



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA**

INSTITUTO DE INGENIERÍA

**“COMPARACIÓN DE TÉCNICAS DE SANEAMIENTO EN  
UN SUELO CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS  
DEL PETRÓLEO DE TABASCO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN INGENIERÍA**

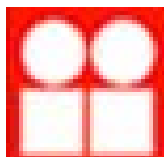
INGENIERÍA AMBIENTAL - SUELO Y AGUAS SUBTERRÁNEAS

P R E S E N T A:

**ISA DULCE OLIVA LEYVA CARDOSO**

TUTORA:

**DRA. ROSARIO ITURBE ARGÜELLES**



2006

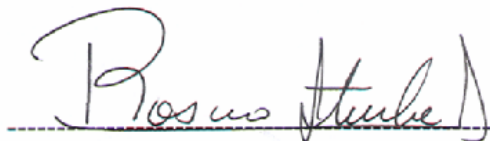
**JURADO ASIGNADO:**

Presidente: DR. SARASVATHI THANGARASU PANDIYAN  
Secretario: M. I. ANA ELISA SILVA MARTÍNEZ  
Vocal: DRA. ROSARIO ITURBE ARGÜELLES  
1<sup>er</sup>. Suplente: DRA. SILKE CRAM HEYDRICH  
2<sup>do</sup>. Suplente: DR. LUIS CARLOS FERNÁNDEZ LINARES

Lugar donde se realizó la tesis:  
INSTITUTO DE INGENIERÍA

**TUTORA DE TESIS:**

DRA. ROSARIO ITURBE ARGÜELLES

A handwritten signature in cursive script, reading "Rosario Iturbe", is written over a horizontal dashed line. The signature is in black ink and is positioned centrally below the printed name of the thesis supervisor.

## AGRADECIMIENTOS

A **CONACYT**, por otorgarme la beca de apoyo durante mis estudios de maestría.

Al **Instituto de Ingeniería de la UNAM**, por darme las facilidades de hacer uso de las instalaciones y equipos durante mi proyecto de tesis.

A mi tutora, **Dra. Rosario Iturbe Argüelles**, por el apoyo y confianza brindados en todo momento, y por compartir su conocimiento y experiencia profesional.

A los integrantes de mi jurado: **Dr. Sarasvathi Thangarasu Pandiyan, M. I. Ana Elisa Silva Martínez, Dra. Rosario Iturbe Argüelles, Dra. Silke Cram Heydrich y Dr. Luis Carlos Fernández Linares**, por sus valiosos comentarios y sugerencias para mejorar esta tesis.

Al **Dr. Luis G. Torres Bustillos** por el asesoramiento en el desarrollo y análisis de resultados de este trabajo. A la **Dra. Ma. Nefalí Rojas Valencia** por el apoyo en la identificación de bacterias del suelo. A la **M. I. Francis I. Soler Anguiano** por el asesoramiento en el análisis estadístico. Al **Ing. Carlos Flores Torres** quien diseñó y construyó el equipo de lavado mecánico.

A la **M. C. Guillermina Pérez Casimiro, M. I. Lilia Corona Ramírez, M. I. Yéssica López Olvera, M. I. Guadalupe Bautista Salazar, M. C. Isaura Yáñez Noguez, Dra. Lucy Mora Palomino, M. C. Kumiko Shimada Miyasaka e Ing. Luis Flores**, por el asesoramiento en las técnicas analíticas.

Al **Q.B.P. Leonardo García Hernández** y al **Sr. Ruperto Landeros Izquierdo** por su disposición y apoyo en la ubicación del derrame de petróleo crudo en Tabasco. Al **Ing. Daniel Flores Vázquez e Ing. Carlos Flores Vázquez** que colaboraron en el muestreo del suelo contaminado. Al **Ing. Jesús Flores Torres** y al **I.S.A. Alberto Villalobos Martínez** por su asesoría en la estimación de costos.

A la **M. C. Guadalupe Ponce Vélez, Dr. Alfonso V. Botello y Dr. Gabriel Nuñez Nogueira**, por sus sabios consejos y por compartir su conocimiento. Al **M. C. Antonio Trujillo Narcia, Dra. Ma. del Carmen Rivera Cruz y Biól. Rigoberto Hernández Monfort**, por el importante aporte de información.

A mis **compañeros del Laboratorio de Bioprocesos e Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería** que de alguna u otra forma también contribuyeron y compartieron conmigo agradables momentos: Q. Adriana Ramírez González, Dra. Rosa Ma. Flores Serrano, M. I. Alejandrina Castro Rodríguez, M. I. Patricia Montiel García, Ing. Eduardo Mendivil Blanco, I.Q. Diana Molina Vázquez, Mariana Climent Palmer, Gustavo Sampayo Reyes, I.Q. Julio Morales Mejía, I.A. Antonio Linares García, M. I. Jessica M. Domínguez Torres, I.B.I. Dulce M. Cid Leon, M. C. Jaime Pérez Trevilla, Ing. Juan Orozco Martínez y Pedro Trinidad Nicolas.

## DEDICATORIAS

A mi madre, **Margarita Cardoso Alcalá**, por su incomparable amor y cariño.

A quien comparte mis sueños e ilusiones en la vida, **Alberto Villalobos Martínez**.

A mis sobrinos **Emiliano Leyva Sánchez** y **Diana Yamilé León Jaime**, que me dan alegría y fortaleza para seguir superándome día a día.

A toda mi **familia y amigos** que en todo momento estuvieron apoyándome en las buenas y en las malas, especialmente a **Mario Leyva Álvarez, Mario Leyva Cardoso, Ma. Oliva Alcalá Domínguez, Marlen Ramírez González, Zaira B. López Arévalo** y **Josué Alvarado Tinoco**.

... Pero aquí abajo, abajo  
cada uno en su escondite  
hay hombres y mujeres  
que saben a qué asirse  
aprovechando el sol  
y también los eclipses  
apartando lo inútil  
y usando lo que sirve.  
Con su fe veterana  
el Sur también existe...

... Pero aquí abajo, abajo  
cerca de las raíces  
es donde la memoria  
ningún recuerdo omite  
y hay quienes se desmueren  
y hay quienes se desviven  
y así entre todos logran  
lo que era un imposible  
que todo el mundo sepa  
que el Sur,  
que el Sur también existe.

**Mario Benedetti - J. M. Serrat**

## ÍNDICE

	Pág.
<b>ÍNDICE</b>	<b>I</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XIII</b>
<b>NOMENCLATURA</b>	<b>XIV</b>
<b>I OBJETIVOS</b>	<b>1</b>
I.1 Objetivo general	1
I.2 Objetivos particulares	1
<b>II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>2</b>
II.1 Problemática ambiental de la industria petrolera en el estado de Tabasco	2
II.2 Características del petróleo crudo	7
II.3 Contaminación del suelo con petróleo crudo	10
II.4 Técnicas de saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos	11
II.4.1 Tratamientos térmicos	13
II.4.2 Tratamientos biológicos (biorremediación)	14
II.4.3 Tratamientos fisicoquímicos	25
II.5 Situación en México de la aplicación de las técnicas de saneamiento de suelos	31
II.6 Legislación en materia de remediación de suelos contaminados	34
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>38</b>



III.1 Muestreo de suelo	38
III.2 Caracterización física, química y biológica del suelo	42
III.3 Técnicas de saneamiento	45
III.3.1 Métodos biológicos	45
III.3.2 Métodos fisicoquímicos	49
III.4 Diseño de experimentos y análisis estadístico	56
III.4.1 Diseño en bloques completos al azar	57
III.5 Identificación de bacterias	59
<b>IV RESULTADOS</b>	<b>62</b>
IV.1 Caracterización física, química y biológica del suelo	62
IV.2 Variables de respuesta	66
IV.2.1 Métodos biológicos	66
IV.2.2 Métodos fisicoquímicos	77
<b>V ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>87</b>
V.1 Métodos biológicos a escala de laboratorio y consideraciones para el escalamiento en campo	87
V.2 Métodos fisicoquímicos a escala de laboratorio y consideraciones para el escalamiento en campo	96
V.2.1 Lavado de suelo por inundación	97
V.2.2 Lavado de suelo mecánico	101
V.3 Análisis técnico-económico	104
V.3.1 Biolabranza	105
V.3.2 Lavado de suelo mecánico con tensoactivo en estanques	107



---

<b>VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>110</b>
VI.1 Conclusiones	110
VI.2 Recomendaciones	112
<b>VII ANEXOS</b>	<b>114</b>
VII.1 Descripción ambiental del campo petrolero Cinco Presidentes	114
VII.2 Identificación de bacterias	119
VII.2.1 Selección y purificación de colonias bacterianas	119
VII.2.2 Bacterias Gram positivas (BBL Crystal Rapid Gram-positive ID System)	120
VII.2.3 Bacterias Gram negativas (API20E)	123
VII.3 Resultados de las variables de respuesta (2 réplicas)	127
VII.4 Determinación del CO <sub>2</sub> acumulado total en los tratamientos biológicos	130
<b>VIII REFERENCIAS</b>	<b>133</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla II.1. Instalaciones petroleras en el estado de Tabasco (PARS, 2000).	3
Tabla II.2. Clasificación del petróleo (IMP, 2006).	8
Tabla II.3. Composición química del petróleo crudo del Golfo de México (Dorn <i>et al.</i> , 1998 citado en Rivera, 2001).	9
Tabla II.4. Variedades del petróleo crudo de México (IMP, 2006).	10
Tabla II.5. Técnicas de remediación de suelos.	13
Tabla III.1. Parámetros físicos, químicos y biológicos del suelo.	43
Tabla III.2. Condiciones experimentales de los tratamientos biológicos.	45
Tabla III.3. Condiciones experimentales de los tratamientos fisicoquímicos.	50
Tabla III.4. Análisis de varianza para un diseño en bloques completos al azar con réplicas (Kuehl, 2001).	58
Tabla IV.1. Caracterización física, química y biológica del suelo en estudio.	64
Tabla IV.2. Hidrocarburos del petróleo del suelo en estudio (mg/kg).	65
Tabla IV.3. Tasas de remoción (mg/kg día) de tratamientos biológicos.	68
Tabla IV.4. Tiempo estimado de remediación de acuerdo con las cinéticas de remoción de tratamientos biológicos.	69
Tabla IV.5. CO <sub>2</sub> generado total medido (mg CO <sub>2</sub> ) en tratamientos biológicos.	72
Tabla IV.6. CO <sub>2</sub> generado total estimado (mg CO <sub>2</sub> ) en tratamientos biológicos.	73
Tabla IV.7. HTP removidos del suelo (mg HTP) en tratamientos biológicos.	73
Tabla IV.8. Especies de bacterias identificadas en los tratamientos biológicos.	76
Tabla IV.9. Eficiencia de remoción de HTP (%) en lavado de suelo por inundación (valores promedio de dos réplicas).	78

Tabla IV.10. Eficiencias parciales y totales en lavado de suelo por inundación (g HTP/g tensoactivo).	78
Tabla IV.11. Eficiencias parciales y totales en lavado de suelo mecánico (g HTP/g tensoactivo).	80
Tabla IV.12. Número de ciclos de lavado de acuerdo a la cinética de remoción en lavado de suelo mecánico.	82
Tabla V.1. Tensoactivos no iónicos utilizados para el lavado de suelo (Torres <i>et al.</i> , 2003).	96
Tabla V.2. Actividades para llevar a cabo la biolabranza.	106
Tabla V.3. Actividades para llevar a cabo el lavado de suelo mecánico con tensoactivo en estanques.	108
Tabla V.4. Costos de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.	109
Tabla VII.1. Flora maderable en algún estatus de vulnerabilidad de los campos petroleros Cinco Presidentes, La Venta (Norte) y Rodador según NOM-059-ECOL-1994 (CP, 1999).	118
Tabla VII.2. Concentración de HTP en suelo (mg/kg) en cada unidad experimental de los tratamientos biológicos.	127
Tabla VII.3. Cantidad de CO <sub>2</sub> generado (mg CO <sub>2</sub> /kg hr) en cada unidad experimental de los tratamientos biológicos.	127
Tabla VII.4. Cantidad de bacterias aerobias (UFC/g) en cada unidad experimental de los tratamientos biológicos.	128
Tabla VII.5. Concentración de HTP en suelo (mg/kg) en cada unidad experimental de lavado de suelo por inundación.	128
Tabla VII.6. Concentración de HTP en el efluente (mg/L) en cada unidad experimental de lavado de suelo por inundación.	128
Tabla VII.7. Concentración de HTP en suelo (mg/kg) en cada unidad experimental de lavado de suelo mecánico.	129
Tabla VII.8. Concentración de HTP en el efluente (mg/L) en cada unidad experimental de lavado de suelo mecánico.	129
Tabla VII.9. Coeficientes de regresión lineal entre CO <sub>2</sub> generado acumulado y tiempo.	130
Tabla VII.10. Estimación del CO <sub>2</sub> acumulado total (mg CO <sub>2</sub> /kg) en tratamientos biológicos durante 140 días.	131

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura II.1. Activo Cinco Presidentes (antes Distrito de Agua Dulce), Tabasco.	5
Figura II.2. Pozos petroleros terrestres y lacustres del campo petrolero Cinco Presidentes.	7
Figura II.3. Rutas de biodegradación aerobia de hidrocarburos: A) alifáticos y B) aromáticos (Aboul-Kassim y Simoneit, 2001).	17
Figura II.4. Contaminantes del suelo tratados por empresas autorizadas en México (SEMARNAT, 2006).	32
Figura II.5. Técnicas de remediación de suelos utilizadas por empresas autorizadas en México (SEMARNAT, 2006).	32
Figura III.1. Derrame en pozo Sánchez Magallanes No. 212, 50 m al sur, Col. La Trinidad, Cárdenas, Tabasco.	38
Figura III.2. Trabajos de restauración en el derrame del pozo Sánchez Magallanes No. 214, a 200 m al noreste de la Batería de separación Sánchez Magallanes 3, Col. La Trinidad, Cárdenas, Tabasco.	39
Figura III.3. Derrame en pozo Rodador No. 4, a 200 m al sureste de la Batería de separación Rodador, Col. El Pailebot, Cárdenas, Tabasco.	39
Figura III.4. Muestreo de suelo contaminado, cerca del pozo 159 del campo petrolero Cinco Presidentes, Ejido Ley Federal de la Reforma Agraria, Cárdenas, Tabasco.	40
Figura III.5. Suelo y agua subterránea contaminados con petróleo crudo (1 m de profundidad).	41
Figura III.6. Suelo contaminado para experimentación.	41
Figura III.7. Mezclado de suelo (250 kg peso húmedo).	42
Figura III.8. Hidrofobicidad del suelo: A) charco de agua en suelo y B) grumos de suelo en agua.	44
Figura III.9. Unidades experimentales de tratamientos biológicos (atenuación natural, biorremediación con nutrientes y biorremediación con nutrientes-tensoactivo).	46
Figura III.10. Determinación de bacterias aerobias por cuenta en placa (NOM-110-SSA1-1994 y NOM-092-SSA1-1994).	48
Figura III.11. Determinación de la actividad microbiana por respirometría (CO <sub>2</sub> ) (Alef, 1998).	48



Figura III.12. Unidades experimentales de tratamientos fisicoquímicos (lavado de suelo por inundación y lavado mecánico).	50
Figura III.13. Lavado de suelo por inundación.	52
Figura III.14. Mezcladora mecánica para lavado de suelo (escala laboratorio: 10 L de capacidad).	53
Figura III.15. Lavado de suelo mecánico con tensoactivo.	54
Figura III.16. Drenado del efluente en el lavado de suelo mecánico.	55
Figura III.17. Incrustación del petróleo en la mezcladora mecánica al utilizar el tensoactivo TW80 1%.	55
Figura III.18. Selección y purificación de colonias bacterianas.	59
Figura III.19. Tinción de Gram y morfología celular: A) bacilos Gram negativos, B) cocos Gram positivos.	60
Figura III.20. Identificación de bacterias por medio del método BBL Crystal.	60
Figura III.21. Identificación de bacterias por medio del método API20E.	61
Figura IV.1. Concentración de HTP en suelo de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).	67
Figura IV.2. Eficiencia de remoción de HTP (%) de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).	67
Figura IV.3. Cinéticas de remoción de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).	68
Figura IV.4. Actividad microbiana por respirometría (CO <sub>2</sub> ) de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).	70
Figura IV.5. CO <sub>2</sub> acumulado medido (mg CO <sub>2</sub> /kg) en tratamientos biológicos.	71
Figura IV.6. CO <sub>2</sub> acumulado total estimado (mg CO <sub>2</sub> /kg) en tratamientos biológicos.	72
Figura IV.7. Correlación entre la cantidad de HTP removidos y la cantidad de CO <sub>2</sub> generado (medido y estimado) en atenuación natural.	73
Figura IV.8. Correlación entre la cantidad de HTP removidos y la cantidad de CO <sub>2</sub> generado (medido y estimado) en biorremediación con nutrimentos.	74
Figura IV.9. Correlación entre la cantidad de HTP removidos y la cantidad de CO <sub>2</sub> generado (medido y estimado) en biorremediación con nutrimentos-tensoactivo.	74

Figura IV.10. Bacterias aerobias en suelo (log UFC/g) de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).	75
Figura IV.11. Concentración de HTP en el suelo en lavado de suelo por inundación (valores promedio de dos réplicas).	77
Figura IV.12. Concentración de HTP en el suelo en lavado de suelo mecánico (valores promedio de dos réplicas).	79
Figura IV.13. Eficiencia de remoción de HTP (%) en lavado de suelo mecánico (valores promedio de dos réplicas).	80
Figura IV.14. Cinética de remoción en lavado de suelo mecánico (valores promedio de dos réplicas).	82
Figura IV.15. Concentración de HTP en el efluente (agua de enjuague) en lavado de suelo por inundación (valores promedio de dos réplicas).	84
Figura IV.16. Efluentes (agua de enjuague) de lavado de suelo por inundación con: A) Agua, B) TW80 1% y C) EW600 1%.	84
Figura IV.17. Concentración de HTP en el efluente (agua de enjuague) en lavado de suelo mecánico (valores promedio de dos réplicas).	85
Figura IV.18. Efluentes de lavado de suelo mecánico con: A) solución de lavado EW600 1% y B) agua de enjuague.	85
Figura V.1. Valores porcentuales de partículas del suelo con dos metodologías (granulometría y textura).	98
Figura VII.1. Unidades de suelo en los campos petroleros Cinco Presidentes y La Venta (Norte) (CP,1999).	116
Figura VII.2. Plantilla de reacciones de color BBL.	122
Figura VII.3. Hoja de resultados BBL.	122
Figura VII.4. Hoja de resultados API20E.	125
Figura VII.5. Tabla de lectura API20E.	126

## INTRODUCCIÓN

Las emergencias ambientales por derrames de hidrocarburos de 1993 al 2001 en Tabasco sumaron un total de 919, siendo el Activo Cinco Presidentes el que presentó el mayor número de casos, 348. Esto se confirma con el hecho de que precisamente los municipios de Cárdenas y Huimanguillo, donde se ubica este Activo, ocupan respectivamente el primero y segundo lugar del estado donde se registran el mayor número de emergencias ambientales, seguidos de Cunduacán y Comalcalco (García y García, 2003). De los ocho campos petroleros principales que conforman el Activo, el que presenta mayor número de derrames por falta de mantenimiento y alto grado de corrosión de los ductos, así como por las condiciones ambientales naturales (inundación la mayor parte del año) e inducidas (desviación de causas naturales para construir caminos de acceso a pozos), es el campo petrolero Cinco Presidentes que data de los años 50's (González, 1995; Adams *et al.*, 1999; Rivera, 2004a).

Las técnicas de saneamiento o remediación de suelos contaminados se pueden dividir en: biológicas, fisicoquímicas y térmicas, varias de ellas se pueden aplicar *in situ* o fuera del sitio para remediar suelos contaminados con petróleo crudo o sus derivados (gasolina, diesel, turbosina, keroseno, combustóleo, creosota, u otros). La selección de una tecnología de remediación básicamente depende de los siguientes factores: características fisicoquímicas del contaminante, tipo de suelo y propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo, condiciones ambientales del sitio impactado, tiempo de tratamiento y costo.

La bioestimulación es una técnica de remediación de tipo biológica que se puede llevar a cabo tanto *in situ* como fuera del sitio, y consiste en adicionar al suelo contaminado soluciones acuosas que contengan nutrientes, u otros coadyuvantes como tensoactivos por ejemplo, para estimular la actividad de los microorganismos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos (Van Deuren *et al.*, 2002). Se han probado varias relaciones C:N:P (Zegarra, 2000), una de las más aceptadas es la relación 100:10:1 considerando como única fuente de carbono el 80% de los hidrocarburos (Fahnestock *et al.*, 1998). De acuerdo con Margesin *et al.* (2000) la adición de macronutrientes mejora la biodegradación independientemente de la fuente de nitrógeno y fósforo. En cuanto a la adición de tensoactivos, en varios estudios se ha



reportado que mejoran la biodegradación de hidrocarburos debido a que los hace más biodisponibles a los microorganismos (Mata *et al.*, 2000, Corona e Iturbe, 2005; Kim *et al.*, 2005; Molina, 2006).

