que el proceso de biorremediación empleado, junto con los agentes de volumen seleccionados y las condiciones utilizadas fueron favorables, aún para el caso del suelo sin pretratar, considerando que las biopilas fueron formadas con un suelo intemperizado.

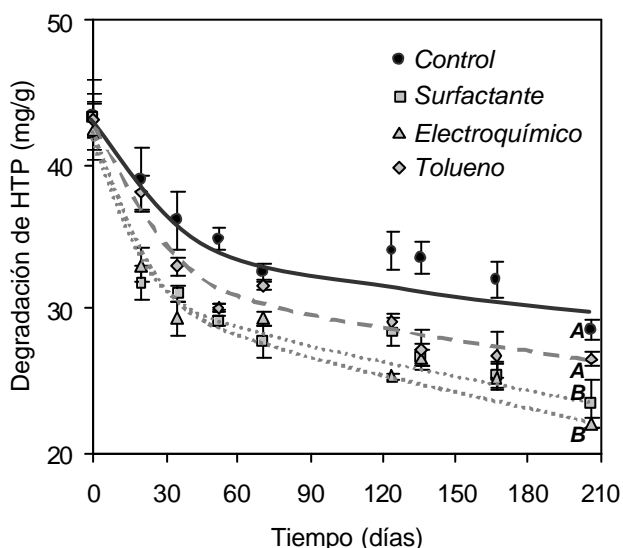


Figura 10. Cinética de biodegradación de HTP durante 210 días. Medias con la misma letra (210 días) no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

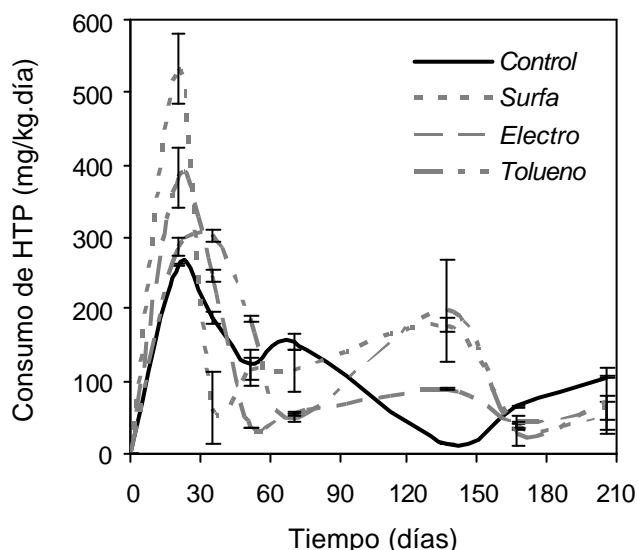


Figura 11. Velocidades de biodegradación de HTP durante 210 días de tratamiento.

Las diferencias observadas en los niveles de biodegradación (Figura 10 y Tabla 6) entre las biopilas con los suelos pretratados y el suelo control (3 a 12 unidades) indican que los pretratamientos utilizados para la desorción de hidrocarburos favorecieron su biodegradación.

En general, el empleo de pretratamientos para la desorción de contaminantes en un suelo, favorece la biorremediación. Sin embargo, una aplicación inadecuada del pretratamiento puede afectar negativamente el proceso. Stelmack y col. (1999), señalan que el empleo de ciertos surfactantes no biodegradables puede reducir la adhesión de las bacterias en la superficie hidrofóbica, dando como consecuencia bajos niveles de biodegradación. Laha y col. (1992), indican que el empleo de altas concentraciones de surfactante, puede resultar tóxico para los microorganismos.

En el caso de este estudio, los pretratamientos utilizados tuvieron un efecto positivo tanto en la biodegradación total de hidrocarburos como en la velocidad de degradación, con respecto al control sin pretratar (Figura 11). La mayor velocidad inicial (20 días) de consumo de hidrocarburos se obtuvo en la biopila tratada con surfactante, y esta fue significativamente mayor (entre 1.2 y 3.8 veces) que la velocidad en el resto de las biopilas (Tabla 6). Este resultado puede atribuirse a que el surfactante utilizado es una fuente de carbono fácilmente biodegradable (Ghosh, 1997), que por sus propiedades fisicoquímicas, inicialmente es cuantificado como materia orgánica y como parte de los compuestos solubles en diclorometano (Tabla 6), y por lo tanto la máxima velocidad de biodegradación de estos compuestos se detecta en los primeros días del tratamiento. Por otra parte, se ha demostrado que los surfactantes que incrementan la solubilidad de los hidrocarburos, pueden acelerar su biodegradación debido al incremento en su biodisponibilidad (Bardi y col., 2000).