El lavado de suelo es una técnica de remediación de tipo fisicoquímico y se puede realizar *in situ* (soil flushing) o fuera del sitio (soil washing). Consiste en el uso de soluciones de lavado que contienen aditivos que sirven para incrementar la movilidad y/o solubilidad de los contaminantes. En el caso de compuestos orgánicos hidrofóbicos como los hidrocarburos del petróleo se utilizan tensoactivos (Roote, 1997). Se han probado diferentes tipos de tensoactivos iónicos y no iónicos (Rosen, 1989; Jafvert, 1996; Torres *et al.*, 2005a), un parámetro muy importante para seleccionar la concentración del tensoactivo es la Concentración Micelar Crítica (CMC) (Zheng y Obbard, 2002).

De acuerdo con Adams *et al.* (1999), algunas de las empresas que están saneando sitios en el sureste mexicano usan su experiencia empírica ganada en otros lugares cuyas características parecen similares, en vez de realizar las pruebas de tratabilidad correspondientes. La repercusión de esto es que se presentan problemas en la aplicación de la biorremediación, los cuales generalmente se deben a la falta de experiencia en el manejo de materiales con altas concentraciones de materia orgánica o arcilla, concentraciones de hidrocarburos muy altas, y condiciones climáticas tropicales (sobre todo la alta precipitación); como consecuencia, es común que no se logren disminuir las concentraciones de hidrocarburos hasta el nivel especificado por contrato, y/o que se atrasen los proyectos hasta 50% o más. Los factores antes mencionados también pueden influir en las técnicas de saneamiento de tipo fisicoquímico y térmico, por lo tanto, las pruebas de tratabilidad son imprescindibles para cada caso en particular.

La meta de un estudio de tratabilidad, es establecer anticipadamente que el proceso propuesto para la remediación de un suelo contaminado podría ser aplicable de acuerdo a las características propias del sitio en estudio. Esto incluye la caracterización del suelo a partir de sus parámetros físicos, químicos y microbiológicos, y la optimización del proceso para alcanzar los niveles de limpieza requeridos en el tiempo más corto; para lo cual se analiza en función del tiempo la reducción en la concentración del contaminante en una serie de tratamientos





propuestos a escala de laboratorio, incluyendo un control. Si los resultados del tratamiento seleccionado son técnicamente factibles, se procede posteriormente al análisis económico (Nelson *et al.*, 1994).

Por lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se propone realizar pruebas de tratabilidad tanto para la técnica de bioestimulación como de la técnica de lavado de suelo (en dos modalidades: por inundación y mecánico), para el tratamiento de un suelo contaminado con petróleo crudo del campo petrolero Cinco Presidentes, Tabasco, con el fin de seleccionar la más apropiada.



## RESUMEN

El objetivo del estudio fue establecer la eficiencia de remoción de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) de técnicas de saneamiento biológico y fisicoquímico, en un suelo contaminado con petróleo crudo del campo petrolero Cinco Presidentes, Tabasco. Se hizo la caracterización física, química y biológica del suelo. Los tratamientos biológicos fueron tres: atenuación natural, biorremediación con nutrientes y biorremediación con nutrientes-tensoactivo; los tratamientos fisicoquímicos fueron seis: lavado de suelo por inundación con agua, TW80 1% y EW600 1%, y lavado de suelo mecánico con agua, TW80 1% y EW600 1%. En los tratamientos biológicos se determinó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre ellos; se identificaron cinco bacterias degradadoras de hidrocarburos, y se obtuvo correlación lineal entre la cantidad de HTP removidos y el dióxido de carbono acumulado. En los tratamientos fisicoquímicos se comprobó que el lavado de suelo mecánico es más eficiente que por inundación, independientemente de la solución de lavado que se utilice. De las tres soluciones de lavado, la que presentó mejores eficiencias de remoción fue EW600 1%, seguido de TW80 1% y agua, en ambas modalidades de lavado; sin embargo, en el lavado mecánico no hubo diferencias significativas entre una u otra, a diferencia del lavado por inundación donde la mejor fue EW600 1%. Se seleccionaron los tratamientos biorremediación con nutrientes-tensoactivo y lavado de suelo mecánico con EW600 1% para hacer un análisis técnico-económico de su escalamiento en campo, el cual indicó mayores ventajas de la biolabranza con respecto al lavado de suelo en estanques.

## ABSTRACT

The aim of this study was to establish the removal efficiency of Total Petroleum Hydrocarbons (TPH) by biological and physicochemical remediation techniques, in a soil contaminated with crude oil from Cinco Presidentes oil field, Tabasco. A physical, chemical and biological characterization of the soil was accomplished. The biological treatments were three: natural attenuation, bioremediation with nutrients and bioremediation with nutrients-surfactant; there were six physicochemical treatments: soil washing by flood with water, TW80 1% and EW600 1%, and mechanical soil washing with water, TW80 1% and EW600 1%. It was determined that there were no significant statistical differences among the biological treatments; five hydrocarbon degrading bacteria were identified, and significant lineal correlation between the amount of TPH removed and carbon dioxide accumulated was observed. In the case of physicochemical treatments, it was verified that independently of the washing solution used, the mechanical washing treatment is more efficient than flooding. From the three washing solutions, the one that rendered the best removal efficiency was EW600 1%, followed of TW80 1% and water, in both washing modalities; nevertheless, in the mechanical washing there were not significant differences among them, unlike the washing by flooding in which the best was EW600 1%. The bioremediation with nutrient-surfactant and mechanical soil washing with EW600 1% treatments were selected to accomplish a technical and economical analysis of their full scale implementation. This evaluation indicated more advantages for landfarming than soil washing in tanks.

## NOMENCLATURA

BTEX: Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno

CIMADES: Comisión Interinstitucional para el Medio Ambiente y el Desarrollo Social (de Tabasco)

CMC: Concentración Micelar Crítica

COATEA: Centro de Orientación para la Atención de Emergencias Ambientales

DNAPL: por sus siglas en inglés Dense Non Aqueous Phase Liquid (líquido denso en fase no acuosa)

EW600: emulgín 600 (tensoactivo)

HAP: Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares

HLB: por sus siglas en inglés Hydrophile Lipophile Balance (Balance Hidófilo Lipófilo)

HTP: Hidrocarburos Totales del Petróleo

IMP: Instituto Mexicano del Petróleo

LMP: Límite(s) Máximo(s) Permisible(s)

LGEEPA: Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente

LPGGIR: Ley General para la Prevención y Gestión Integral de Residuos

mbd: miles de barriles diarios

mg/kg: miligramos por kilogramo

mg/L: miligramos por litro

NOM: Norma(s) Oficial(es) Mexicana(s)

PEMEX: Petróleos Mexicanos

PEP: Pemex Exploración y Producción

PROFEPA: Procuraduría Federal de Protección al Ambiente

PR: Pemex Refinación

SEMARNAT: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

TPH: Total Petroleum Hydrocarbons

TSA: Agar Soya Tripticaseína (medio de cultivo)

TW80: tween 80 (tensoactivo)

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

USD: dólar estadounidense



## **I OBJETIVOS**

---

### **I.1 Objetivo general**

Seleccionar una técnica de remediación apropiada ya sea de tipo biológico o fisicoquímico para el tratamiento de un suelo contaminado con petróleo crudo del campo petrolero Cinco Presidentes, Tabasco.

### **I.2 Objetivos particulares**

1. Establecer la eficiencia de remoción de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) de técnicas de saneamiento de tipo biológico a nivel laboratorio: atenuación natural, biorremediación con nutrimentos y biorremediación con nutrimentos-tensoactivo.
2. Establecer la eficiencia de remoción de HTP de técnicas de saneamiento de tipo fisicoquímico a nivel laboratorio: lavado de suelo con tres soluciones de lavado (agua y dos tensoactivos no iónicos), mediante un método mecánico así como por inundación.
3. Seleccionar entre los métodos biológicos y fisicoquímicos la mejor técnica de saneamiento desde el punto de vista técnico y económico.
4. Determinar en los métodos biológicos si existe relación entre la remoción de HTP y generación de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>).

## II REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

### II.1 Problemática ambiental de la industria petrolera en el estado de Tabasco

La expansión y desarrollo de la industria petrolera en México ha causado graves problemas ambientales, algunos de ellos como resultado de emergencias ambientales con graves repercusiones a la salud de la población y al ambiente. Según datos de COATEA-PROFEPA, en los estados de Tabasco, Veracruz, Campeche, Chiapas, Guanajuato y Coahuila se presentaron más del 50% de las emergencias ambientales de 1993 a 2002, concentrándose en Tabasco alrededor del 20% del total a nivel nacional. Esto se debe a que, con excepción de Guanajuato y Coahuila, en ellos se concentra la mayor actividad petrolera que provoca un gran movimiento de crudo y sus derivados. Es importante destacar que el 85% de estos eventos están constituidos por derrames; lo cual reviste especial importancia desde el punto de vista ambiental, ya que en general los productos derramados afectan al suelo y posiblemente al subsuelo, aguas subterráneas y cuerpos de agua superficiales. En cuanto a las sustancias involucradas en el período de 1996 a 2002, el 70% estuvo relacionado con hidrocarburos, y particularmente el 42% con petróleo crudo (Sarmiento *et al.*, 2003).

Los derrames accidentales de hidrocarburos se pueden originar en las instalaciones petroleras durante las actividades de exploración, transformación, comercialización y transporte de petróleo y sus derivados. Se pueden presentar en tierra, en aguas continentales o en el mar (González, 1995). Petróleos Mexicanos (PEMEX) es la única empresa responsable del proceso de exploración, explotación y transformación del petróleo en México, por lo cual no es de extrañarse que en ésta hayan ocurrido el 57% de las emergencias ambientales a nivel nacional de 1997 a 2001, de las cuales el 90% ocurrieron en Pemex Exploración y Producción (PEP) y Pemex Refinación (PR), sobre todo en Tabasco, Veracruz y Campeche (PROFEPA, 2001).

El estado de Tabasco forma parte de la zona petrolera continental más importante del país (PEMEX, 2006). Actualmente la industria petrolera en dicho estado se localiza en 13 de sus 17 municipios: Cárdenas, Centla, Centro, Comalcalco, Cunduacán, Huimanguillo, Jalapa, Jalpa de Méndez, Jonuta, Macuspana, Nacajuca, Paraíso y Teapa. En general se estima que 26,894 ha son ocupadas físicamente por

instalaciones petroleras, destacando que existen 84 campos petroleros (González, 1995), 896 pozos en operación y 8,113 Km de tuberías (PARS, 2000) (Tabla II.1). Pemex Exploración y Producción Región Sur está a cargo de la administración y operación de los cinco activos integrales: Cinco Presidentes, Bellota-Jujo, Samaria-Luna, Macuspana y Muspac (PEMEX, 2006), todos ellos se ubican principalmente en territorio tabasqueño. Las actividades petroleras que se realizan en este estado son la perforación de pozos para la explotación de los yacimientos de hidrocarburos, procesamiento primario de éstos en baterías de separación, deshidratadoras, estaciones de compresoras, y petroquímica básica (CP, 1999).

**Tabla II.1. Instalaciones petroleras en el estado de Tabasco (PARS, 2000).**

<b>Tipo de instalación</b>	<b>Número de instalaciones</b>
Baterías de separación	48
Plantas deshidratadoras	3
Centrales de almacenamiento y bombeo	1
Estaciones de rebombeo	1
Estaciones de compresión de gas	24
Plantas de inyección de agua	7
Estaciones de recolección	17
Complejos procesadores de gas	3
Pozos en operación	896
Red de tuberías (Km)	8,113

Desde el punto de vista económico, el auge petrolero inicia en la década de los años 50's, con el descubrimiento y explotación del primer campo petrolero y el establecimiento de ciudad PEMEX en el municipio de Macuspana; ya a finales de ese decenio Tabasco se había convertido en importante productor de petróleo y gas natural. Para 1998, en la entidad, PEMEX tuvo una producción de petróleo crudo de 200,367.1 barriles, lo que representó 17.9% del total nacional; mientras que la producción de gas natural, para ese mismo año, fue de 499,293 millones de pies cúbicos, lo que representó 28.6% del total nacional; en ambos casos, la producción de Tabasco, solo es superada por la obtenida en las plataformas marinas de las aguas

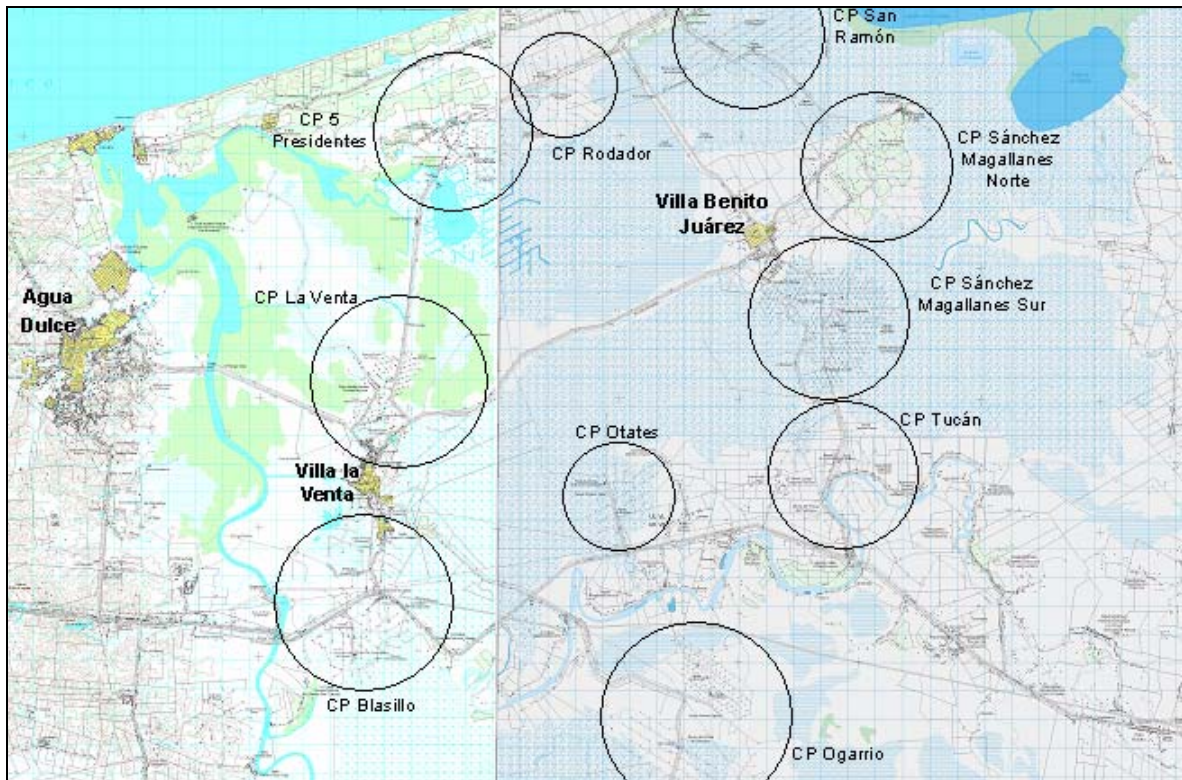
territoriales del país (INEGI, 2001). Sin embargo, paralelamente al crecimiento de la industria petrolera en Tabasco a partir de la década de 1950, pero sobre todo a partir de 1973 con el descubrimiento y aprovechamiento de los grandes yacimientos de hidrocarburos de las áreas Comalcalco-Terciario, Comalcalco-Cretácico y Mesozóico-Tabasco-Chiapas, localizados en los municipios Comalcalco y Cunduacán, surgieron numerosos desequilibrios sociales, económicos y ambientales. Para el caso de las alteraciones ambientales sucedieron y continúan sucediendo derrames de hidrocarburos por rotura de tuberías, dispersión de los derrames crónicos, derrames de aguas residuales provenientes de los procesos de separación realizados en las instalaciones petroleras, e incluso derrames de los lodos de perforación y de labores de mantenimiento mayor de los pozos petroleros (González, 1995).

Según García y García (2003), las emergencias ambientales por derrames de hidrocarburos de 1993 al 2001 en Tabasco sumaron un total de 919, siendo el Activo Cinco Presidentes el que presentó el mayor número de casos (348), siguiendo en orden de importancia los Activos Samaria Sitio-Grande (229) y Bellota Chinchorro (181). Esto se puede atribuir a que las instalaciones del Activo Cinco Presidentes, presentan un alto grado de deterioro por corrosión, ya que éstas datan de más de 50 años, además de que se ubican en una zona donde la mayor parte del año se encuentra inundada. En un estudio realizado por CIMADES (2001), se detectaron 39 áreas afectadas por derrames de hidrocarburos, sumando una superficie de 92 ha aproximadamente.

El Activo Cinco Presidentes (antes Distrito de Agua Dulce) se encuentra en la parte Noroeste de Tabasco, comprende parte de los municipios de Huimanguillo y Cárdenas, tiene un área de influencia aproximadamente de 598 Km<sup>2</sup> que se enmarcan entre los 18° 00' y 18° 15' latitud Norte y los 93° 43' y 94° 01' longitud Oeste. Está integrado por 8 campos petroleros principales: La Venta, Blasillo, Otates, Ogarrio, Sánchez Magallanes (Norte y Sur), San Ramón, Rodador y Cinco Presidentes (CODEZPET, 1989) y otros menos importantes como Tucán y Pajonal (Olán, 2000) (Figura II.1).







CP: campo petrolero

Escala 1:50,000

**Figura II.1. Activo Cinco Presidentes (antes Distrito de Agua Dulce), Tabasco.**

Varios estudios confirman el alto impacto ambiental que han ocasionado los derrames de petróleo crudo en el Activo Cinco Presientes, pero especialmente en el campo petrolero Cinco Presidentes afectando suelo, agua superficial y subterránea, biota y actividades productivas (CODEZPET, 1989; González, 1995; Elías *et al.*, 1996; CIMADES, 1997; CP, 1999; PARS, 1999a; PARS, 1999b; PARS, 2000; Olán, 2000; CIMADES, 2001; Ortiz, 2001; Salazar, 2002; Bolaynas, 2003; García y García, 2003; Cram *et al.*, 2004).

El campo petrolero Cinco Presidentes se localiza dentro de los 18° 13' 36" de latitud Norte y los 94° 1' 36" de longitud Oeste, en la porción Noroeste del estado de Tabasco, abarcando parte de los ejidos Aquiles Serdán y Arrozal así como los cuerpos de agua denominados río Chicozapote y laguna El Yucateco en el municipio de Huimanguillo; en el municipio de Cárdenas comprende parte del ejido Ley Federal de la Reforma Agraria y Colonia El Pailebot, cubriendo aproximadamente 3,000 ha de las

cuales dos terceras partes son ocupadas por pozos lacustres. Este campo petrolero comenzó su desarrollo a finales de la década de los años 50's, en sus inicios todo el equipo se movilizó por vía fluvial (barcos, barcazas) y aérea. La expansión del campo se fincó en dos etapas: terrestre y lacustre (dentro de la laguna El Yucateco). En el área lacustre los trabajos se realizaron dragando en los pantanos un sistema de 41 drenes, los cuales alteraron drásticamente el escurrimiento natural así como importantes áreas de manglar. Se perforaron 101 pozos lacustres y los desechos generados en la etapa de perforación no contaron con ningún tratamiento y se depositaron directamente a los canales lacustres impactando a los recursos naturales vegetales y acuáticos de la zona. Hoy en día, la actividad que se realiza en este campo petrolero es mínima, ya que del total de los 321 pozos que fueron activos, para 1994 solo estaban en producción en la zona terrestre un total de 59 pozos y en la zona lacustre un total de 9 pozos. La producción del hidrocarburo se conduce por una intrincada red de ductos hacia las cuatro baterías de separación primaria que se encargan de separar el crudo del gas, y este último se procesa en dos compresoras, enviando los hidrocarburos a la Unidad Petroquímica La Venta, adicionalmente a estas instalaciones, existe una planta de inyección de agua. El crudo producido en los pozos del campo es del tipo ceroso con 31 a 32° API (ligero o ltsmo) (CIMADES, 1997) (Figura II.2). En el Anexo VII.1 se hace una descripción de la hidrología, geología, fisiografía, tipos de suelos, clima, vegetación y actividades productivas del campo petrolero Cinco Presidentes.

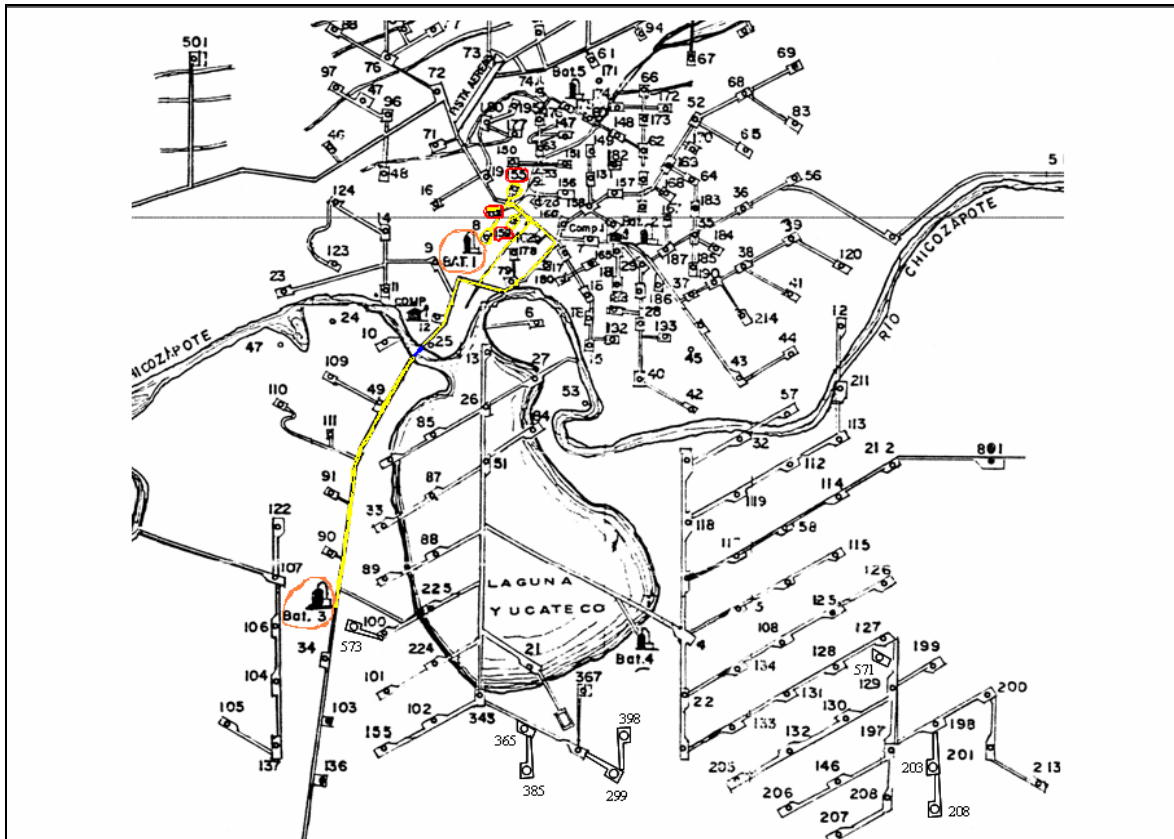


Figura II.2. Pozos petroleros terrestres y lacustres del campo petrolero Cinco Presidentes.

## II.2 Características del petróleo crudo

El petróleo crudo es una mezcla extremadamente compleja de compuestos orgánicos principalmente, de los cuales los hidrocarburos son los más abundantes (más del 85%). Presenta los tres estados físicos de la materia: sólido, líquido y gas, según su composición, temperatura y presión a la que se encuentre. El color varía entre el ámbar y el negro, la densidad es menor que la del agua (PEMEX, 1980).

En cuanto a su composición, las cadenas lineales de carbono asociadas a hidrógeno, constituyen las parafinas; cuando las cadenas son ramificadas se tienen las isoparafinas; al presentarse dobles enlaces entre los átomos de carbono se forman las olefinas; las moléculas que forman ciclos de carbono son los naftenos, y cuando estos ciclos presentan dobles enlaces (anillo bencénico) se tiene la familia de los aromáticos, ya sean monoaromáticos como por ejemplo Benceno, Tolueno,

Etilbenceno y Xileno (BTEX) o poliaromáticos como son benzo(a)pireno, antraceno y naftaleno (HAP: Hidrocarburos Aromáticos Polinucleares). Además, hay hidrocarburos con presencia de azufre, nitrógeno y oxígeno formando familias bien caracterizadas que pertenecen a los compuestos polares, y un contenido menor de otros elementos como metales pesados. Al aumentar el peso molecular de los hidrocarburos las estructuras se hacen más complejas y difíciles de identificar químicamente con precisión (IMP, 2006). Es importante resaltar que varios de los componentes del petróleo son tóxicos y cancerígenos, como los BTEX, HAP y asfaltenos (IARC, 2002).

La industria mundial de hidrocarburos líquidos clasifica al petróleo crudo de acuerdo con su densidad API (parámetro internacional del Instituto Americano del Petróleo, que diferencia las calidades de crudo) en: extrapesado, pesado, mediano, ligero y superligero (Tabla II.2) (IMP, 2006). Lo cual está asociado a los contenidos de las diferentes fracciones de hidrocarburos, por ejemplo, el petróleo ligero tiene contenidos grandes de hidrocarburos saturados y contenidos bajos de compuestos polares. El petróleo mediano tiene menos hidrocarburos saturados y mayor concentración de compuestos polares, esto determina que el petróleo ligero sea más tóxico que el mediano y se degrada más rápido (Tabla II.3) (Dorn *et al.*, 1998 citado en Rivera, 2001).

**Tabla II.2. Clasificación del petróleo (IMP, 2006).**

<b>Aceite crudo</b>	<b>Densidad (g/cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Densidad grados API</b>
Extrapesado	>1.00	10.00
Pesado	1.00 - 0.92	10.00 - 22.30
Mediano	0.92 - 0.87	22.30 - 31.10
Ligero	0.87 - 0.83	31.10 – 39.00
Superligero	< 0.83	> 39.00

**Tabla II.3. Composición química del petróleo crudo del Golfo de México (Dorn *et al.*, 1998 citado en Rivera, 2001).**

Composición	Crudo ligero	Crudo mediano
Saturado (% peso)	86.7	56.4
Aromático (% peso)	6.4	23.7
Polares/NHC (% peso)	0.7	14.0
BTEX (mg/kg petróleo)		
Benceno	5,380.0	1,430.0
Tolueno	14,000.0	4,590.0
Etilbenceno	1,810.0	1,200.0
p,m-xileno	10,100.0	6,030.0
o-xileno	4,810.0	1,890.0
HAP (mg/kg petróleo)		
Naftaleno	960.0	320.0
Acenaftaleno	ND	20.0
Fluoreno	ND	40.0
Fenantreno	ND	140.0
Pireno	ND	20.0
Benzo(a)antraceno	ND	20.0
Benzo(a)pireno	ND	20.0

ND: no detectado

En México se preparan tres variedades de petróleo crudo para exportación: Maya (pesado), Istmo (ligero) y Olmeca (superligero) (Tabla II.4) (IMP, 2006). Durante el año 2004 PEP tuvo una producción promedio de 3,383 mbd, 72.66% correspondió a crudo tipo Maya, 23.34% al tipo Istmo y cerca del 4% al tipo Olmeca; de la producción nacional de aceite lograda durante este año, 1,870 mbd, es decir el 48.9%, fueron destinados a exportación, principalmente a Estados Unidos (78.52%). Cabe mencionar que México ocupa el lugar número catorce en términos de sus reservas probadas de petróleo crudo, y el sexto como productor (SENER, 2005).

**Tabla II.4. Variedades del petróleo crudo de México (IMP, 2006).**

Variedad	Densidad grados API	Azufre en peso (%)
Superligero (Olmeca)	39.3	0.8
Ligero (Itsmo)	33.6	1.3
Pesado (Maya)	22.0	3.3

### II.3 Contaminación del suelo con petróleo crudo

Por la alta viscosidad del petróleo crudo, éste no penetra inicialmente hacia el subsuelo, se retiene en el horizonte superficial donde se separa en tres fracciones: volátil, disuelta y sólida. La volátil consiste de la fracción ligera que se fotooxida y volatiliza a través del espacio poroso del suelo y se transporta a la atmósfera, como por ejemplo, metano, etano, propano y butano. La fase disuelta, es la fracción soluble que se difunde en la solución del suelo, los hidrocarburos que entran en esta fase son de 5 a 17 átomos de carbono, algunos ejemplos son: pentano, hexano, heptano, benceno, tolueno, etilbenceno, xileno y naftaleno. La fracción sólida es la más estable que queda adsorbida a la matriz del suelo; agrupa los hidrocarburos con 18 o más átomos de carbono en su molécula, incluye a los compuestos polares y a los HAP (Rivera, 2001).

El destino y comportamiento de los hidrocarburos derramados en el suelo depende de la cantidad y tipo de hidrocarburos, de las características del suelo y de las condiciones ambientales (Halmemies *et al.*, 2003); incluso pueden llegar a contaminar eventualmente el agua subterránea, cuerpos de agua superficiales, el aire y/o a la biota del ecosistema.

El suelo que es el que recibe directamente el contaminante, es el que resulta más afectado en sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas. El suelo contaminado con petróleo puede modificar su estructura, reducir el intercambio de gases, aumentar el contenido de carbono orgánico, modificar la capacidad de intercambio catiónico y acidificar el suelo, lo cual en conjunto provoca una reducción en su fertilidad (Sigala, 2004). Otras propiedades que se pueden alterar son: textura, densidad aparente, distribución del tamaño de poro, consistencia y color; esto ocurre por la propiedad

aceitosa del petróleo que aglutina las partículas del suelo, genera estructura más gruesa, cubre la superficie de las partículas y el espacio poroso, disminuye la aireación del suelo y el color de la matriz cambia a más oscuro (Li *et al.*, 1997). Incluso concentraciones tóxicas de petróleo en el suelo pueden inhibir el crecimiento y cambiar las proporciones de las diferentes poblaciones de la mesofauna (nematodos, protozoarios y rotíferos) y de la microfauna (bacterias, hongos, actinomicetos y algas); con la consecuente pérdida de la biodiversidad de comunidades microbianas importantes en los ciclos biogeoquímicos, y la productividad del ecosistema (Rhodes y Hendricks, 1990).

#### **II.4 Técnicas de saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos**

Con el fin de evitar la dispersión de los contaminantes y reducir los efectos negativos que producen en el suelo, se han desarrollado técnicas de remediación, también conocidas como técnicas de saneamiento o restauración.

El término tecnología de tratamiento implica cualquier operación unitaria o serie de operaciones unitarias que alteran la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones físicas, químicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del contaminante (USEPA, 2001). Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base en los siguientes principios: estrategia de remediación, lugar en que se realiza el proceso de remediación y tipo de tratamiento (Van Deuren *et al.*, 2002; Volke y Velasco, 2002).

**Estrategia de remediación.** Son tres estrategias básicas que pueden usarse separadas o en conjunto, para remediar la mayoría de los sitios contaminados:

1. Destrucción o modificación. Este tipo de tecnologías busca alterar la estructura química del contaminante.
2. Extracción o separación. Los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado, aprovechando sus propiedades físicas o químicas (por ejemplo volatilidad, solubilidad o carga eléctrica).
3. Aislamiento o inmovilización. Los contaminantes son estabilizados, solidificados o contenidos con el uso de métodos físicos o químicos.

**Lugar de realización del proceso de remediación.** En general, se distinguen dos tipos de tecnología: *in situ*, es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación y, fuera del sitio, por lo que se requiere de excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento.

Cabe mencionar que actualmente en la SEMARNAT, administrativamente se distinguen tres tipos de acuerdo a la solicitud de autorización para el tratamiento de suelos y/o materiales semejantes a suelos contaminados (SEMARNAT, 2006):

1. Tratamiento *in situ*. Se realiza en el predio que los contiene sin ser removidos y trasladados.
2. Tratamiento on site. Se realiza sobre una área adyacente al sitio contaminado o sobre una área dentro del sitio contaminado, previa remoción y transferencia de los suelos o materiales contaminados.
3. Tratamiento ex situ. Cuando el tratamiento se realiza fuera del sitio contaminado en instalaciones fijas autorizadas, previa remoción y transferencia de los suelos o materiales contaminados.

**Tipo de tratamiento.** Esta clasificación se basa en el principio de la tecnología de remediación y se divide en tres tipos:

1. Tratamientos térmicos. Utilizan calor para incrementar la volatilización, quemar, descomponer o fundir los contaminantes.
2. Tratamientos biológicos (biorremediación). Utilizan las actividades metabólicas de ciertos organismos (bacterias, hongos, levaduras, plantas) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inocuos.
3. Tratamientos fisicoquímicos. Este tipo de tratamientos, utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para eliminar, separar o contener la contaminación.

En la Tabla II.5 se muestran algunas de las técnicas de remediación de suelos de tipo biológico, fisicoquímico y térmico más comúnmente utilizadas en el mundo.



Tabla II.5. Técnicas de remediación de suelos.

Tipo biológico	Tipo fisicoquímico	Tipo térmico
Atenuación natural <sup>1</sup>	Lavado de suelo <sup>1,2</sup>	Desorción térmica <sup>1,2</sup>
Bioestimulación <sup>1,2</sup>	Oxidación química <sup>1,2</sup>	Pirólisis <sup>2</sup>
Bioaumentación <sup>1,2</sup>	Extracción de vapores <sup>1</sup>	Incineración <sup>1,2</sup>
Bioventeo <sup>1</sup>	Solidificación estabilización <sup>1,2</sup>	Vitrificación <sup>1,2</sup>
Biolabranza <sup>2</sup>	Electrocinética <sup>1</sup>	
Composteo <sup>2</sup>		
Biorreactores <sup>2</sup>		
Fitorremediación <sup>1,2</sup>		

1: *In situ*

2: fuera del sitio

#### II.4.1 Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos son muy rápidos pero generalmente también son los más caros. Los costos elevados se deben a la energía y equipos, además de ser intensivos en mano de obra. Al igual que las tecnologías fisicoquímicas y a diferencia de las biológicas, los procesos térmicos incluyen la separación, destrucción e inmovilización de contaminantes. Los procesos térmicos utilizan la temperatura para incrementar la volatilidad (separación), quemado, descomposición (destrucción) o fundición de los contaminantes (inmovilización) (Volke y Velasco, 2002). Las tecnologías térmicas de separación producen vapores que requieren un tratamiento adicional; las destructivas producen residuos sólidos (cenizas) y, en ocasiones, residuos líquidos que también requieren tratamiento y/o disposición final. La mayoría de las tecnologías térmicas pueden aplicarse *in situ* y fuera del sitio (Van Deuren *et al.*, 2002).

**DESORCIÓN TÉRMICA.** Es un proceso de separación física no destructivo. El suelo es calentado para volatilizar agua y contaminantes orgánicos que son transportados hacia un sistema de tratamiento de gases. Las temperaturas (90-560°C) y tiempos de residencia volatilizan los contaminantes selectivamente pero no los oxidan (Van Deuren *et al.*, 2002).

**PIRÓLISIS.** Se define como la descomposición química inducida de materiales orgánicos por calentamiento en ausencia de oxígeno, sin embargo, en realidad no existen sistemas pirolíticos con atmósferas completamente libres de oxígeno. El proceso normalmente se realiza a presión y temperaturas de operación mayores a 430°C (Van Deuren *et al.*, 2002). Los productos primarios formados de la pirólisis de materiales orgánicos en diferentes proporciones de acuerdo con las condiciones del proceso son: a) gases residuales (metano, etano y pequeñas cantidades de hidrocarburos ligeros); b) condensados acuosos y aceitosos y c) residuos sólidos carbonosos (coque) que pueden usarse como combustible (Riser-Roberts, 1998).

**INCINERACIÓN.** En los procesos de incineración tanto *in situ* como fuera del sitio, se utilizan altas temperaturas de operación que van desde los 870 a los 1,200°C, con la finalidad de volatilizar y quemar compuestos orgánicos y halogenados en presencia de oxígeno. Generalmente se utilizan combustibles para iniciar el proceso de combustión. Las eficiencias de remoción de los incineradores operados adecuadamente alcanzan el 99.99%, sin embargo, los gases de combustión generalmente requieren de tratamiento (Van Deuren *et al.*, 1997).

**VITRIFICACIÓN.** Puede llevarse a cabo *in situ* o fuera del sitio, y utiliza una corriente eléctrica para fundir los suelos contaminados con temperaturas que van de 1,600 a 2,000°C. Este proceso estabiliza la mayoría de los contaminantes inorgánicos y destruye los orgánicos. El producto de la vitrificación es un material cristalino químicamente estable que no produce lixiviados, en el cual quedan incorporados los compuestos inorgánicos. Durante el proceso, las altas temperaturas, provocan la destrucción o remoción de los materiales orgánicos (USEPA, 2001).

#### **II.4.2 Tratamientos biológicos (biorremediación)**

El término biorremediación se utiliza para describir una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (bacterias, hongos, levaduras, plantas) para degradar, transformar o remover compuestos orgánicos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos (Van Deuren *et al.*, 2002), se pueden emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in situ* o fuera del sitio, en condiciones aerobias o anaerobias (USEPA, 1996a) y tiene la ventaja de ser un proceso más barato y menos agresivo al ambiente que los

convencionales, como los tratamientos fisicoquímicos o los térmicos, sin embargo, requieren tiempos de tratamiento más largos. La biorremediación es un proceso complejo que se basa en el entendimiento de la microbiología, bioquímica, genética, procesos metabólicos, estructura y función de las comunidades microbianas naturales (Van Cauwenberghe y Roote, 1998).

La biodegradación de compuestos orgánicos ocurre naturalmente por la acción de bacterias, hongos y/o levaduras principalmente, pero en muchos casos las velocidades de reacción suelen ser demasiado lentas (Brawn *et al.*, 1989), por lo que es necesario estimular la biodegradación ajustando los factores que gobiernan la actividad microbiana del suelo. La biodegradación principalmente se debe a los microorganismos quimioheterótrofos, todos aquellos que utilizan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. A través de enzimas rompen los compuestos orgánicos en una serie compleja de reacciones acopladas de óxido-reducción llamado este proceso catabolismo, éste se puede clasificar en dos: fermentación y respiración, que se distinguen por el uso de aceptores finales de electrones, en el primer caso utilizan compuestos orgánicos, y en el segundo compuestos inorgánicos. La respiración es aerobia cuando se utiliza como aceptor final de electrones el oxígeno ( $O_2$ ) y anaerobia cuando se utiliza por ejemplo el nitrato ( $NO_3^-$ ) o el sulfato ( $SO_4^{2-}$ ). La energía que se obtiene del catabolismo la utiliza la célula para llevar a cabo reacciones biosintéticas, este proceso se denomina anabolismo. Debido a que la respiración aerobia en general es más eficiente que la respiración anaerobia, en la biorremediación se prefieren los sistemas aerobios, mientras que el metabolismo fermentativo no se toma en cuenta. Teóricamente, como resultado del metabolismo aerobio, hay producción de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), agua y biomasa cuando se llega a la mineralización completa de los hidrocarburos. La degradación de materiales orgánicos en ambientes naturales se realiza principalmente por dos grupos de microorganismos, bacterias y hongos, sin embargo, el primer grupo es el que se utiliza principalmente en sistemas de biorremediación. Las bacterias representan un grupo diverso de organismos procarióticos con amplia distribución en la biosfera; su rápido metabolismo y crecimiento (reproducción por fisión binaria), su plasticidad genética y su habilidad para adaptarse rápidamente a varios ambientes, las hace ser altamente eficientes en procesos de biorremediación (Baker y Herson, 1994).

Pruebas de laboratorio demuestran que bajo condiciones apropiadas de humedad y cantidad de nutrimentos principalmente, algunos microorganismos utilizan los hidrocarburos, sin embargo, los mecanismos y las tasas de biodegradación son diferentes según los diversos tipos de petróleo, de acuerdo con su composición. En cuanto a los constituyentes, se conoce que los compuestos saturados se oxidan más rápidamente que los aromáticos por la acción de muchas especies de microorganismos (Wang y Fingas, 1997), lo cual está directamente relacionado con su mayor solubilidad en agua y menor complejidad de su estructura molecular. Los microorganismos producen una serie de catalizadores biológicos denominados enzimas, que atacan las moléculas de hidrocarburo transformándolas en productos más fácilmente asimilables. Las reacciones de oxidación son las de mayor importancia en la biodegradación de hidrocarburos en condiciones aerobias y están catalizadas por monooxigenasas, dioxigenasas, lacasas y peroxidasas (Ércoli *et al.*, 1995 y 2000). En reacciones quimiotróficas, una porción del substrato es oxidado para obtener energía y otra parte es asimilado dentro de la masa celular. En la respiración aerobia, el oxígeno no solamente es el aceptor de electrones sino también participa en la activación de los substratos vía reacciones de oxigenación (Díaz, 2004). La degradación de hidrocarburos alifáticos saturados es un proceso básicamente aerobio, el oxígeno es necesario para iniciar el ataque microbiano a la molécula, mientras que la degradación de hidrocarburos alifáticos insaturados puede efectuarse en forma aerobia y anaerobia, al igual que los hidrocarburos aromáticos (Ércoli *et al.*, 1995).

El paso inicial en la degradación de los hidrocarburos por bacterias generalmente es una reacción de oxigenación, que consiste en la introducción de oxígeno dentro de la molécula por medio de una oxigenasa, produciendo de esta manera metabolitos más solubles en agua que pueden ser degradados en reacciones de deshidrogenación e hidroxilación. La ruta de biodegradación más común de los hidrocarburos alifáticos, por ejemplo un alcano, es la incorporación enzimática directa de oxígeno molecular, produciendo un ácido graso que finalmente se transforma en dióxido de carbono y agua a través de la  $\beta$ -oxidación. En el caso de los hidrocarburos aromáticos, como el benceno, la transformación inicial más común es la hidroxilación que involucra la incorporación de oxígeno molecular, por medio de monooxigenasas o dioxigenasas, produciendo eventualmente catecol que es más fácil de mineralizar (Aboul-Kassim y



Simoneit, 2001), ya que la ruta central involucra una serie de reacciones que dan como resultado intermediarios del ciclo de Krebs (Díaz, 2004) (Figura II.3). En general los HAP con dos o tres anillos se degradan más rápidamente que los que tienen cuatro o cinco anillos. Es importante mencionar que la biodegradación anaerobia de los hidrocarburos también se llega a presentar, sin embargo, es mucho más lenta (Aboul-Kassim y Simoneit, 2001).