La mayor biodegradación de hidrocarburos (48%), así como la mayor velocidad de consumo de hidrocarburos (100.2 mg/kg-día) después de 210 días, se obtuvo en la biopila tratada electroquímicamente (Tabla 6). De acuerdo con Pack (1997) y Harbottle y col. (2002), un tratamiento electrocinético aplicado a suelos contaminados puede mejorar significativamente su biorremediación, debido al movimiento tanto de los contaminantes como de los microorganismos, incrementando el contacto entre ambos y así la biodisponibilidad, ya que se favorece la remoción de los compuestos sorbidos en las partículas del suelo hasta zonas en donde la degradación puede ocurrir.

Tabla 6. Biodegradación de HTP, degradación de materia orgánica (MO) y velocidades iniciales (20 días) y globales (210 días) de consumo de hidrocarburos para las cuatro biopilas.

Tratamiento	Degradación de HTP* (%)	Degradación de MO* (%)	Consumo inicial de HTP* (mg/cm ³ ·día) ^a	Consumo global de HTP* (mg/cm ³ ·día) ^a
Control	35.6 ± 2.7 B	22.4 ± 2.0 C	0.225 ± 0.032 C	0.106 ± 0.008 D
Surfactante	45.9 ± 3.8 A	38.1 ± 1.5 A	0.852 ± 0.058 A	0.137 ± 0.011 B
Electroquímico	48.0 ± 0.8 A	29.4 ± 2.2 B	0.698 ± 0.043 B	0.141 ± 0.009 A
Tolueno	38.7 ± 1.2 B	31.6 ± 1.9 B	0.320 ± 0.053 C	0.116 ± 0.004 C

^a Valores obtenidos en base a la densidad inicial del suelo

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Como se mencionó anteriormente, de acuerdo con los resultados obtenidos, puede afirmarse que el tratamiento de biorremediación aplicado fue efectivo, aún para la biopila con suelo sin pretratar. Chaineau y col. (1995), encontraron una degradación de hidrocarburos de 75% en un suelo contaminado con HTP (2190 mg/kg), después de 270 días de incubación con la microflora nativa del suelo. Mas tarde, Thouand y col. (1999), estudiaron la degradación de petróleo crudo (1,000 mg/kg) por diferentes inóculos (naturales y comerciales) durante 28 días, encontrando niveles de degradación de 0.1 a 25% (peso).

Por otra parte, se reporta que las velocidades de degradación de hidrocarburos en suelos que contienen entre 0.5% y 1% (w/w) de HTP, pueden variar de 0.08 a 1.38 mg/cm³·día (Bossert y Bartha, 1984). Atlas (1981) indica que con comunidades microbianas adaptadas a la presencia de hidrocarburos, la velocidad de degradación puede variar de 0.0005 a 0.05 mg HTP/cm³·día.

Aunque los valores de las velocidades de biodegradación de HTP pueden variar en un amplio rango dependiendo de una serie de factores, en el presente estudio se obtuvieron altas velocidades de consumo y significativamente mayores que las de algunos reportes, lo que confirma que el empleo de esta tecnología puede resultar muy efectiva, como una alternativa para la remediación de suelos intemperizados.

De acuerdo con los resultados presentados, puede decirse que un factor limitante que incide directamente en la velocidad de biodegradación de hidrocarburos en un suelo intemperizado, es precisamente su biodisponibilidad. De acuerdo con Bardi y col. (2000), la biodegradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos no clorados generalmente está influenciada por su biodisponibilidad. Se reporta que un tratamiento de biorremediación *in situ* o *ex situ* puede manejarse eficientemente, solamente cuando las velocidades de biodegradación son conocidas. Por ejemplo, la adición de nutrientes y/o aceptores de electrones no es eficiente si la velocidad de degradación está limitada por la biodisponibilidad del contaminante (De Jonge y col., 1997). En general, la biorremediación por composteo, de un suelo contaminado con hidrocarburos puede llegar a ser muy eficiente si se mantienen algunos parámetros fisicoquímicos en condiciones óptimas (Von Fahnstock y col., 1998).