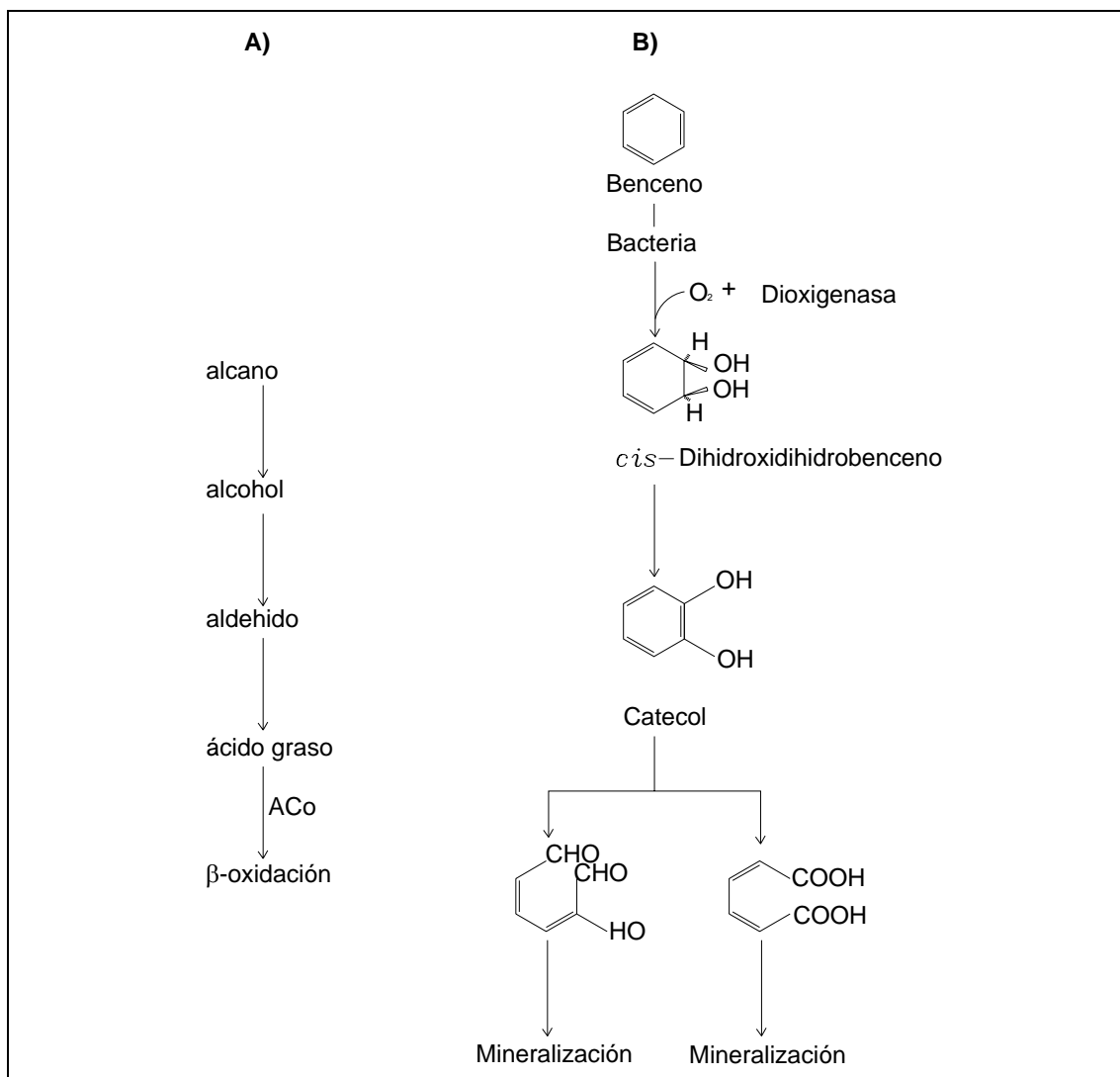


Figura II.3. Rutas de biodegradación aerobia de hidrocarburos: A) alifáticos y B) aromáticos (Aboul-Kassim y Simoneit, 2001).

En la biodegradación de hidrocarburos participan bacterias con alta capacidad degradativa, entre las que destacan las que pertenecen a los géneros: *Brevibacterium*, *Spirillum*, *Xanthomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Nocardia*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. mendocina*, *P. aureofasciens*), *Serratia* (*S. rubida*), entre otras (Escalante, 2002). Cabe resaltar que se ha reportado la degradación de HAP por bacterias de los géneros: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Xanthomonas* (Brawn *et al.*, 1989), por ejemplo, el naftaleno es degradado por *Alcaligenes denitrificans*, *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas putida*, *P. fluorescens*, *P. paucimobilis*, *P. vesicularis*, *P. cepacia*, *P. testosterona*, *Rhodococcus sp.*, *Corynebacterium venale*, *Bacillus cereus*, *Moraxella sp.*, *Streptomyces sp.*, *Vibrio sp.* y *Cyclotrophicus sp.*, y el fenantreno por *Aeromonas sp.*, *Alcaligenes faecalis*, *A. denitrificans*, *Arthrobacter polychromogenes*, *Beijerinckia sp.*, *Micrococcus sp.*, *Mycobacterium sp.*, *Pseudomonas putida*, *P. paucimobilis*, *Rhodococcus sp.*, *Vibrio sp.*, *Nocardia sp.*, *Flavobacterium sp.*, *Streptomyces sp.* y *Bacillus sp.* (Samanta *et al.*, 2002).

Uno de los parámetros importantes a evaluar para determinar la factibilidad de aplicar técnicas biológicas de remediación, es la biodegradabilidad de los suelos contaminados. Generalmente la evaluación de biodegradabilidad de contaminantes se realiza en periodos de una semana a meses, dependiendo de las características del contaminante (concentración, composición, complejidad, toxicidad y disponibilidad), de las características del suelo (textura, pH, contenido de materia orgánica, concentración de nutrientes, etc.), del potencial de los microorganismos (tipo y concentración) y de las condiciones experimentales (Fernández, 2004). Los factores ambientales que afectan la actividad microbiana y, por lo tanto, la biodegradación son: aceptores de electrones (oxígeno, nitrato, sulfato u otros), nutrientes inorgánicos (principalmente nitrógeno y fósforo), contenido de agua, temperatura, pH, tipo y cantidad de material orgánico presente (carbono) y presencia de metales pesados u otros compuestos que puedan inhibir el crecimiento de los microorganismos o ser tóxicos (Baker y Herson, 1994).

A continuación se describen brevemente algunas técnicas de remediación de tipo biológico, abundando más adelante en las que se analizan en el presente trabajo: atenuación natural y bioestimulación (Tabla II.5).

**ATENUACIÓN NATURAL.** También conocida como bioatenuación o biorremediación intrínseca, es una estrategia de saneamiento detallada, supervisada y controlada que conduce, a través de los procesos naturales intrínsecos del sitio, a la reducción de la concentración de contaminantes, a niveles que no tengan efectos negativos a la salud humana y al ambiente (Fernández, 2004).

**BIOESTIMULACIÓN.** Se adicionan al suelo contaminado soluciones acuosas que contengan nutrientes, u otros coadyuvantes como tensoactivos por ejemplo, para estimular la actividad de los microorganismos, y mejorar así la biodegradación de contaminantes orgánicos (Van Deuren *et al.*, 2002).

**BIOAUMENTACIÓN.** Esta tecnología se utiliza cuando se requiere el tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o capacidad degradadora. Consiste en la adición de microorganismos vivos (bacterias y/u hongos), que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o biotransformación. El tamaño del inóculo a utilizar, depende del tamaño de la zona contaminada, de la dispersión de los contaminantes y de la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Riser-Roberts, 1998).

**BIOVENTEO.** El objetivo de esta tecnología es estimular la biodegradación natural de cualquier compuesto biodegradable en condiciones aerobias. El aire se suministra en el sitio contaminado a través de pozos de extracción, por movimiento forzado (extracción o inyección), con bajas velocidades de flujo, con el fin de proveer solamente el oxígeno necesario para sostener la actividad de los microorganismos degradadores (Van Deuren *et al.*, 2002).

**BIOLABRANZA.** Se conoce también como landfarming y consiste en la oxigenación del suelo por el movimiento mecánico de capas de espesor reducido por medio de herramientas de labranza. Las condiciones del suelo son controladas para optimizar la degradación de los contaminantes como son: contenido de humedad, aireación, pH e incorporación de nutrientes. Por tratarse de capas de espesor reducido, el suelo bajo

tratamiento es afectado fuertemente por las condiciones ambientales como vientos, lluvias, cambios térmicos, irradiación, etc. (Ércoli *et al.*, 2000). Deben tomarse precauciones respecto a la posibilidad de migración de los contaminantes (lixiviados) colocando una membrana impermeable, y se requiere disponer de suficiente superficie de terreno destinada en forma excluyente a este propósito (Ércoli *et al.*, 1995).

**COMPOSTEO.** El composteo es un proceso 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 agentes 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 biopilas, tambores rotatorios, tanques circulares y recipientes abiertos (Volke y Velasco, 2003).

**BIORREACTORES.** Los biorreactores pueden usarse para tratar suelos heterogéneos y poco permeables, o cuando es necesario disminuir el tiempo de tratamiento, ya que es posible combinar controlada y eficientemente, procesos físicos, químicos y biológicos, que mejoren y aceleren la biodegradación (Riser-Roberts, 1998). Es la tecnología más adecuada cuando existen peligros potenciales de descargas y emisiones (Volke y Velasco, 2002).

**FITORREMEDIACIÓN.** Es un proceso que utiliza especies vegetales que ayudan a remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto *in situ* como fuera del sitio (Van Deuren *et al.*, 2002).

Cabe mencionar que con las técnicas *in situ* no es necesario excavar el suelo contaminado, de modo que son menos costosas y se puede tratar una gran cantidad de suelo a la vez, sin embargo, pueden llevar más tiempo que las técnicas fuera del sitio y pueden ser difíciles de manejar dependiendo de las condiciones ambientales. Las técnicas fuera del sitio requieren menos tiempo, son más fáciles de controlar y se usan para tratar una gama más amplia de contaminantes y tipos de suelo que las técnicas *in situ*, la desventaja es que pueden llegar a ser más costosas (USEPA, 1996a) (Tabla II.5).



### ***A Atenuación natural***

La atenuación natural controlada o biorremediación intrínseca, incluye una variedad de procesos físicos, químicos y/o biológicos, que bajo condiciones favorables, actúan sin intervención humana para reducir la toxicidad, movilidad, masa, volumen o concentración de los contaminantes en el suelo y/o agua subterránea. Es una técnica de remediación *in situ* que incluye procesos de degradación biótica, así como dispersión, dilución, sorción y volatilización (USEPA, 1996b; USEPA, 1997). Para evaluar la factibilidad de aplicar atenuación natural en un sitio contaminado, el primer paso es determinar la biodegradabilidad del contaminante, ya que generalmente se atribuye a la actividad microbiana su éxito, puesto que los mecanismos abióticos juegan un papel minoritario.

Para que sea factible, la atenuación natural requiere que la concentración del contaminante disminuya con el tiempo (principalmente por la biodegradación), que el contaminante no migre y no represente un riesgo a la salud humana. Así, además de evaluar la biodegradación del contaminante, es necesario determinar si la concentración en el suelo y la migración de los contaminantes representan un daño potencial para la salud, a través de una evaluación de riesgo a la salud (Fernández, 2002). Dado que no es una técnica activa propiamente, el costo se concentra principalmente en la caracterización del sitio, la evaluación de la degradación natural del contaminante (principalmente biológica), la evaluación del riesgo a la salud y el muestreo periódico para evaluar la posible migración del contaminante de un medio a otro (USEPA, 1997).

La atenuación natural algunas veces se utiliza en conjunción o después de la aplicación de otras técnicas de remediación activas tanto de suelos como de aguas subterráneas, siempre y cuando se demuestre que la biodegradación de los contaminantes está ocurriendo en el sitio en estudio (Rittmann *et al.*, 2004), sin embargo, es imprescindible corroborar que la velocidad de degradación sea mayor a la migración del contaminante hacia lugares que pudiera causar daños a la salud humana o al ambiente (Troy *et al.*, 1995).

Rifai *et al.* (1995) desarrollaron el modelo llamado BIOPLUME III para evaluar la viabilidad de usar la atenuación natural en un sitio contaminado. Este modelo además de simular los mecanismos de advección, dispersión y sorción en la zona saturada, también modela la biodegradación aerobia y anaerobia en presencia de múltiples aceptores de electrones: oxígeno, nitrato, hierro, sulfato y dióxido de carbono.

El Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) evaluó la factibilidad de aplicar la técnica de atenuación natural en dos sitios contaminados con hidrocarburos (fosas de residuos y recortes de perforación): Paredón 31 en Huimanguillo, Tabasco, con concentraciones entre 0-50,000 mg/kg de HTP, y Campo 10 en Poza Rica, Veracruz, hasta 150,000 mg/kg. En cada sitio se realizó el seguimiento de 30 parámetros físicos, químicos y biológicos, así como estudios de toxicidad y riesgo. El monitoreo de los diferentes parámetros se realizó en cuatro muestreos durante un periodo de dos años. Los resultados indicaron que hubo una disminución en la concentración de los HTP; la cual se puede atribuir en gran parte a la biodegradación, considerando la presencia de elevadas cuentas microbianas, tanto aerobias como anaerobias, a la detección de gases como metano, H<sub>2</sub>S y CO<sub>2</sub> en el sitio, y a los resultados positivos de las pruebas de biodegradabilidad realizadas en laboratorio. En cuanto al estudio de riesgo, Paredón 31 no presentó un posible efecto adverso a la salud humana por exposición a los hidrocarburos poliaromáticos, monoaromáticos o metales en suelo. Sin embargo, un cambio en el uso del suelo como el empleo de la fosa para actividades pecuarias, el establecimiento de residencias en el sitio o el uso del agua subterránea como suministro de agua potable en el lindero del sitio podría ser riesgoso con concentraciones excesivas de naftaleno, tolueno, As, Ba, Cd, Cu, Hg, Ni, Se y Zn. De igual forma Campo 10, no representa un riesgo real en el sitio; ni por contacto dérmico e ingestión ocasional de suelo superficial, ni por inhalación de partículas y gases por parte de los trabajadores o residentes cercanos. Sin embargo la construcción de un pozo de suministro de agua subterránea en el lindero del sitio podría ser riesgoso para la salud humana por concentraciones excesivas de As. Los ensayos de biodiversidad, potencial de ecotoxicidad y potencial tóxico expresado como CL<sub>50</sub>, demostraron una disminución significativa de la toxicidad entre el tiempo inicial y final del estudio. Paredón 31 presenta mayor toxicidad y la disminución de ésta fue menor que la de Campo 10. Finalmente se concluyó que se requiere tratamiento activo únicamente de

la capa superficial de las fosas, lo cual aceleraría el proceso y reduciría los costos de tratamiento de este tipo de sitios, dejando al proceso natural (atenuación natural) la mayor parte del volumen a tratar (Fernández, 2004).

### **B Bioestimulación**

Generalmente antes de llevar a cabo a escala de campo la técnica de bioestimulación se realizan pruebas de tratabilidad a escala de laboratorio, comúnmente en este tipo de experimentos en fase sólida se utilizan charolas de acero inoxidable donde se coloca el suelo en estudio, se agregan los nutrientes y coadyuvantes (tensoactivos), y se humecta y mezcla el suelo de forma similar que en el landfarming (biolabranza). Estos estudios son muy útiles para estimar tasa de biodegradación por medio de la concentración residual del contaminante a diferentes tiempos del tratamiento (Nelson *et al.*, 1994; Adams *et al.*, 1999). Otros indicadores que se evalúan comúnmente son la cuenta en placa de bacterias aerobias heterótrofas y la actividad metabólica de los microorganismos del suelo ya sea por la producción de CO<sub>2</sub> o el consumo de O<sub>2</sub>. Entre los métodos para determinar la producción de CO<sub>2</sub> destacan: titulación ácido-base (absorción de este gas en NaOH y su cuantificación con HCl), cromatografía de gases y espectroscopia infrarroja (Alef, 1995). Incluso se han utilizado respirómetros automatizados que registran la producción de CO<sub>2</sub> y consumo de O<sub>2</sub> de manera continua en una PC (Micro-Oximax) (Plaza *et al.*, 2002; Chokshi y Nelson, 2003). A continuación se describen algunos estudios recientes sobre bioestimulación:

Smith *et al.* (1998) analizaron la aplicación de la teoría por su nombre en inglés "resource-ratio theory" en la biodegradación de hidrocarburos en suelos. A partir de los resultados de la producción de CO<sub>2</sub> de un suelo contaminado con hexadecano en microcosmos con diferentes proporciones de nitrógeno y fósforo, determinaron baja producción de CO<sub>2</sub> cuando la relación N:P es menor de 5:1 y mayor de 11:1, sin embargo, valores más elevados de CO<sub>2</sub> se obtuvieron con una relación 7:1. En el caso de un suelo contaminado con fenantreno se encontraron dos relaciones óptimas, 5:1 y 20:1, lo cual sugiere que en el suelo analizado existen por lo menos dos poblaciones de bacterias que degradan este hidrocarburo en esas condiciones.

Margesin *et al.* (2000) evaluaron la bioestimulación de un suelo contaminado con 5,000 mg/kg de diesel con diferentes fuentes de nitrógeno y fósforo (fertilizante NPK, nitrato amónico de calcio, fosfato ácido de potasio y urea). Utilizaron sistemas con 8 kg

de suelo, el contenido de agua se mantuvo aproximadamente al 50% de su capacidad de campo y la aireación del suelo se realizó mezclando cada dos días durante el tiempo que duró el tratamiento (88 días). Los resultados indicaron que la remoción del contaminante fue significativamente más baja en el sistema no fertilizado que en los sistemas fertilizados, las eficiencias de remoción de hidrocarburos variaron entre 73 y 88%. La adición de macronutrientes mejoró la biodegradación independientemente de la fuente de nitrógeno y fósforo. En cuanto al número de microorganismos heterótrofos, la población se mantuvo casi constante, a diferencia de los microorganismos degradadores de hidrocarburos que incrementaron con el tiempo.

Chokshi y Nelson (2003) evaluaron la biodegradación de hidrocarburos en un suelo arcilloso a través de pruebas de respirometría; midieron la producción de CO<sub>2</sub> en una serie de tratamientos con diferentes contenidos de humedad, nutrientes e hidrocarburos. Los valores más altos se obtuvieron con contenidos de humedad entre 15 y 20%, una concentración de nitrógeno, fósforo y potasio de 120, 40 y 40 mg/kg respectivamente, en cuanto a la concentración de hidrocarburos el intervalo fue de 30,000 a 90,000 mg/kg de HTP, sin embargo, por arriba de esta última concentración la producción de CO<sub>2</sub> disminuye dramáticamente, lo cual se puede asociar a efectos tóxicos en los microorganismos y/o a la escasa permeabilidad del oxígeno por la baja porosidad del suelo.

Kim *et al.* (2005) hicieron pruebas de tratabilidad en arena contaminada con crudo ligero, analizando la biodegradación por medio de la generación de CO<sub>2</sub> y concentración remanente de hidrocarburos. Llevaron a cabo una serie de tratamientos en los que se combinaron los siguientes factores: adición o no adición de un fertilizante para obtener una relación C:N:P 100:10:3, dos concentraciones de un tensoactivo no iónico (Tween 80), 1 y 10 CMC (Concentración Micelar Crítica), dos tamaños de población de bacterias degradadoras de hidrocarburos (*Corynebacterium sp.* IC-10, *Sphingomonas sp.* KH3-2 y *Yarrowia sp.* 180), 1X10<sup>6</sup> y 1X10<sup>8</sup> células/g arena, y dos concentraciones de petróleo, 30,000 y 60,000 mg/kg. Encontraron que la adición de nutrimentos inorgánicos acelera por un factor de 10 la producción de CO<sub>2</sub>, la aplicación de tensoactivo a una concentración de 1 CMC fue suficiente para mejorar la biodegradación de 60,000 mg/kg de petróleo crudo, y finalmente, que el efecto de la adición del tensoactivo depende de la cantidad del inóculo.

Guzmán (2005) llevó a cabo pruebas de tratabilidad de bioestimulación y bioaumentación en un suelo con 48,601 y 52,079 mg/kg de HTP, respectivamente. En el primer caso, agregó a 42 kg de suelo un fertilizante comercial (Grow-Feed 20:30:10 N:P:K) para obtener 100 ppm de nitrógeno, la humedad se mantuvo en 19.35% y se proporcionó aireación diaria con una pala, en el segundo caso, se repitió lo mismo sólo que además se inocularon bacterias nativas y se agregó lirio picado (0.74% en base al peso seco del suelo tratado). Después de 90 días de tratamiento, las eficiencias de remoción de hidrocarburos fueron prácticamente las mismas: 14.25% para la bioestimulación y 14.30% para la bioaumentación.

Molina (2006) analizó la eficiencia de remoción de HTP en microcosmos con suelo contaminado con tres diferentes tipos de petróleo crudo: Carrizo 14.3°API, Batab 25.53°API y Paredón 34.9°API a una concentración de 99,760, 120,920 y 106.360 mg/kg de HTP, respectivamente. Además de ajustar la relación C:N:P 100:15:1 se estimuló la biodegradación con tres diferentes tensoactivos no iónicos: Brij 58, Surfapcol (Emulgín 600) y Tween 80 a tres concentraciones 4, 40 y 400 mg/kg. Las eficiencias más altas en cada tipo de crudo se obtuvieron con Brij 58 a 4 mg/kg en Batab (15.26%), Tween 80 a 4 mg/kg en Paredón (13.57%) y Tween 80 a 400 mg/kg en Carrizo (15.78%).

### II.4.3 Tratamientos fisicoquímicos

Como ya se mencionó, los tratamientos fisicoquímicos aprovechan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o inmovilizar la contaminación. Este tipo de tecnologías son efectivas relativamente en cuanto a costos y pueden concluirse en periodos cortos, en comparación con las tecnologías de biorremediación. Sin embargo, los costos pueden incrementarse cuando se utilizan técnicas de separación en las que los contaminantes pueden requerir de tratamiento o disposición final posterior (Van Deuren *et al.*, 2002). Al igual que el resto de las tecnologías de remediación, las fisicoquímicas pueden realizarse *in situ* o fuera del sitio, sin embargo, la mayoría de estas tecnologías se aplican *in situ* (Volke y Velasco, 2002).

A continuación se describen brevemente algunas técnicas de remediación de tipo fisicoquímico, abundando más adelante en la que se analiza en el presente trabajo: lavado de suelo (Tabla II.5).

**LAVADO DE SUELO.** Consiste en el uso de soluciones de lavado que contienen aditivos como tensoactivos (surfactantes), cosolventes, ácidos, bases, oxidantes, quelantes, disolventes, o simplemente agua, y sirven para incrementar la movilidad y/o solubilidad de los contaminantes (Roote, 1997). El efluente que contiene el contaminante posteriormente tiene que ser tratado.

**OXIDACIÓN QUÍMICA.** Los agentes oxidantes más comúnmente usados son ozono, peróxido de hidrógeno y permanganato de potasio. En algunos casos junto con el oxidante se emplea un catalizador (como el reactivo de Fenton que es peróxido de hidrógeno y fierro), que aumenta el rendimiento del proceso de oxidación, el cual consiste en la destrucción química completa con la producción de compuestos más estables, menos móviles y/o inertes; cuando la degradación es parcial posteriormente se puede acoplar un proceso de biorremediación (Van Deuren *et al.*, 2002).

**EXTRACCIÓN DE VAPORES.** Es una tecnología en la que se aplica vacío al suelo, para inducir un flujo controlado y continuo de aire, y remover así contaminantes volátiles y semivolátiles del suelo (Riser-Roberts, 1998). La efectividad del sistema depende principalmente de la volatilidad de los contaminantes y de la permeabilidad y homogeneidad del suelo (Sellers, 1999). La humedad, contenido de materia orgánica y textura también afectan la eficiencia del proceso. No es una tecnología adecuada para zonas saturadas y/o con alto contenido de partículas finas. La descarga de aire del sistema puede requerir tratamiento y los líquidos residuales deben tratarse o disponerse (Van Deuren *et al.*, 2002).

**SOLIDIFICACIÓN-ESTABILIZACIÓN.** Los contaminantes son atrapados físicamente dentro de una masa estabilizada (solidificación), o son inducidas reacciones químicas entre el agente estabilizante y los contaminantes para reducir su movilidad (estabilización). Pruebas de lixiviación se realizan para garantizar la inmovilización de contaminantes (Van Deuren *et al.*, 2002). La estabilización limita la solubilidad o movilidad del contaminante, generalmente por la adición de materiales como cemento

Portland, cal o polímeros, que aseguran que los constituyentes peligrosos se mantengan en su forma menos móvil o tóxica (Sellers, 1999).

**ELECTROCINÉTICA.** El objetivo es separar y extraer contaminantes orgánicos e inorgánicos (metales) de suelos, lodos y sedimentos, con el uso de un campo eléctrico que permite remover las especies cargadas (iones). Implica la aplicación de una corriente directa de baja intensidad entre un electrodo positivo y uno negativo (Volke y Velasco, 2002).

#### ***A Lavado de suelo***

El lavado de suelo es una técnica de remediación de tipo fisicoquímico y se puede realizar *in situ* (soil flushing) o fuera del sitio (soil washing). Consiste en el uso de soluciones de lavado que contienen aditivos como tensoactivos (surfactantes), cosolventes, ácidos, bases, oxidantes, quelantes, disolventes, o simplemente agua, y sirven para incrementar la movilidad y/o solubilidad de los contaminantes (Roote, 1997). Los aditivos se eligen en función de los contaminantes que se desea remover del suelo, en el caso de compuestos orgánicos hidrofóbicos como los hidrocarburos del petróleo se utilizan tensoactivos (USEPA, 1996c; Roote, 1997). Los tensoactivos tienen por objeto movilizar o solubilizar los contaminantes adsorbidos al suelo o que se encuentran en fase no acuosa (Jafvert, 1996). Las moléculas de tensoactivo tienen una porción hidrofílica y otra hidrofóbica, y son clasificados como aniónicos, catiónicos, anfóteros y no iónicos, ejemplos de ellos son alquilbencensulfonatos, sales de amonio, sulfobetainas y alquilfenoles etoxilados, respectivamente (Rosen, 1989; Ramos, 2000). La concentración que se utiliza en las soluciones de lavado con tensoactivos aniónicos y no iónicos es entre 1 y 3% (Jafvert, 1996).

Los tensoactivos típicamente consisten de un grupo fuertemente hidrofílico, la cabeza de la molécula, y un grupo fuertemente hidrofóbico que generalmente es un hidrocarburo de cadena lineal, el cual es la cola. La porción hidrofílica o polar, tiene alta afinidad por disolventes polares como el agua, y la porción hidrofóbica por compuestos no polares o hidrofóbicos como la mayoría de los hidrocarburos del petróleo (Jafvert, 1996; Strbak, 2000). Cuando un tensoactivo se adiciona a un sistema agua-contaminante orgánico hidrofóbico, reduce la tensión interfacial e incrementa el área interfacial, lo cual puede resultar en la formación espontánea de: una microemulsión fase simple (no requiere energía de mezclado, solamente presenta una

fase acuosa y consiste de microgotas de líquido orgánico en agua, su apariencia es transparente) que moviliza el contaminante, ó una microemulsión Winsor tipo III (presenta una fase acuosa adicional, estructuras laminares y es opaca) que solubiliza el contaminante. En este último caso, las moléculas orgánicas de contaminante pueden solubilizarse dentro de las micelas que se forman, los grupos hidrofóbicos se encuentran en el núcleo y los grupos polares están en contacto con la fase acuosa, a esto se le llama solubilización micelar (Jafvert, 1996; Simpkin *et al.*, 1999; Strbak, 2000). Los tensoactivos forman micelas cuando la concentración del tensoactivo excede la Concentración Micelar Crítica (CMC); por debajo de la CMC, el tensoactivo en solución existe en moléculas individuales o monómeros, por arriba, una concentración constante de monómeros es mantenida en equilibrio con las micelas. El valor de CMC depende de la naturaleza de la molécula del tensoactivo y puede afectarse por cambios de temperatura o por la presencia de compuestos químicos como electrolitos u otros compuestos orgánicos hidrofóbicos (Mata *et al.*, 2000). Otra propiedad de los tensoactivos es el número de balance hidrófilo lipófilo (HLB por sus siglas en inglés Hydrophile Lipophile Balance), que es una indicación de la fuerza relativa de una porción hidrofílica e hidrofóbica de la molécula, y en general se usa para caracterizar la afinidad relativa de los tensoactivos para fases acuosas y orgánicas. Un alto número de HLB generalmente indica buena solubilidad del tensoactivo en agua, y un bajo HLB indica una solubilidad baja en agua y afinidad relativamente alta para la fase orgánica (Simpkin *et al.*, 1999). Los tensoactivos hidrofóbicos pueden formar micelas a concentraciones más bajas que los más hidrofílicos (Mata *et al.*, 2000).

El lavado de suelo *in situ* (soil flushing) es una técnica de remediación tanto de suelo como de agua subterránea contaminados. El proceso involucra la inyección por bombeo de una solución de lavado a presión, a través de pozos de inyección que se instalan en la zona de mayor gradiente hidráulico dentro de una zona contaminada; esta puede ser la zona vadosa (el suelo por encima del nivel freático), la zona saturada o ambas. La solución de lavado entonces fluye a través de la zona contaminada y el efluente resultante se extrae en el extremo de menor gradiente hidráulico por bombeo a través de pozos de extracción, o bien, se excava una zanja para recolectar esta solución que deberá ser tratada en un sistema de aguas



residuales, sobre todo con el fin de recuperar el tensoactivo y reciclarlo (USEPA, 1996c; Roote, 1997; Strbak, 2000). Las operaciones unitarias del sistema de tratamiento del efluente pueden ser: ultrafiltración, extracción de disolvente, flotación, tratamiento fotoquímico, tratamiento biológico, incineración, adsorción con carbón activado, entre otras (Jafvert, 1996). Para que esta técnica sea factible de aplicar es conveniente que el subsuelo presente una conductividad hidráulica, igual o mayor a  $1 \times 10^{-3}$  m/s. En suelos arcillosos de muy baja permeabilidad no es factible la aplicación de esta tecnología debido a la baja velocidad de arrastre del tensoactivo, tampoco en zonas donde existan rocas fracturadas, o alto contenido de materia orgánica. Una de las mayores desventajas de su aplicación es la dispersión potencial tanto horizontal como vertical de los contaminantes fuera de la zona de captura, por lo que se requieren estudios detallados de la hidrogeología del sitio con trazadores no reactivos (Roote, 1997).

La técnica de lavado de suelo fuera del sitio (*soil washing*), consiste en excavar el suelo contaminado y colocarlo en pilas o estanques de lavado contruidos ex profeso, se aplica la solución de lavado y se mezcla mecánicamente con retroexcavadora o algún sistema mecánico. Al igual que en el caso anterior, el efluente también se recolecta y se trata en un sistema de aguas residuales (Roote, 1997). Algunas veces el suelo se separa físicamente en varias fracciones por tamaño (grava, arena y, limo y arcilla), una vez separadas, cada fracción se lava de diferente manera; en el caso de que los contaminantes se encuentren adsorbidos preferentemente en una fracción de suelo, generalmente la fracción fina, y además, dicha fracción representa un pequeño porcentaje del volumen total de suelo, su disposición -en un confinamiento controlado- puede ser una alternativa económicamente viable (USEPA, 1996d; O'Shaughnessy y Blanc, 2000). Esta técnica se usa cuando los suelos tienen baja permeabilidad, siempre y cuando la profundidad del sitio contaminado no sea excesiva ( $> 10$  m) (Iturbe-Argüelles, 2006 comunicación personal) o que no sean terrenos muy compactados o con formación rocosa (Roote, 1997).

En general las técnicas de lavado de suelo tanto *in situ* como fuera del sitio, son más satisfactorias para suelos con tamaño de partícula grande, como son los suelos gravosos y arenosos. En general si un suelo contiene más de 25-30% de arcilla y limos, se considera difícil de tratar (sobre todo cuando es *in situ*) (O'Shaughnessy y

Blanc, 2000). Por otra parte, suelos con altos contenidos de materia orgánica (humus) requieren pretratamiento (Volke y Velasco, 2002).

La selección apropiada del tensoactivo es esencial para obtener altas eficiencias de lavado ya sea en la aplicación *in situ* o fuera del sitio, para lo cual se recomienda hacer pruebas en laboratorio con diferentes tipos y concentraciones de tensoactivos. También se deben tomar en cuenta factores como la adsorción del tensoactivo en las partículas del suelo, la dureza del agua y la temperatura que puede afectar su concentración, así como también la degradación y la toxicidad del tensoactivo (Strbak, 2000). Es conveniente hacer pruebas de tratabilidad específicas al tipo y características del contaminante, del suelo en particular y del sitio contaminado. A continuación se describen algunos ejemplos:

Martel *et al.* (1998a) experimentaron en columnas de arena para analizar la recuperación de contaminantes orgánicos utilizando una solución de lavado que contenía: un alcohol (n-butanol), un tensoactivo (Hostapur SAS) y dos disolventes (d-limoneno y tolueno). Como resultado obtuvieron que con 0.8 volúmenes de poro de la solución inyectada de alcohol-surfactante-disolventes, se recupera el 89% de la concentración inicial. Los tipos de sistemas Winsor se determinaron por observación visual de fases y se confirmaron midiendo la resistividad eléctrica en las fases y el contenido de agua en la fase orgánica.

Zheng y Obbard, (2002) evaluaron la remoción de fluoranteno y pireno en sistemas suelo-agua con tensoactivos no iónicos: Tween 80, Triton X-100 y Brij 35. Concluyeron que la solubilización de HAP es proporcional a la dosis del tensoactivo por arriba de la CMC.

Chu y Chan, (2003) desarrollaron un modelo matemático que describe el mecanismo del lavado de suelo a diferentes concentraciones de tensoactivo. Las pruebas experimentales se hicieron con un suelo arenoso contaminado con compuestos orgánicos hidrofóbicos y parcialmente hidrofóbicos, el surfactante que se utilizó fue el Brij 35 (no iónico) a una concentración de 0.02 mol/L.

Torres *et al.*, (2005a) analizó las eficiencias de remoción de HTP en suelo contaminado con 108,980 mg/kg utilizando tres tensoactivos aniónicos (SDS, Texapon 40, Maranil lab) y nueve tensoactivos no iónicos (Emulgín 600, Emulgín 1000, Brij 35,

Brij 58, Brij 72, Span 20, Tween 20, Tween 60 y Tween 80) a una concentración de 1%. Las mejores eficiencias se obtuvieron con: Emulgín 600 (32.9%), SDS (20.4%) y Brij 35 (16.8%).

## II.5 Situación en México de la aplicación de las técnicas de saneamiento de suelos

De acuerdo con datos de la SEMARNAT (2006) de un total de 170 empresas autorizadas para remediar suelos contaminados, el 93% se dedican a la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos, solamente seis ofrecen servicios para la restauración de suelos contaminados con metales pesados (plomo y cromo hexavalente), cinco para ácidos y bases, y una para sales. Cabe mencionar que dentro de los hidrocarburos se incluyen: petróleo crudo, gasolina, combustóleo, gas-avión, turbosina y otros derivados del petróleo, además de lodos aceitosos, recortes de perforación y lodos de emulsión inversa. La mayoría de las tecnologías utilizadas es de tipo biológico (biorremediación) (61%), aunque algunas empresas utilizan las de tipo fisicoquímico y en menor grado las de tipo térmico. En cuanto a la aplicación, la mayoría se lleva a cabo *in situ* (Figuras II.4 y II.5).

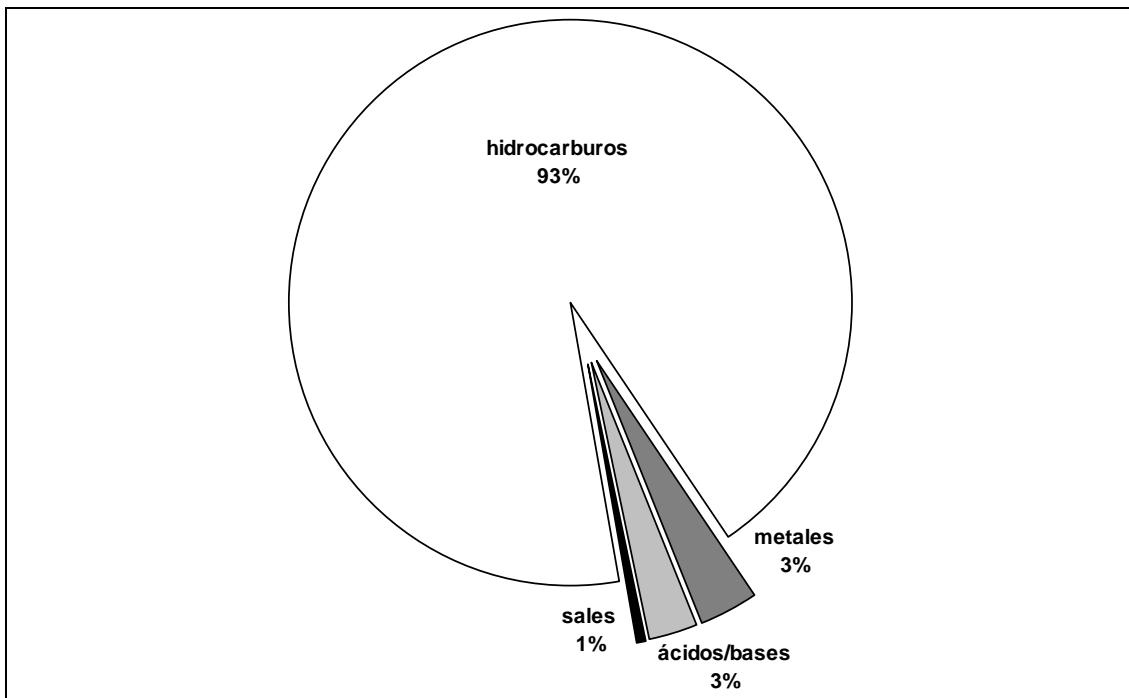


Figura II.4. Contaminantes del suelo tratados por empresas autorizadas en México (SEMARNAT, 2006).

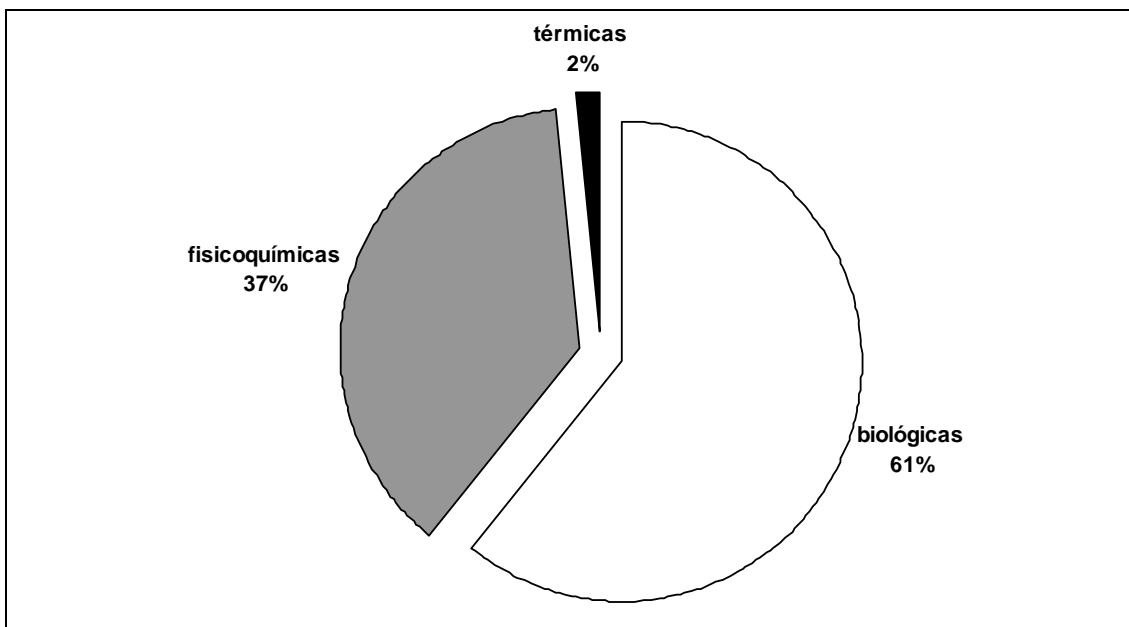


Figura II.5. Técnicas de remediación de suelos utilizadas por empresas autorizadas en México (SEMARNAT, 2006).

El inicio de los programas de restauración de los suelos contaminados en México se relaciona de manera estrecha con la publicación de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA) en 1988 (Rivera, 2004b). La falta de acceso a la información respecto a los sitios que se sujetaron a remediación, las tecnologías que se emplearon en cada caso, los procedimientos a través de los cuales se llevó a cabo dicha remediación y de los resultados de la misma, impiden juzgar su efectividad. Se sabe que empresas que contrataron servicios de remediación como PEMEX, constataron posteriormente la no efectividad de la aplicación de la tecnología de encapsulamiento, y por otro lado, el bioaumentación con bacterias de Texas y Louisiana (Cortinas, 2002; Rivera, 2004b).

En otros países, como por ejemplo Estados Unidos de América y Canadá tienen disponible una base de datos llamada "Bioremediation in the Field Search System", que presenta información sobre la ubicación donde se llevó o se sigue llevando a cabo la remediación (ya sea de suelo, sedimento, lodo, agua subterránea o superficial), el tipo de contaminante tratado, las tecnologías utilizadas, los costos, la velocidad de descontaminación, entre otros datos (USEPA, 2002). Los casos exitosos de remediación de suelos se deben fundamentalmente a las pruebas de tratabilidad y ajustes que se hacen a escala de campo de acuerdo a las condiciones particulares del sitio contaminado, sobre todo cuando se aplican *in situ* u *on site* (Adams *et al.*, 1999).