Los resultados aquí obtenidos confirman que la biodegradación de hidrocarburos en este tipo de suelos se encuentra limitada por la biodisponibilidad. Puede verse que en la biopila control, tanto la biodegradación, como las velocidades de biodegradación de hidrocarburos, fueron significativamente menores que en las biopilas tratadas para desorber los contaminantes. Además de la biodisponibilidad, la velocidad de degradación depende de otros factores como son: (i) presencia de microorganismos con capacidad metabólica para degradar los contaminantes; (ii) recalcitrancia de los compuestos presentes en la mezcla de hidrocarburos, (iii) concentración inicial de hidrocarburos, (iv) tipo de suelo, y (v) crecimiento microbiano y factores ambientales como pH, temperatura, nutrientes y aceptores de electrones (De Jonge y col., 1997).

De acuerdo con lo anterior, la biodegradación de HTP en las biopilas no estuvo limitada por la presencia de microorganismos, ya que las cuentas microbianas (UFC) a lo largo de los 210 días se incrementaron, con respecto a la cuenta inicial (Tabla 4). Esto indica también que los factores ambientales durante este tiempo fueron adecuados para mantener la microflora activa en las biopilas. La recalcitrancia de los compuestos presentes en la mezcla de hidrocarburos puede ser otro factor que se encuentre limitando la biodegradación, ya que desde el inicio hasta el tiempo final de muestreo (210 días) se encontró un elevado contenido de asfaltenos (mayor a 30 %) en las cuatro unidades experimentales. Estos compuestos son hidrocarburos con estructuras moleculares sumamente complejas, conformados por diferentes proporciones de nitrógeno, azufre y oxígeno; se ha demostrado que su biodegradación es un proceso que ocurre en proporciones muy bajas, e incluso se reporta que no son susceptibles a la degradación microbiana (Pineda-Flores y Mesta-Howard, 2001).

8. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se demostró que el empleo de tratamientos que favorecen la desorción de hidrocarburos, incrementan significativamente la biodegradación. Todos los pretratamientos fisicoquímicos utilizados, favorecieron la biodegradación de hidrocarburos del petróleo e incrementaron las velocidades de degradación en comparación con un suelo sin pretratamiento.
- El incremento en la biodegradación de hidrocarburos en las biopilas pretratadas fisicoquímicamente puede atribuirse a un incremento en la biodisponibilidad de los contaminantes inicialmente sorbidos en el suelo. La menor degradación de hidrocarburos obtenida para la biopila sin pretratar, puede atribuirse a una baja biodisponibilidad de los contaminantes.
- Con base en la biodegradación de los hidrocarburos, los pretratamientos más eficientes después de 7 meses de composteo, fueron el electroquímico y el adicionado con surfactante, obteniéndose niveles de degradación de 48 y 46%, respectivamente.
- Antes de emplear un pretratamiento para la desorción de contaminantes en un suelo intemperizado, es indispensable reunir información o realizar investigación experimental acerca de la metodología técnica, ya que un mal manejo de ésta puede conducir a efectos contrarios a los esperados (inhibición de mecanismos de degradación de microorganismos nativos ó incremento en los niveles de contaminación con el uso de tolueno o surfactantes).
- El empleo de desechos orgánicos de fácil biodegradación como aditivos o agentes de volumen, resulta una alternativa económica y sencilla para favorecer la degradación de contaminantes orgánicos en suelos a través de procesos de composteo, ya que éstos mejoran las propiedades del sistema y aportan nutrientes para mantener activas las poblaciones microbianas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

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. Alexander, M. 1994. Biodegradation and bioremediation. *Academic Press*, San Diego. 302 pp.
3. Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.*, 45 (1): 180-209.
4. Bardi, L.; Mattei, A.; Steffan, S. y Marzona, M. 2000. Hydrocarbon degradation by a soil microbial population with β -cyclodextrin as surfactant to enhance bioavailability. *Enzyme Microbial Tech.* 27: 709–713.
5. Beaudin R., Caron R. F., Legros R., Ramsay J., Lawlor L. y Ramsay B. 1996. Cocomposting of weathered hydrocarbon-contaminated soil. *Compost Sci. Utilization*. 4: 37-45.
6. Bhairi, S.M. 2001. Detergents: a guide to the properties and uses of detergents in biological systems. Calbiochem-Novabiochem Corporation. 41 pp.
7. Birman, I. y Alexander, M. 1996. Optimizing biodegradation of phenanthrene dissolved in nonaqueous-phase liquids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45: 267-272.
8. Block, D. 2000. Acetone helps microbes remediate TNT-contaminated soil. *BioCycle*, 41 (8): 38-40.
9. Bosma, T.; Middeldorp, P.; Schraa, G. y Zehnder, A. 1997. Mass transfers limitation of biotransformation: Quantifying bioavailability. *Environ. Sci. Technol.* 31: 248-252.
10. Bossert, I. and Bartha, R. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystem. In: Petroleum Microbiology. Atlas, R. (Ed.). *Macmillan Publishing Co.* pp: 436-455.
11. Brinch, U.C.; Ekelund, F. and Jacobsen, C. 2002. Method for spiking soil samples with organic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (4): 1808 - 1816.
12. Catherine, A. P. y Luthy, R. 1993. Coal tars dissolution in water-miscible solvents: experiment evaluation. *Environ. Sci. Technol.* 27(13): 2831-2843.
13. Chaineau C.H., Morel J. L. y Oudot J. 1995. Microbial degradation in soil microcosmos of fuel oil hydrocarbons from drilling cuttings. *Environ. Sci. Technol.* 29: 1615-1621.
14. Chen, Ch. y Taylor, R. T. 1995. *Biotechnol. Bioeng.* 48: 614-624.
15. Chino, H. Tsuji, H. Ishikawa, Y. Matsubara, T. Al-awadhi, M. Talaat Balba, R. y Al-daher, 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. 249-256 pp.
16. Colombo, J. C.; Cabello M. y Arambarri, A.M. 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and ligninolytic fungi. *Environ. Pollution*. 94: 355-362.
17. 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.

18. De Jonge, H; Freijer, J.I.; Verstraten, J.M.; Westerveld, J. y Van der Wielen. 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 31 (3): 771 - 775
19. Dragun, J. 1988. "Microbial Degradation of Petroleum Products in soil" In Von Fahnstock, F.; Wickramanayake. 1998. Biopile design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils. *Battelle Press*. Editions. 163 pp.
20. Eweis, J.B.; Ergas, S.J.; Chang, D.P.Y y Schroeder, E.D. 1998. Bioremediation Principles. *WCB/McGraw-Hill*, Malaysia.
21. Fan, C.Y. y Krishnamurthy, S. 1995. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review. *Air Waste Manage. Assoc.* 45: 453-460.
22. Fan, C.Y. y Krishnamurthy, S. 2000. *J. Air Waste Manage.* 45:453-460
23. 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.
24. Gallegos-Martínez, M.; Gómez-Santos, A.; González-Cruz, L.; Montes de Oca-García, A.; Yáñez-Trujillo, L.; Zermeño-Eguía Lis, J. y Gutierrez-Rojas, M. 2000. *Water Sci. Technol.* 42, 377-384.
25. Garcia, 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.
26. Ghosh, M. M. 1997. Kinetic considerations in surfactant-enhanced bioavailability of soil-bound PAH. 1997. The Sixth International *in situ* and *on site* Bioremediation Symposium. *Battelle.* 2: 575-580.
27. Guerin, W. F y Boyd, S. A. 1992. Differential bioavailability of soil sorbed naphthalene to two bacterial species. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1142-1152.
28. Guha, S. y Jaffé, P. R. 1996. Bioavailability of hydrophobic compounds partitioned into the micellar phase of nonionic surfactants. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1382-1391.
29. Harbottle, M.J.; Sills, G.C.; Thompson, I.P. and Jackman, S.A. 2002. The use of electrokinetics to enhance the degradation of organic contaminants in soils. *University of Oxford.* <http://www-civil.eng.ox.ac.uk/research/44/electrokinetic.htm>.
30. Harms, H. y Zehnder, A. J. B. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 27-33.
31. Huertas, J; Duque, E; Marqués, S y Ramos J. 1998. Survival in soil of different toluene degrading *Pseudomonas strains* after solvent shock. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1): 38-42.
32. Iturbe-Argüelles, R; Flores-Torres, C; Chávez-López, C. y Roldán-Martín, A. 2002. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología III.* 1: 25-35.
33. Jackman, S.; Maini, G.; Sharman, A.K.; Sunderland, G. y Knowles, C.J. 2001. Electrokinetic movement and biodegradation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in silt soil. *Biotechnol. Bioeng.* 74 (1): 40-48.