En México las actividades de extracción, producción y formulación de petróleo y sus derivados que se desarrollaron activamente a partir de la década de 1940, sobre todo en el Golfo de México, han traído como consecuencia la contaminación por hidrocarburos de zonas de alta vulnerabilidad ecológica, tanto en zonas terrestres (Cortinas, 2002) como en zonas costeras (Botello *et al.*, 1996). Por esta razón, un gran número de las actividades relacionadas con la remediación de suelos contaminados se han llevado a cabo en instalaciones de PEMEX que se ubican principalmente en los estados de Tabasco y Veracruz, pertenecientes a PEP Región Sur. De acuerdo con Adams *et al.* (1999), algunas de las empresas que están saneando sitios en el sureste mexicano usan su experiencia empírica ganada en otros lugares cuyas características parecen similares, en vez de realizar las pruebas de tratabilidad. La repercusión de esto es que se presentan problemas en la aplicación de la biorremediación, los cuales generalmente se deben a la falta de experiencia en el manejo de materiales con altas

concentraciones de materia orgánica o arcilla, concentraciones de hidrocarburos muy altas, y condiciones climáticas tropicales (sobre todo la alta precipitación); como consecuencia, es común que no se logren disminuir las concentraciones de hidrocarburos hasta el nivel especificado por contrato, y/o que se atrasen los proyectos hasta 50% o más. Los factores antes mencionados también pueden influir en las técnicas de saneamiento de tipo fisicoquímico y térmico, por lo tanto, también se consideran necesarias las pruebas de tratabilidad.

## **II.6 Legislación en materia de remediación de suelos contaminados**

El marco legal vigente en materia de remediación de suelos se sustenta en leyes, reglamentos y Normas Oficiales Mexicanas (NOM). Para empezar la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA), contempla en el Título Cuarto Protección al ambiente, Capítulo IV Prevención y control de la contaminación del suelo, varios artículos relacionados con lo que podría interpretarse como remediación de suelos contaminados (134 fracción V, 135 fracción III, 136, 139 y 140), así como también en el Capítulo VI Materiales y residuos peligrosos (152BIS). Textualmente lo que establece el artículo 134 fracción V es lo siguiente: "en los suelos contaminados por la presencia de materiales o residuos peligrosos, deberán llevarse a cabo las acciones necesarias para recuperar o reestablecer sus condiciones, de tal manera que puedan ser utilizados en cualquier tipo de actividad prevista por el programa de desarrollo urbano o de ordenamiento ecológico que resulte aplicable" (LGEEPA, 2003).

Por otra parte la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR) en el Título Quinto Manejo integral de residuos peligrosos, Capítulo V Responsabilidad acerca de la contaminación y remediación de sitios, contempla en varios artículos; la responsabilidad de quienes ocasionaron la contaminación para llevar a cabo la remediación (68, 69 y 70), las atribuciones de las autoridades para imponer medidas de emergencia para hacer frente a la contingencia en sitios contaminados por caso fortuito o fuerza mayor (72), así como, el inventariar y categorizar sitios contaminados para determinar si procede su remediación (75), la necesidad de solicitar un programa para llevar a cabo las acciones de remediación de conformidad con el reglamento (77), la emisión de NOM para la caracterización de los



sitios contaminados (78), y lo que se debe tomar en cuenta para determinar el grado de remediación, como son la regulación del uso del suelo y los programas de ordenamiento ecológico y de desarrollo urbano (79) (LGPGIR, 2003).

En el Reglamento de la LGPGIR se tienen varios artículos donde se menciona explícitamente todo lo relacionado con la remediación de sitios contaminados de acuerdo con el siguiente esquema: Título VI Remediación de sitios contaminados, compuesto por los capítulos: I Disposiciones comunes, II Programas de remediación (dividido en cinco secciones: I Disposiciones generales, II Responsable técnico, III Estudios de caracterización, IV Estudios de evaluación del riesgo ambiental y V Propuestas de remediación), III Procedimiento de remediación y IV Declaratorias de remediación. Se especifican los casos en los que se llevará a cabo la remediación de un sitio contaminado (129 y 130), las características y contenidos de los programas de remediación en caso de emergencias ambientales o pasivos ambientales (132, 133, 134, 135 y 136) y los responsables técnicos de su elaboración (137), el contenido de los estudios de caracterización (138 y 139), el objetivo y las bases para realizar los estudios de evaluación del riesgo ambiental (140, 141 y 142), los contenidos de las propuestas de remediación así como el procedimiento para su autorización (143, 144, 145, 146 y 147), las especificaciones (prohibiciones y criterios) de los procedimientos de remediación (148, 149, 150 y 151) y finalmente las declaratorias de remediación (153) (Reglamento de la LGPGIR, 2006).

Es importante mencionar que en algunos casos además de la contaminación del suelo, también existe contaminación del agua subterránea como consecuencia de la dispersión de los contaminantes; por lo que es necesario llevar a cabo en forma conjunta la remediación del suelo y del acuífero, hecho que no se contempla explícitamente en las disposiciones legales antes citadas. Solamente en el Reglamento de la LGPGIR se menciona la necesidad de determinar la distribución y el comportamiento de los contaminantes en el suelo, subsuelo y en los acuíferos, para integrar esta información al estudio de caracterización de los pasivos ambientales como parte del programa de remediación de suelo (Art. 139). Por otra parte, también cabe destacar que en las técnicas de remediación de suelos *in situ*, se deben tomar en cuenta las medidas necesarias para evitar la contaminación de las aguas subterráneas; al respecto este mismo reglamento establece la necesidad de instalar

un sistema de captación de lixiviados (Art. 149, fracción II), además se debe cumplir con lo dispuesto en la Ley de Aguas Nacionales y su Reglamento.

En la Ley de Aguas Nacionales (LAN), se especifica textualmente en el artículo 96 (Título VII Prevención y control de la contaminación de las aguas y responsabilidad por daño ambiental) que "en las zonas de riego y en aquellas zonas de contaminación extendida o dispersa, el manejo y aplicación de sustancias que puedan contaminar las aguas nacionales superficiales o del subsuelo, deberán cumplir con las normas, condiciones y disposiciones que se desprendan de ésta Ley y sus reglamentos", y en el artículo 119, fracción XIV del Título X Infracciones, sanciones y recursos, se habla de la sanción correspondiente cuando se infiltren materiales y sustancias que contaminen las aguas del subsuelo (LAN, 2004).

Las NOM en materia de suelos y/o su remediación son las siguientes:

- NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
- NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación.
- Actualmente se analiza el proyecto de norma PROY-NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plomo, selenio, talio y vanadio (Consulta Pública: 11-noviembre-2005).

En el caso particular de contaminación de suelo y/o agua por actividades petroleras también se encuentran las siguientes NOM:

- NOM-115-SEMARNAT-2003. Que establece las especificaciones de protección ambiental que deben observarse en las actividades de perforación y mantenimiento de pozos petroleros terrestres para exploración y producción en zonas agrícolas, ganaderas y eriales, fuera de áreas naturales protegidas o terrenos forestales.
- NOM-116-SEMARNAT-2003. Que establece las especificaciones de protección ambiental para prospecciones sismológicas terrestres que se realicen en zonas agrícolas, ganaderas y eriales.



- NOM-117-SEMARNAT-1998. Que establece las especificaciones de protección ambiental para la instalación y mantenimiento mayor de los sistemas para el transporte y distribución de hidrocarburos y petroquímicos en estado líquido y gaseoso, que se realicen en derechos de vía terrestres existentes, ubicados en zonas agrícolas, ganaderas y eriales.
- NOM-143-SEMARNAT-2003. Que establece las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a hidrocarburos.

Finalmente la única NOM relacionada con el saneamiento de un acuífero (cuando éste se contamine por una presa de jales mineros) es:

- NOM-141-SEMARNAT-2003. Que establece los requisitos para la caracterización del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales.

### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1 Muestreo de suelo

Se llevó a cabo un recorrido prospectivo del 13 al 14 de noviembre de 2004 en los campos petroleros: Samaria del Activo Samaria-Luna (antes Distrito Comalcalco), Sánchez Magallanes, Rodador y Cinco Presidentes del Activo Cinco Presidentes (antes Distrito de Agua Dulce). En general se observaron mejores condiciones en las instalaciones petroleras del primero, a diferencia del Activo Cinco Presidentes, hallando en este último tres derrames de petróleo crudo en el municipio de Cárdenas. Esto se puede asociar por una parte, a la antigüedad de las instalaciones, y por otra, al grado de corrosión de los ductos, ya que el lugar presenta condiciones de inundación la mayor parte del año (Figuras III.1, III.2 y III.3).



Figura III.1. Derrame en pozo Sánchez Magallanes No. 212, 50 m al sur, Col. La Trinidad, Cárdenas, Tabasco.



**Figura III.2. Trabajos de restauración en el derrame del pozo Sánchez Magallanes No. 214, a 200 m al noreste de la Batería de separación Sánchez Magallanes 3, Col. La Trinidad, Cárdenas, Tabasco.**



**Figura III.3. Derrame en pozo Rodador No. 4, a 200 m al sureste de la Batería de separación Rodador, Col. El Pailebot, Cárdenas, Tabasco.**

El 16 de agosto de 2005 se llevó a cabo el muestreo de suelo contaminado con petróleo crudo por un derrame relativamente reciente (año y medio), que se produjo por rotura de un oleoducto en el Campo petrolero Cinco Presidentes en el Ejido Ley Federal de la Reforma Agraria, Municipio de Cárdenas, Tabasco. El derrame se ubicó en una zona agrícola (propiedad del Sr. Ruperto Landeros Izquierdo) cerca del pozo 159, las coordenadas geográficas son  $18^{\circ} 12' 13''$  latitud Norte y  $94^{\circ} 1' 0.5''$  longitud Oeste (UTM: 2,012,891.84 Norte y 392,476.98 Este), como referencia se pueden tomar la batería de separación 1 y los pozos 153 y 155 (Figura II.2). Durante el muestreo se removió la cubierta vegetal que básicamente consistió en pastizal y malezas; se excavó hasta encontrar las manchas de petróleo crudo en el suelo ya que superficialmente no había indicios de contaminación; sin embargo, a mayor profundidad las manchas de petróleo fueron cada vez más evidentes, llegando incluso hasta el nivel freático que en esta zona se caracteriza por ser muy somero (0.8 a 1 m) y en el que se observó claramente el agua subterránea y el crudo. El suelo se obtuvo entre los 10 y los 80 cm de profundidad y se colocó en bolsas de plástico y éstas dentro de costales para transportarse vía terrestre al Laboratorio de Bioprocesos e Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM (Ciudad Universitaria, Distrito Federal). En total se recolectaron aproximadamente 250 kg de suelo contaminado con petróleo crudo en peso húmedo (Figuras III.4, III.5 y III.6).



**Figura III.4. Muestreo de suelo contaminado, cerca del pozo 159 del campo petrolero Cinco Presidentes, Ejido Ley Federal de la Reforma Agraria, Cárdenas, Tabasco.**



**Figura III.5. Suelo y agua subterránea contaminados con petróleo crudo (1 m de profundidad).**



**Figura III.6. Suelo contaminado para experimentación.**

### III.2 Caracterización física, química y biológica del suelo

El suelo se extendió y homogeneizó sobre un plástico (Figura III.7). Mediante la técnica del cuarteo se tomó una muestra compuesta de 3 kg para hacer la caracterización física, química y microbiológica del suelo de acuerdo con las especificaciones de cada parámetro con suelo húmedo, ó, suelo seco y tamizado (tamiz No. 10). La determinación de los parámetros listados en la Tabla III.1 se realizó en varios lugares: Laboratorio de Bioprocesos e Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería, Laboratorio de Edafología Ambiental del Instituto de Geología y Laboratorio de Dinámica de Suelos del Posgrado en Ingeniería de la UNAM, excepto HTP, HAP, sodio, potasio, calcio y magnesio, en este caso se enviaron las muestras correspondientes para su determinación en frascos de vidrio con sello y tapa de teflón a un laboratorio acreditado (Laboratorios ABC Química Investigación y Análisis S.A. de C.V.). La determinación de cada parámetro se hizo por duplicado. Todos los resultados de concentración están dados en base seca.



Figura III.7. Mezclado de suelo (250 kg peso húmedo).

**Tabla III.1. Parámetros físicos, químicos y biológicos del suelo.**

Parámetro	Método/fundamento	Referencia
Contenido de agua <sup>(1)</sup>	Método de estufa por gravimetría	NOM-021-RECNAT-2000
Capacidad de retención de agua <sup>(1)</sup>	Drenado en maceta-gravimetría	Reyes, 1996
Color (en seco y en húmedo) <sup>(2)</sup>	Carta Munsell	NOM-021-RECNAT-2000
Granulometría <sup>(3)</sup>	Método de cribado por mallas	ASTM, 1998 D422-63
Textura <sup>(2)</sup>	Método de Bouyocus	Reyes, 1996 (modificada*)
Densidad real <sup>(1)</sup>	Método del picnómetro	NOM-021-RECNAT-2000 (modificada*)
Densidad aparente <sup>(1)</sup>	Método de la probeta	Gandoy, 1990
Porosidad <sup>(1)</sup>	Indirecto por densidades real y aparente	Gavande, 1991
pH a 25°C (en agua) <sup>(2)</sup>	Método electrométrico	NOM-021-RECNAT-2000
Conductividad eléctrica a 25°C <sup>(2)</sup>	Método de la pasta saturada-conductímetro	NOM-021-RECNAT-2000
Carbono orgánico y materia orgánica <sup>(1)</sup>	Método de Walkley-Black	NOM-021-RECNAT-2000
HTP fracción pesada (C>18) <sup>(4)</sup>	Extracción con hexano-sulfato de sodio anhidro (para eliminar agua de la muestra)-purificación con sílica gel-gravimetría	EPA 9071b-1996 y EPA 1664a-1996
HAP <sup>(4)</sup>	Extracción con cloruro de metileno/acetona-sulfato de sodio anhidro (para eliminar agua de la muestra)-HPLC	EPA-8310-1986
Nitrógeno total <sup>(2)</sup>	Analizador Elemental CNHS/O Perkin Elmer 2400 Series II	
Fósforo disponible <sup>(2)</sup>	Método de Bray y Kurtz	Van Reeuwijk, 1992
Relación C:N:P <sup>(1)</sup>	Relaciones porcentuales (C a partir de 80% HTP)	Fahnestock <i>et al.</i> , 1998
Sodio, potasio, calcio y magnesio <sup>(4)</sup>	Digestión ácida-ICP/AES	EPA 3051-1996 y EPA 6010B-1996
Bacterias aerobias <sup>(1)</sup>	Cuenta de bacterias aerobias en placa	NOM-110-SSA1-1994 y NOM-092-SSA1-1994
Actividad microbiana por respirometría (CO <sub>2</sub> ) <sup>(1)</sup>	Titulación ácido-base	Alef, 1998

Lugar donde se hizo la determinación:

1.-Laboratorio de Bioprocesos e Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería, UNAM

2.-Laboratorio de Edafología Ambiental del Instituto de Geología, UNAM

3.-Laboratorio de Dinámica de Suelos del Posgrado en Ingeniería, UNAM

4.-Laboratorios ABC

\*Previo eliminación de hidrocarburos del petróleo y materia orgánica (extracción con hexano y oxidación con peróxido de hidrógeno 8%, respectivamente).

Es importante mencionar que por la alta hidrofobicidad del suelo seco, se modificaron las técnicas para la determinación de textura y densidad real, ya que fue necesario eliminar los hidrocarburos previo a la oxidación de la materia orgánica para evitar la formación de agregados, para lo cual se hizo una extracción de los hidrocarburos del petróleo con hexano en equipo Soxhlet y posteriormente se oxidó la materia orgánica con peróxido de hidrógeno (8%). En la Figura III.8 se puede ver que al agregar agua al suelo seco, éste no se moja, de hecho se forma un charco de agua, por otro lado, cuando se agrega suelo a un recipiente con agua, se forman grumos o capas de suelo que tampoco se mojan.

A)



B)



**Figura III.8. Hidrofobicidad del suelo: A) charco de agua en suelo y B) grumos de suelo en agua.**



### III.3 Técnicas de saneamiento

#### III.3.1 Métodos biológicos

Se realizaron tres tratamientos de tipo biológico, para lo cual se pesaron muestras de 6 kg de suelo base seca que se colocaron en charolas de aluminio de 46 cm de largo, 37.5 cm de ancho y 5.5 cm de alto. El primer tratamiento fue el control o no estimulado, para fines de esta tesis se denominó “atenuación natural”, y consistió en mantener el sistema aireado y con un contenido de agua de 16% (base seca). En el segundo tratamiento, además de mantener las mismas condiciones que el anterior se estimuló con nutrimentos, “biorremediación con nutrimentos”, y en el último caso, la estimulación se hizo con nutrimentos y con un tensoactivo no iónico (EW600), “biorremediación con nutrimentos-tensoactivo”. Cada tratamiento se hizo por duplicado y la asignación de los mismos a cada charola se realizó aleatoriamente. De cada charola se tomó una muestra compuesta (cuarteo) a los 15, 30, 60 y 140 días para analizar cada variable de respuesta: concentración de HTP, cantidad de bacterias aerobias y actividad microbiana por respirometría (CO<sub>2</sub>) (Tabla III.2, Figura III.9).

**Tabla III.2. Condiciones experimentales de los tratamientos biológicos.**

Tratamiento	Condiciones	Unidad experimental	Variables de respuesta analizadas (15, 30, 60 y 140 días):			No. de réplicas
1.-Atenuación natural (tratamiento no estimulado o control)	Aireación, 16% de contenido de agua	Charola con 6 kg de suelo	Concentración de HTP en suelo (mg/kg)	Cantidad de bacterias aerobias (UFC/g)	Actividad microbiana por respirometría (mg CO <sub>2</sub> /kg/hr)	2
2.-Biorremediación con nutrimentos	Aireación, 16% de contenido de agua, relación* C:N:P 100:10:1					2
3.- Biorremediación con nutrimentos-tensoactivo	Aireación, 16% de contenido de agua, relación* C:N:P 100:10:1, 20 mg EW600/kg de suelo					2

\*Carbono a partir del 80% HTP



**Figura III.9. Unidades experimentales de tratamientos biológicos (atenuación natural, biorremediación con nutrimentos y biorremediación con nutrimentos-tensoactivo).**

En el caso de los tratamientos de biorremediación, una vez que se obtuvieron las concentraciones iniciales de HTP, nitrógeno total y fósforo disponible del suelo en estudio, se realizaron los cálculos correspondientes para determinar la cantidad de nutrimentos requeridos para una relación C:N:P 100:10:1 recomendada para procesos de biorremediación, considerando como única fuente de carbono el 80% de los HTP (Fahnestock *et al.*, 1998; Corona e Iturbe, 2005), cuya concentración fue de 11,176.83 mg/kg. Los resultados indicaron prácticamente ausencia de fósforo disponible (3 mg/kg) y una concentración de nitrógeno total (2,600 mg/kg) tres veces mayor de la proporción antes mencionada, es decir la relación C:N:P fue 100:29:0, por lo que a cada charola (6 kg de suelo) de los tratamientos de biorremediación con nutrimentos y biorremediación con nutrimentos-tensoactivo se agregaron 0.54 g de fosfato de potasio dibásico (grado reactivo) al día 0 y al día 86 del tratamiento. Finalmente en el tratamiento de biorremediación con nutrimentos-tensoactivo además de la fuente de fósforo se agregó el tensoactivo no iónico emulgin 600 (EW600) con el fin de incrementar la biodisponibilidad de los hidrocarburos, a una concentración de 20 mg/kg, con base en un estudio previo de un suelo con características similares

(arenoso), el cual presentó la mejor eficiencia de remoción de HTP (Torres *et al.*, 2005b).

Los tratamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (promedio 18°C) por 140 días, del 19 de octubre de 2005 al 8 de marzo de 2006; durante el periodo de 30 a 60 días (mediados de noviembre a mediados de diciembre) se registraron temperaturas relativamente más bajas (promedio 15.5°C); en los días fríos la temperatura del suelo osciló entre 11 y 16°C, mientras que en los días templados estuvo entre 14 y 17°C. La aireación de cada charola se realizó mezclando diariamente de forma manual; el contenido de agua se mantuvo con un promedio de 16±4% durante el tiempo que duró el proceso (140 días), humectando diariamente o cada tercer día de acuerdo a las necesidades de cada charola.

Las muestras de suelo para la determinación de HTP fracción pesada, se colocaron en frascos de vidrio con sello y tapa de teflón y se enviaron a un laboratorio acreditado (Laboratorios ABC); el procedimiento consiste en extraer en hexano en equipo Soxhlet (secar el suelo mezclándolo con sulfato de sodio anhidro), seguida de la purificación del extracto con sílica gel, para finalmente hacer la determinación gravimétrica. Para la cuantificación de bacterias aerobias se hicieron diluciones decimales ( $1 \times 10^{-1}$ - $1 \times 10^{-8}$ ) a partir de 1 g de suelo húmedo (16% aproximadamente) de cada charola, cada dilución se sembró por inmersión en Agar Soya Trypticaseína (TSA) por duplicado, incubando a 37°C por 24 horas. Para corroborar la esterilidad del medio de cultivo se incluyó un blanco. Por último, se seleccionaron para el conteo las cajas petri que tenían entre 25 y 250 UFC (Figura III.10). Por otra parte, se determinó por duplicado el CO<sub>2</sub> generado durante 24 y 48 horas en cada charola; el método consiste en la estimación del CO<sub>2</sub> generado durante la incubación de 50 g de suelo húmedo (16% aproximadamente) a 25°C en un sistema cerrado que contiene una solución de NaOH, que posteriormente se titula con HCl. Por cada charola y por cada tiempo de incubación se hizo un blanco (sin suelo) (Figura III.11).