34. Jiménez, I. Y. y Bartha, R., 1996. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2311-2316.
35. Jonge, H.; Freijer, J. I.; Verstraten, J. M. y Westerveld, J. 1997. Relation between bioavailability and fuel oil hydrocarbon composition in contaminated soils. *Environ. Sci. Technol.* 31: 771-775.
36. 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.
37. 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. *Biotechnol. Bioeng.* 57(2); 220-227.
38. Kueper, B; Pitts, M; Wyatt, K and Simpkin, T. 1997. Technology practices manual for surfactants and cosolvents. *United States Department of Defense*. <http://www.clu-in.org/PRODUCTS/AATDF/Toc.htm>.
39. Laha, S. y Luthy, R. G. 1992. Effects of nonionic surfactants on the solubilization and mineralization of phenanthrene in soil-Water systems. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 1367-1380.
40. Lageman, Pool, van Vulpen y Norris. 1995. *In situ* electro-bioreclamation in low-permeability soils. In: Applied Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons. Hinchee, R.E.; Kittel, J. A. y Reisinger, H. J. (Eds.). *Battelle Press*, Columbus, OH. pp: 287-292.
41. Laine, M. M. y Jorgensen, K. S. 1997. Effective and safe composting of chlorophenol-contaminated soil in pilot scale. *Environ. Sci. Technol.* 31: 371-378.
42. 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.
43. Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. 1998. Brock: *Biología de los Microorganismos*. *Prentice Hall*. Octava Edición. 1064 pp.
44. Maini, G; Sharman, AK; Knowles, CJ; Sunderland, G; Jackman, SA. 2000. Electrokinetic remediation of metals and organics from historically contaminated soil. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75 (8): 657-664
45. Majer, R. M; Pepper, I. L y Gerba, C. P. 1999. *Environmental Microbiology*. *Academic Press*. 2a Edición. 583 pp.
46. Martinez, E. y López, S. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*. 19(1): 9-17.
47. Miller, R. W y Donahue, R. L. 1995. *Soils in our environment*. *Prentice Hall*. 7a Edición. 649 pp.
48. Pack, W.J. 1997. *Electrokinetics as a Method of Contamination Remediation*. *Brigham Young University*. U.S.A.
49. Paillat, T; Moreau, E; Grimaud, P. O. y Touchard, G. 2000. Electrokinetic phenomena in porous media applied to soil decontamination. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, 7: 693-704.
50. Pineda-Flores, G. y Mesta-Howard, A.M. 2001. Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 43 (3): 143-150.

51. 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.
52. Potter, C. 1997. Biopile Treatment of Soils Contaminated With Hazardous Waste. *Seminar Series on Bioremediation of Hazardous Waste Sites: Practical Approaches to Implementation*. 10-1 -10-5.
53. Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soils. *Lewis Publishers*. USA.
54. Salanitro, J.; Dorn, P.; Huesemann, M.; Moore, K.; Rhodes, I.; Rice Jackson, L; Vipond, T.; Western, M. y Wisniewski, H. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31: 1769-1776
55. Schulz-Berendt V. y Poetzsch E. 1995. Large-scale experience with biological treatment of contaminated soil. En: *Applied Bioremediation of hydrocarbons*. Hinchee, R.E.; Kittel, J.A. y Reisinger, H.J. (Eds.). *Battelle Press*.
56. 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.
57. Starnecker, A. y Menner, M. 1996. Assessment of biodegradability of plastics under simulated composting conditions in a laboratory test system. *Int. Biodet. Biodeg.* 85-92.
58. Stelmack, P. L; Gray, M. R y Pickard, M. A. 1999. Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 163-168.
59. Thouand, G.; Bauda, P.; Oudot, J.; Kirsch, G.; Sutton, C. y Vidalie, J.F. 1999. Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula. *Can. J. Microbiol.* 45: 106-115.
60. UAM. 2001. Programa de investigación multidisciplinario: Estudios de tratabilidad para la remediación de suelos intemperizados contaminados con hidrocarburos.
61. Van Cauwenberghe, L. 1997. Electrokinetics. Technology evaluation reports TO-97-03. *GWRTAC E series*. USA. <http://www.gwrtac.org>
62. Van Deuren, J.; Wang, Z. y Ledbetter, J. 1997. Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. *Technology Innovation Office, EPA*. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.
63. Volkering, F., Breure, A. M., van Andel, J. G. y Rulkens, W. H. 1995. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1699-1705.
64. Von Fahnestock, F.; Wickramanayake Godage, B. Michael Major, W.R. y Dratzke, R.J. 1998. Biopile design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils. *Battelle Press*. Editions. 163 pp.
65. Zechendorf, B. 1999. Sustainable development: How can biotechnology contribute?. *Tibtech.*, 17: 219-225.