**Figura III.10. Determinación de bacterias aerobias por cuenta en placa (NOM-110-SSA1-1994 y NOM-092-SSA1-1994).**



**Figura III.11. Determinación de la actividad microbiana por respirometría (CO<sub>2</sub>) (Alef, 1998).**

### III.3.2 Métodos fisicoquímicos

Por otra parte se realizaron seis tratamientos de tipo fisicoquímico, en este caso se probaron tres soluciones de lavado, agua y dos tensoactivos no iónicos al 1% (TW80 y EW600), mediante lavado mecánico así como por inundación. Se colocaron muestras de 8 kg de suelo base seca en cajones de aluminio (43.5 cm de largo por 28.5 cm de ancho y 12.8 cm de alto) y se agregó agua hasta saturar el suelo. Cada tratamiento se hizo por duplicado y la asignación de los mismos a cada cajón se realizó aleatoriamente.

El muestreo se realizó cada determinado número de ciclos de lavado para determinar la concentración de HTP tanto en el suelo (EPA 9071b-1996 y EPA 1664a-1996) como en el efluente (AA-117-SCFI-2001 y EPA 418.1-1978); cada matriz (muestra compuesta de 80 g de suelo y 1 L de efluente de enjuague, respectivamente) se colocó en un frasco de vidrio con sello y tapa de teflón, en el caso del agua se acidificó con ácido sulfúrico al 50% hasta un  $\text{pH} \leq 2$ . Dichas muestras se enviaron para su análisis a un laboratorio acreditado (Laboratorios ABC) (Tabla III.3, Figura III.12).

Como ya se dijo anteriormente, el procedimiento para determinar HTP fracción pesada en suelo, consiste en hacer la extracción en hexano utilizando equipo Soxhlet (secar el suelo mezclándolo con sulfato de sodio anhidro), seguida de la purificación del extracto con sílica gel, para finalmente hacer la determinación gravimétrica. En el caso de la matriz acuosa, la extracción se hace con embudo de separación utilizando como disolvente el tetracloruro de carbono (separar fases filtrando en sulfato de sodio anhidro), también se utiliza sílica gel para purificar el extracto y la determinación se hace por espectrofotometría de infrarrojo.

**Tabla III.3. Condiciones experimentales de los tratamientos fisicoquímicos.**

Tratamiento	Condiciones	Unidad experimental	Variables de respuesta analizadas		No. de réplicas
1.-Lavado de suelo por inundación con agua	Cada ciclo de lavado consistió en: inundar el suelo con 5 L de la correspondiente solución de lavado (agua, TW80 1% o EW600 1%), seguidos de 5 L de agua de enjuague, drenando en ambos casos el efluente en forma continua	Cajón con 8 kg de suelo	Al concluir el séptimo y catorceavo ciclo de lavado: concentración de HTP en suelo (mg/kg)	Al concluir el séptimo y catorceavo ciclo de lavado: concentración de HTP en el efluente de enjuague (mg/L)	2
2.-Lavado de suelo por inundación con TW80 1%					2
3.-Lavado de suelo por inundación con EW600 1%					2
4.-Lavado de suelo mecánico con agua.....	Cada ciclo de lavado consistió en: poner en contacto durante 24 h el suelo con 5 L de la correspondiente solución de lavado (agua, TW80 1% o EW600 1%) dentro de la mezcladora mecánica, de las cuales, las primeras 4 h fueron de mezclado continuo. Se drenó el efluente y se procedió de la misma manera con los 5 L de agua de enjuague		Al concluir el primero, segundo, tercero y cuarto ciclos de lavado: concentración de HTP en suelo (mg/kg)	Al concluir el primero, segundo, tercero y cuarto ciclos de lavado: concentración de HTP en el efluente de enjuague (mg/L)	2
5.-Lavado de suelo mecánico con TW80 1%					2
6.-Lavado de suelo mecánico con EW600 1%					2

TW80 tensoactivo no iónico tween 80 (monooleato de sorbitán etoxilado)

EW600 tensoactivo no iónico emulgín 600 (nonilfenol etoxilado)



**Figura III.12. Unidades experimentales de tratamientos fisicoquímicos (lavado de suelo por inundación y lavado mecánico).**

### ***A Lavado de suelo por inundación***

Se probaron tres tratamientos, en el primero la solución de lavado fue agua corriente (de la llave), y para los otros dos se utilizaron soluciones de tensoactivos no iónicos a una concentración del 1% en agua corriente, con tween 80 (TW80) (Canamex S.A. de C.V., México) y emulgín 600 (EW600) (Polaquimia, México). Dichos tensoactivos se seleccionaron porque en un estudio similar se obtuvieron altas eficiencias de remoción de HTP: 48.96% con EW600 1% y 36.13% con TW80 0.5% (López, 2004). Cada ciclo de lavado consistió en agregar al suelo cinco litros de la correspondiente solución de lavado, seguida de cinco litros de agua de enjuague; drenando en ambos casos el efluente en forma continua mediante una válvula de rosca adaptada en la parte inferior del cajón, y que estaba conectada con una manguera de látex a una cubeta. El muestreo de suelo y del efluente para el análisis de HTP se realizó al concluir el séptimo y catorceavo ciclo de lavado (una vez que salieron aproximadamente los 5 L de agua de enjuague). Cabe mencionar que el análisis de HTP en el efluente se realizó en el agua de enjuague y no en la solución de lavado para evitar interferencias por el tensoactivo. La solución de lavado y posteriormente el agua de enjuague se contuvo en un tanque elevado, del que bajaba por gravedad el líquido a través de una tubería de manguera con dosificador y válvulas tipo venoclisis para regular el flujo hacia el cajón de tal manera que el sistema se mantuviera inundado todo el tiempo, drenando continuamente el líquido que contenía el contaminante por medio de una válvula de rosca adaptada en la parte inferior del cajón. El efluente se colectó en cubetas de plástico de 12 litros de capacidad, por medio de una manguera de látex conectada a la válvula de rosca; acondicionando un filtro para evitar pérdida de suelo en la salida del cajón que consistió en pegar con silicón un parche rectangular con tela de ropa de cirujano (4cm X 6cm), seguida de una malla metálica de las dimensiones de largo y ancho del cajón que sirvió como sostén de una capa de 1 cm de espesor de gravilla (3/8 in) y por último otra malla metálica que separara la gravilla de los 8 kg de suelo (Figura III.13).

De acuerdo con las velocidades de infiltración de cada cajón se fueron agregando las correspondientes soluciones de lavado con sus respectivos enjuagues. En un principio como se había planeado se hicieron pasar continuamente cinco litros de solución de lavado en 12 horas y cinco litros de agua de enjuague en las 12 horas siguientes. Sin

embargo, en los tratamientos con tensoactivo (TW80 y EW600) a partir de la sexta aplicación de la solución de lavado, la velocidad de infiltración cada vez fue menor tardando incluso una semana en pasar lo cinco litros y otra semana en pasar los cinco litros de agua de ejuague. De acuerdo a las necesidades de cada cajón se trató de destapar la válvula por medio de la inyección de aire y/o agua por retrolavado.



Figura III.13. Lavado de suelo por inundación.



### ***B Lavado de suelo mecánico***

Se probaron las mismas soluciones de lavado que en el caso anterior. Se utilizó una mezcladora mecánica diseñada y construida especialmente para esta técnica de saneamiento a nivel laboratorio, que consiste básicamente en un tanque para 10 litros de capacidad con un eje central con 10 paletas que se hacen girar por medio de un motor a 25 rpm (Figura III.14). El muestreo de suelo y del efluente para el análisis de HTP se realizó al concluir el primero, segundo, tercero y cuarto ciclos de lavado.



**Figura III.14. Mezcladora mecánica para lavado de suelo (escala laboratorio: 10 L de capacidad).**

El ciclo de lavado consistió en poner en contacto durante 24 horas el suelo con los cinco litros de la correspondiente solución de lavado dentro de la mezcladora mecánica, de las cuales las primeras cuatro horas fueron de mezclado continuo. Transcurrido el tiempo de contacto se decantó el efluente por medio de un orificio en la parte lateral del tanque hacia un recipiente, dejando sedimentar (2-4 horas) las partículas de suelo de mayor tamaño para regresarlas posteriormente a la mezcladora. Después se adicionaron los cinco litros de agua de enjuague y se procedió de la

misma manera, para finalmente tomar las muestras de suelo y del efluente para el análisis de HTP. Al igual que en el lavado por inundación el análisis de HTP en el efluente se realizó en el agua de enjuague (Figuras III.15 y III.16).

Cabe mencionar que después de terminar los 4 ciclos de lavado para cada unidad experimental, la mezcladora se lavó con agua y jabón, después se limpió con estopa impregnada con hexano y nuevamente con jabón y abundante agua, ya que al separarse el petróleo del suelo se quedaba adherido en las paredes de la mezcladora. Este fenómeno se presentó principalmente al utilizar el tensoactivo TW80, que incluso se tuvo que utilizar espátula para retirar el hidrocarburo incrustado (Figura III.17); en el caso del EW600 se observó mayor solubilización del petróleo, lo cual es muy importante considerar en el diseño de un sistema de tratamiento de este tipo de aguas residuales.



Figura III.15. Lavado de suelo mecánico con tensoactivo.



Figura III.16. Drenado del efluente en el lavado de suelo mecánico.



Figura III.17. Incrustación del petróleo en la mezcladora mecánica al utilizar el  
tensoactivo TW80 1%.

### III.4 Diseño de experimentos y análisis estadístico

Es importante definir algunos términos que se utilizan en el análisis estadístico para facilitar la interpretación de los resultados. El término "tratamiento" se usa para denominar los diferentes procesos cuyos efectos van a ser medidos y comparados, y el término "unidad experimental" para representar el conjunto de material al cual se aplica un tratamiento en un solo ensayo (Cochran y Cox, 1991). Generalmente para que un experimento sea estadísticamente confiable se realizan "réplicas o repeticiones" de las unidades experimentales (Kuehl, 2001). De acuerdo con lo anterior se llevaron a cabo tres tratamientos de tipo biológico y seis de tipo fisicoquímico, todos ellos con 2 réplicas, dando un total de 18 unidades experimentales (Tablas III.2 y III.3).

Cuando se comparan tratamientos con el fin de seleccionar el mejor desde el punto de vista técnico, es necesario sustentarlo estadísticamente. La variación producida por factores distorsionantes, tanto conocidos como desconocidos, se denomina error experimental, normalmente solo una pequeña parte de él puede ser atribuido a error en la medición. Los efectos adversos del error experimental pueden reducirse mucho mediante el análisis y diseño experimental adecuados (Box *et al.*, 2000). El bloqueo es un medio para reducir y controlar la varianza del error experimental con el fin de lograr una mayor precisión (Kuehl, 2001).

Dado que el objetivo del presente estudio es seleccionar una técnica de remediación apropiada ya sea de tipo biológico o fisicoquímico, para un suelo contaminado con petróleo crudo basándose en la eficiencia de remoción de HTP (%), los nueve tratamientos que se llevaron a cabo por duplicado, se agruparon de acuerdo con el criterio de muestreo de la variable de respuesta en estudio, utilizando para su análisis el modelo estadístico con un solo factor en un diseño en bloques completos al azar (Gutiérrez y de la Vara, 2004). De esta manera en los tratamientos biológicos: atenuación natural, biorremediación con nutrientes y biorremediación con nutrientes-tensoactivo, los bloques correspondieron a los 15, 30, 60 y 140 días; mientras que en los tratamientos de lavado de suelo por inundación: con agua, TW80 y EW600 los bloques fueron al séptimo y catorceavo ciclo de lavado, y finalmente, en los tratamientos de lavado de suelo mecánico: con agua, TW80 y EW600 los bloques correspondieron al primero, segundo, tercero y cuarto ciclo de lavado. En los tres

casos el análisis de varianza (ANOVA) de los tratamientos se realizó, previa la comprobación de los supuestos: independencia, normalidad y homogeneidad de variancias. Finalmente, cuando se rechazó la igualdad de medias de tratamientos en el análisis de varianza ( $P < 0.05$ ), se utilizaron pruebas de rangos múltiples (Diferencia mínima significativa) para identificar diferencias significativas entre pares de tratamientos.

Por otra parte en los métodos biológicos, se obtuvo el coeficiente de correlación lineal de Pearson entre los HTP removidos y el  $\text{CO}_2$  generado.

### III.4.1 Diseño en bloques completos al azar

En un diseño en bloques completos al azar se consideran tres fuentes de variabilidad: el factor de tratamiento, el factor bloque y el error aleatorio, es decir, se tienen tres posibles responsables de la variabilidad presente en la variable de respuesta evaluada. La palabra completo en el nombre del diseño se debe a que en cada bloque se prueban todos los tratamientos, es decir, que los bloques están completos. La aleatorización se hace dentro de cada bloque; no se realiza de manera total como en el diseño completamente al azar (Gutiérrez y de la Vara, 2004). Cuando se tienen unidades experimentales múltiples (en este caso duplicados de cada tratamiento), la variabilidad también se puede deber a la unidad experimental. El modelo lineal para un experimento con  $u$  unidades experimentales con cada tratamiento  $t$  en cada uno de los  $b$  bloques es:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \rho_j + (\tau\rho)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, b \\ k = 1, 2, \dots, u \end{cases}$$

$Y_{ijk}$  =  $j$ -ésima observación para el tratamiento  $i$ , de la  $k$ -ésima unidad experimental

$\mu$  = media general

$\tau_i$  = efecto del tratamiento  $i$

$\rho_j$  = efecto del bloque  $j$

$(\tau\rho)_{ij}$  = efecto de interacción entre tratamiento  $i$  y bloque  $j$ , en este tipo de diseño no debe existir, en otras palabras los efectos deben ser aditivos

$\epsilon_{ijk}$  = error experimental

$\epsilon_{ijk}$  son los errores experimentales aleatorios independientes con media 0 y varianza constante  $\sigma^2$  [NID  $(0, \sigma^2)$ ], esta última es la variabilidad entre las unidades experimentales dentro de un bloque que recibió el mismo tratamiento. Los cálculos de las particiones de sumas de cuadrados y la prueba de interacción son los mismos que para un diseño factorial con dos factores. El análisis de varianza para un diseño en bloques completos al azar con réplicas se puede resumir en la Tabla III.4 (Kuehl, 2001).

**Tabla III.4. Análisis de varianza para un diseño en bloques completos al azar con réplicas (Kuehl, 2001).**

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad	Cuadrados medios (CM)
Tratamiento	SC de tratamientos	t-1	CM de tratamientos
Bloque	SC de bloques	b-1	CM de bloques
Interacción tratamientos-bloques	SC de interacción tratamientos-bloques	(t-1)(b-1)	CM de interacción tratamientos-bloques
Error dentro de los grupos (réplicas)	SC del error dentro de grupos	tb(u-1)	CM del error dentro de grupos
Total	SC total	utb-1	

### III.5 Identificación de bacterias

Aparte de la cuantificación del número de bacterias aerobias del suelo, es conveniente identificar las especies que están presentes y que podrían llevar a cabo la biodegradación de los hidrocarburos. La identificación de bacterias del suelo se realizó al finalizar los tratamientos biológicos. Los pasos que se siguieron fueron los siguientes: selección y purificación de colonias bacterianas, tinción de Gram y determinación de morfología celular (cocos o bacilos), aplicación de métodos bioquímicos miniaturizados (BBL Crystal Rapid Gram-positive ID System y API20E) y realización de pruebas complementarias (catalasa, oxidasa y movilidad) (Biomérieux, 2005; BD, 2006) (Figuras III.18, III.19, III.20 y III.21). En el Anexo VII.2 se detalla la metodología.

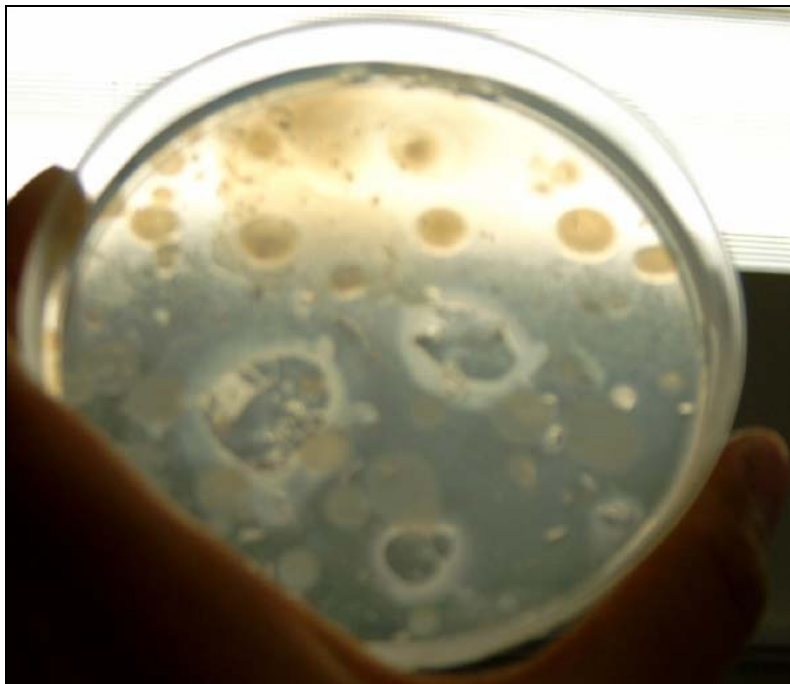


Figura III.18. Selección y purificación de colonias bacterianas.

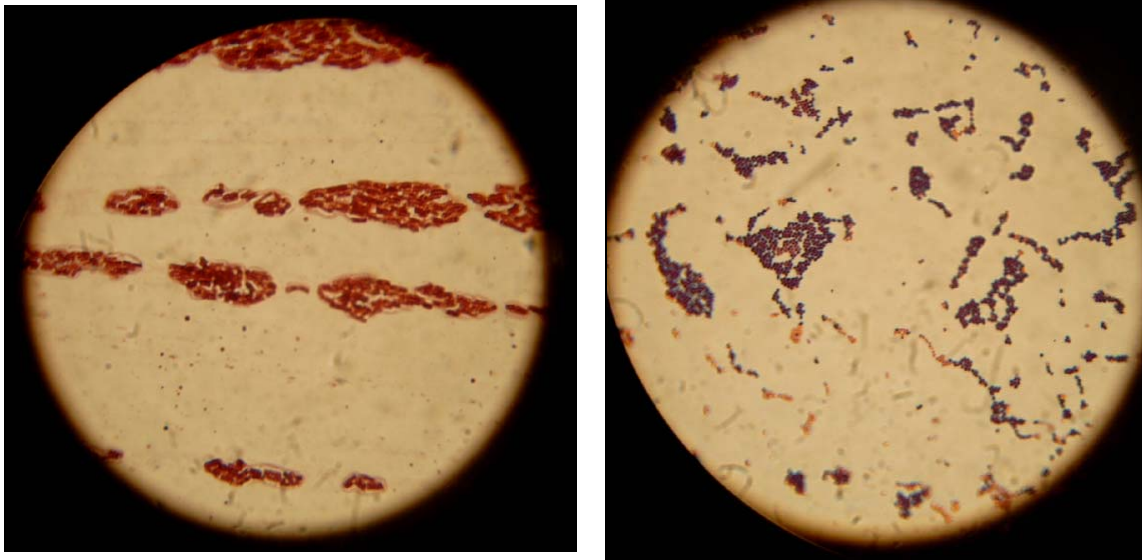


Figura III.19. Tinción de Gram y morfología celular: A) bacilos Gram negativos, B) cocos Gram positivos.

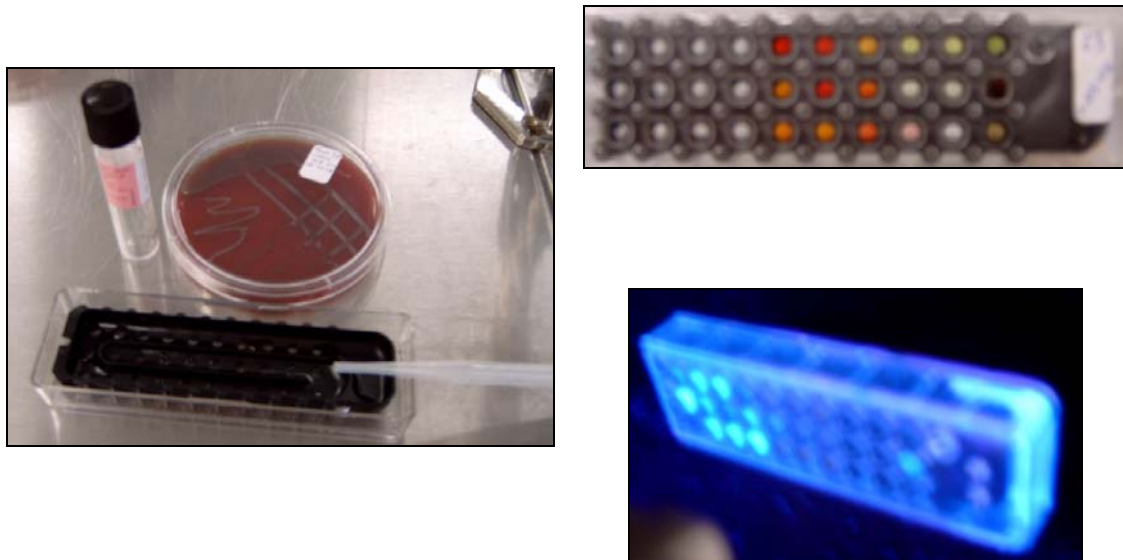


Figura III.20. Identificación de bacterias por medio del método BBL Crystal.



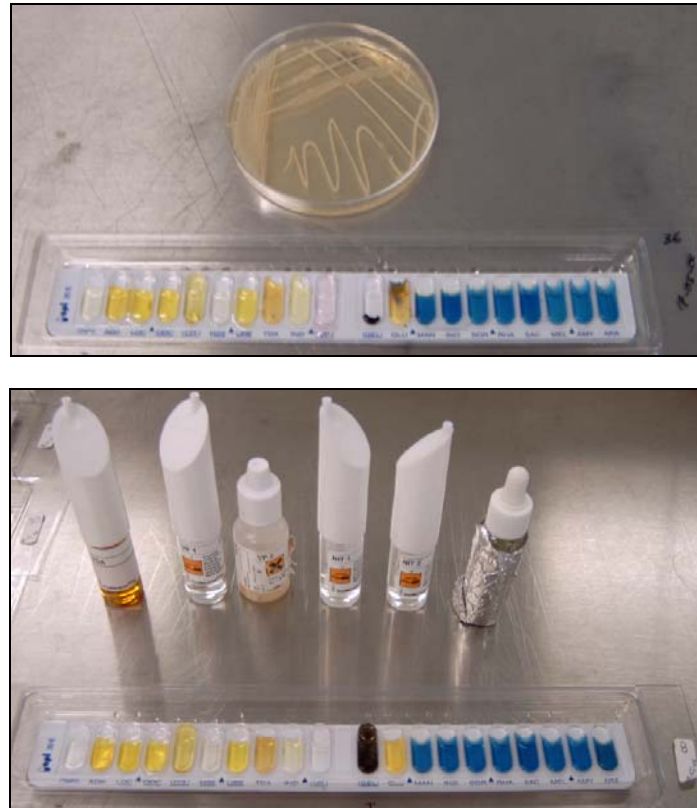


Figura III.21. Identificación de bacterias por medio del método API20E.

## IV RESULTADOS

### IV.1 Caracterización física, química y biológica del suelo

A continuación se describen los resultados de la caracterización física, química y biológica del suelo en estudio. Los resultados de concentración están dados en base seca. (Tabla IV.1). La textura del suelo es arenosa, lo cual se confirmó con el análisis granulométrico, dicha característica es satisfactoria para poder aplicar la técnica de lavado de suelo, ya que ésta se recomienda para suelos con tamaño de partícula grande, a diferencia de los suelos con altos contenidos de arcilla y/o limo en los que se dificulta este tipo de tratamiento (O'Shaughnessy y Blanc, 2000). En el caso de los métodos de biorremediación los materiales muy arcillosos dificultan la aireación adecuada del sistema (Adams *et al.*, 1999), en cuyo caso sería necesario adicionar agentes de volumen para mejorar las condiciones de intercambio de gases. La densidad real fue  $2.71 \text{ g/cm}^3$  y la densidad aparente fue  $1.15 \text{ g/cm}^3$  dando una porosidad de 58%. El contenido de agua fue de 25%, y la capacidad de retención de agua de 22.5%, lo cual indica que las condiciones de aireación no son adecuadas para la biodegradación aerobia de los hidrocarburos, ya que el nivel de humedad óptimo para la actividad biológica en el suelo es de 50 a 70% de la capacidad de retención (Valdez y Medina, 2005), dejando libres por lo menos el 10% de los poros del suelo (Iturbe *et al.*, 2002). Cabe mencionar que en la región donde se hizo el muestreo de suelo, el nivel freático es muy somero (0.8-1 m) y la precipitación es alta ( $> 1,500 \text{ mm}$  anuales), lo cual podría inducir condiciones anaerobias por inundación. El color del suelo fue 10YR2/3 en seco y 10YR4/4 en húmedo.

De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000, el suelo en estudio se trata de un suelo moderadamente ácido (pH 5.1-6.5) y cuyos efectos de salinidad son despreciables ( $< 1 \text{ dS/m}$  a  $25^\circ\text{C}$ ); el valor de materia orgánica fue alto (3.6-6% para suelos no volcánicos), destacando un comportamiento extremadamente hidrofóbico del suelo seco (Figura III.8); en cuanto a la fertilidad, el nivel de contenido de fósforo disponible es bajo ( $< 15 \text{ mg/kg}$ ) pero muy alto de nitrógeno total ( $> 2500 \text{ mg/kg}$ ). Como ya se dijo anteriormente en la metodología, se tuvo que ajustar la relación C:N:P 100:10:1 para los tratamientos estimulados (biorremediación con nutrimentos y biorremediación con nutrimentos-tensoactivo), agregando únicamente una fuente de fósforo, ya que el

nitrógeno se encontró al triple de la proporción necesaria, considerando como única fuente de carbono el 80% de los HTP (Fahnestock *et al.*, 1998; Corona e Iturbe, 2005). En cuanto al sodio, potasio, calcio y magnesio, se encontró que los elementos divalentes ( $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) son 2.6 veces mayores que los monovalentes ( $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ ), lo cual se debe tomar en cuenta en la selección de tensoactivos en el lavado de suelo, sobre todo los de tipo iónico para evitar su precipitación (Torres *et al.*, 2005c; Kuyukina *et al.*, 2003). De los parámetros biológicos evaluados, la cantidad de bacterias aerobias heterótrofas fue de  $3.9 \times 10^5$  UFC/g de suelo, dos ordenes de magnitud mayor que la mínima recomendada por Fahnestock *et al.* (1998) de  $1 \times 10^3$  UFC/g para procesos de biorremediación. La actividad microbiana medida por la generación de  $\text{CO}_2$  fue de 0.94 mg/kg/día, menor que la reportada por Adams *et al.* (2002) para suelos de sabana y suelos aluviales con actividad agrícola intensa de Tabasco (Tabla IV.1). En cuanto a los niveles de contaminación por hidrocarburos, se determinó una concentración de HTP de 11,176.83 mg/kg y de HAP ( $\Sigma 16$  compuestos) de 11.78 mg/kg, con concentraciones individuales por debajo de los Límites Máximos Permisibles (LMP) en los seis que contempla la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (Tabla IV.2).

**Tabla IV.1. Caracterización física, química y biológica del suelo en estudio.**

Parámetro	Valor
Contenido de agua	24.9% *
Capacidad de retención de agua	22.5% *
Color	10YR2/3 (en seco), 10YR4/4 (en húmedo)
Granulometría	arena mal graduada (SP), Cu=1.5, Cc= 1.2
Textura	arena (arena 85.70%, limo 4.55% y arcilla 9.75%)
Densidad real	2.71 g/cm <sup>3</sup> *
Densidad aparente	1.15 g/cm <sup>3</sup> *
Porosidad	57.6% *
pH a 25°C (en agua)	5.98 *
Conductividad eléctrica a 25°C	0.03 dS/m *
Carbono orgánico	3.38% *
Materia orgánica	5.82% *
Nitrógeno total	2,600 mg/kg *
Fósforo disponible	3.01 mg/kg *
Relación C:N:P (C a partir de 80% HTP)	100:29:00
Sodio	81.44 mg/kg
Potasio	188.35 mg/kg
Calcio	260.18 mg/kg
Magnesio	439.85 mg/kg
Bacterias aerobias	3.9X10 <sup>5</sup> UFC/g (± 3X10 <sup>5</sup> ) **
Actividad microbiana (CO <sub>2</sub> )	0.94 mg CO <sub>2</sub> /kg día (± 0.29) **

Cu: coeficiente de uniformidad, Cc: coeficiente de curvatura

\*Valores promedio de dos réplicas. La Diferencia Porcentual Relativa (DPR) fue menor al 5%

\*\* Valores promedio de seis réplicas (± desviación estándar)

**Tabla IV.2. Hidrocarburos del petróleo del suelo en estudio (mg/kg).**

Parámetro	Suelo en estudio	LMP para uso agrícola o residencial (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003)
HTP fracción pesada (C>18)	11,176.83	3,000
Acenafteno	N.D.	-
Acenaftileno	N.D.	-
Antraceno	0.26	-
Benzo(a)antraceno	N.D.	2
Benzo(b)fluoranteno	0.53	2
Benzo(g,h,i)perileno	N.D.	-
Benzo(k)fluoranteno	0.64	8
Benzo(a)pireno	1.49	2
Criseno	0.59	-
Dibenzo(a,h)antraceno	N.D.	2
Fenantreno	1.13	-
Fluoranteno	1.65	-
Fluoreno	N.D.	-
Indeno(1,2,3,c-d)pireno	N.D.	2
Naftaleno	N.D.	-
Pireno	1.92	-

N.D. No Detectado <0.01

- No se contempla en la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003

## IV.2 Variables de respuesta

Tanto en los tratamientos biológicos como en los fisicoquímicos, los resultados obtenidos de las variables de respuesta en función del tiempo ó del número de ciclos de lavado, respectivamente, se reportan los valores promedio de dos réplicas, y en algunos casos sólo los correspondientes a las réplicas seleccionadas; en el Anexo VII.3 se encuentran todos los resultados desglosados de cada variable de respuesta analizada.

### IV.2.1 Métodos biológicos

#### *A Eficiencia de remoción con respecto a HTP*

En los métodos biológicos las concentraciones de HTP disminuyeron gradualmente con el tiempo. En general se observa que tanto la atenuación natural como la biorremediación con nutrientes y con nutrientes-tensoactivo tuvieron un comportamiento similar a los 15, 30, 60 y 140 días, reduciendo la concentración de HTP en el último muestreo (140 días) a 6,889.23, 7,203.94 y 6,779.20 mg/kg, lo que representa eficiencias de remoción de HTP de 38%, 36% y 39%, respectivamente, y tasas de remoción de 30.63, 28.38 y 31.41 mg HTP/kg día, respectivamente (Figuras IV.1 y IV.2, Tabla IV.3). Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos.

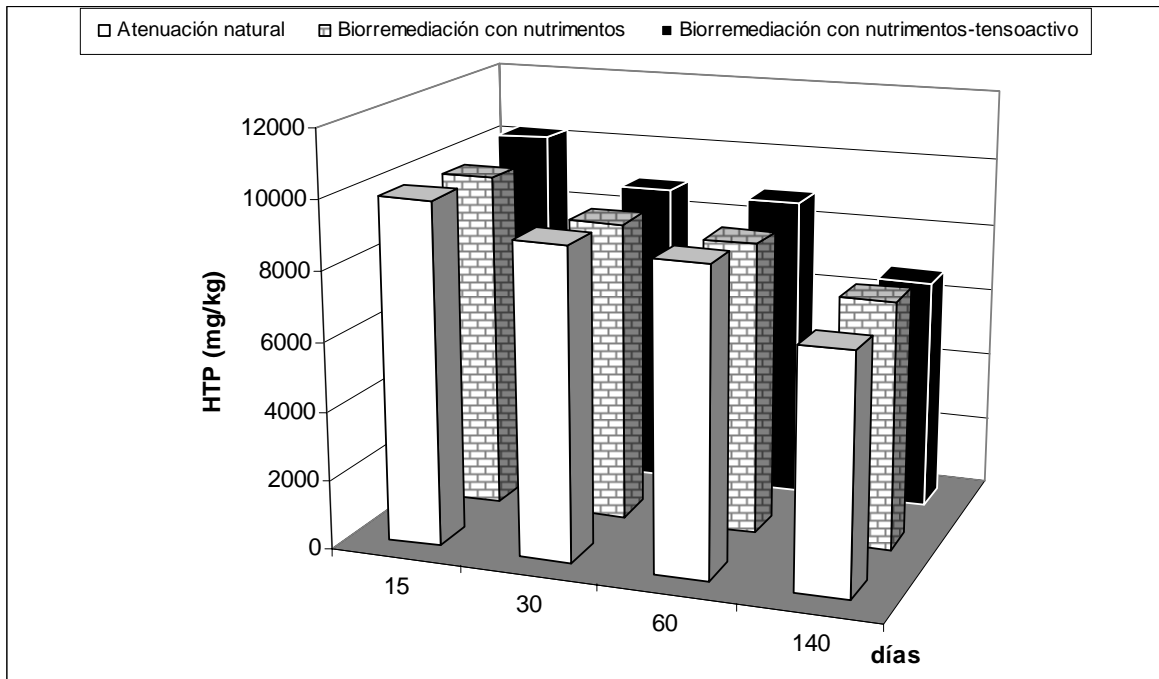


Figura IV.1. Concentración de HTP en suelo de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).

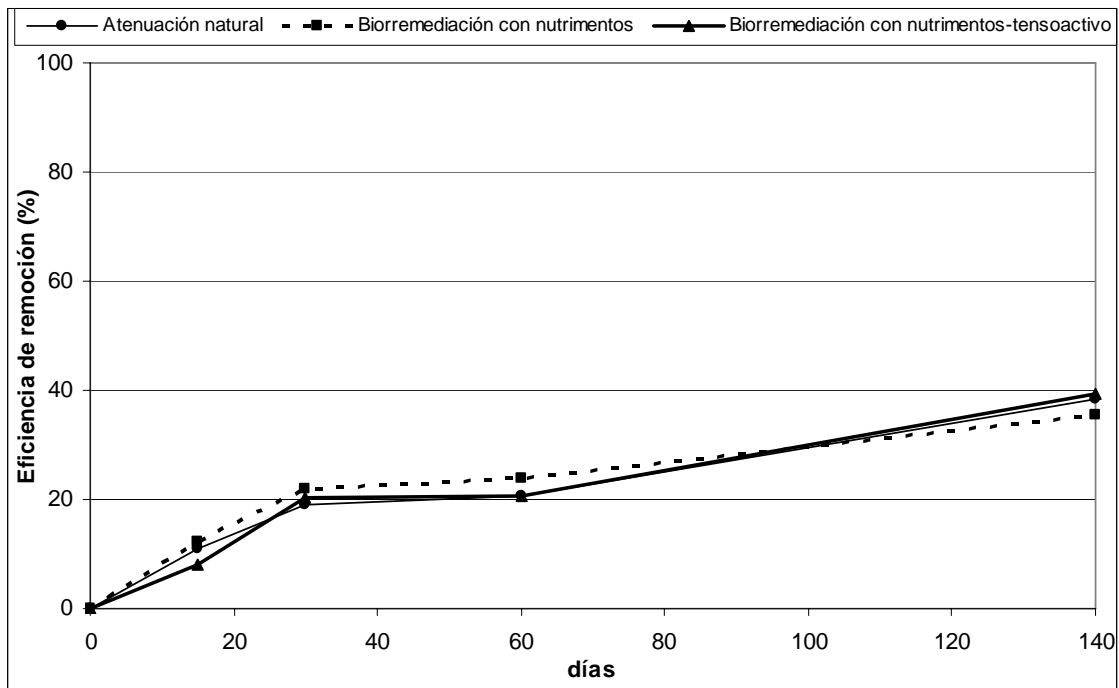
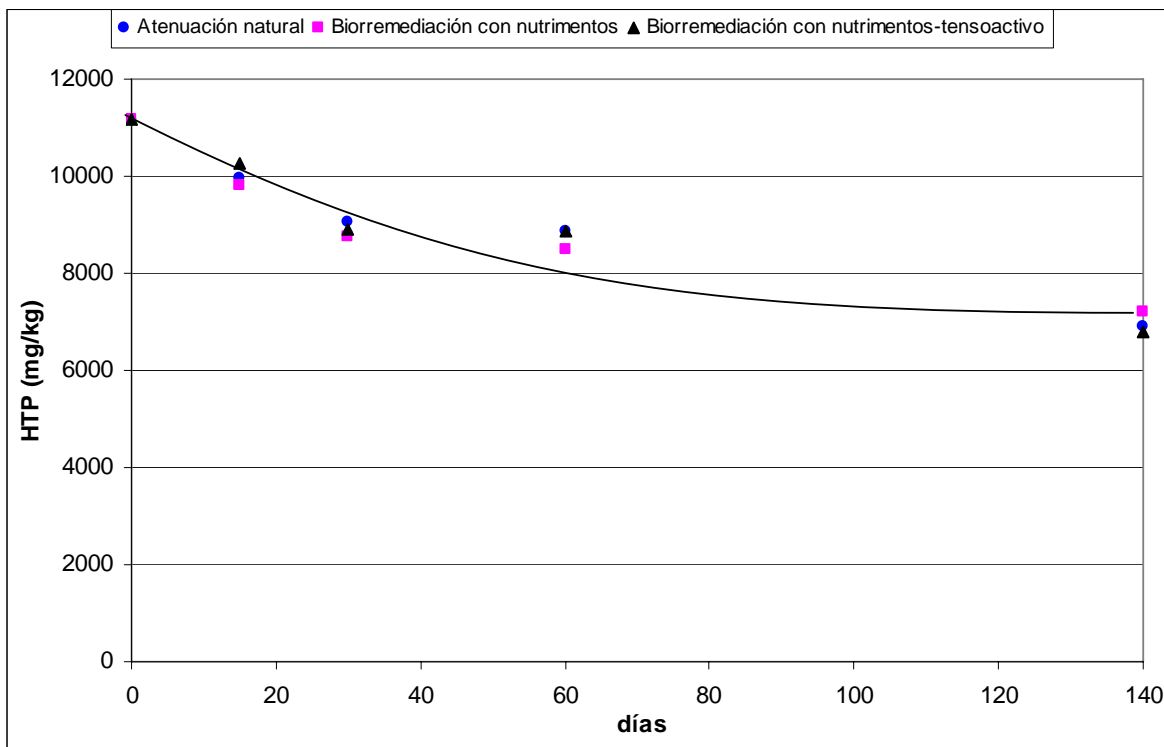


Figura IV.2. Eficiencia de remoción de HTP (%) de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).

**Tabla IV.3. Tasas de remoción (mg/kg día) de tratamientos biológicos.**

Tratamiento	Tasa de remoción (mg HTP/kg día)
Atenuación natural	30.63
Biorremediación con nutrientes	28.38
Biorremediación con nutrientes-tensoactivo	31.41

Las cinéticas de remoción fueron de primer orden ( $r^2 > 0.85$ ), el tiempo estimado para alcanzar la concentración del LMP para suelo agrícola o residencial que es de 3,000 mg/kg (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003) es: 14 meses para atenuación natural, 16 meses para biorremediación con nutrientes y 13 meses para biorremediación con nutrientes-tensoactivo (Figura IV.3 y Tabla IV.4).



**Figura IV.3. Cinéticas de remoción de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).**



**Tabla IV.4. Tiempo estimado de remediación de acuerdo con las cinéticas de remoción de tratamientos biológicos.**

Tratamiento	Cinéticas de primer orden	R <sup>2</sup>	Tiempo para alcanzar el LMP para uso agrícola o residencial (3,000 mg/kg)
Atenuación natural	$HTP = 11,176e^{-0,0031t}$	0.94	14 meses
Biorremediación con nutrimentos	$HTP = 11,176e^{-0,0027t}$	0.86	16 meses
Biorremediación con nutrimentos-tensoactivo	$HTP = 11,176e^{-0,0033t}$	0.94	13 meses

HTP: concentración de HTP al tiempo t (mg/kg)  
t: tiempo (días)

### ***B Actividad microbiana por respirometría (CO<sub>2</sub>)***

La actividad microbiana medida por la cantidad de CO<sub>2</sub> generado fue muy variable en cada muestreo que se realizó en los diferentes tratamientos biológicos (Figura IV.4).

En el caso de atenuación natural, se observó un incremento en la generación de CO<sub>2</sub> a los 15 días de iniciado el tratamiento, con respecto al inicial (0.94 mg CO<sub>2</sub>/kg día). A los 30 días decreció notablemente hasta casi la tercera parte del inicial, posteriormente a los 60 días se observó un ligero incremento y a los 140 días alcanzó una generación de 1.6 mg CO<sub>2</sub>/kg día.

En la biorremediación con nutrimentos existió un decremento y posteriormente un incremento, con un mínimo a los 30 días (0.7 mg CO<sub>2</sub>/kg día) y un máximo al final del tratamiento (1.0 mg CO<sub>2</sub>/kg día) pero que no fue significativo con respecto al inicial.

Finalmente en la biorremediación con nutrimentos-tensoactivo la generación de CO<sub>2</sub> en los diferentes días que se midió, tuvo un comportamiento variable: decremento, incremento, decremento, incremento, pero cabe mencionar que tampoco al final del tratamiento se obtuvo una cantidad significativamente mayor con respecto al inicial (1.0 mg CO<sub>2</sub>/kg día).

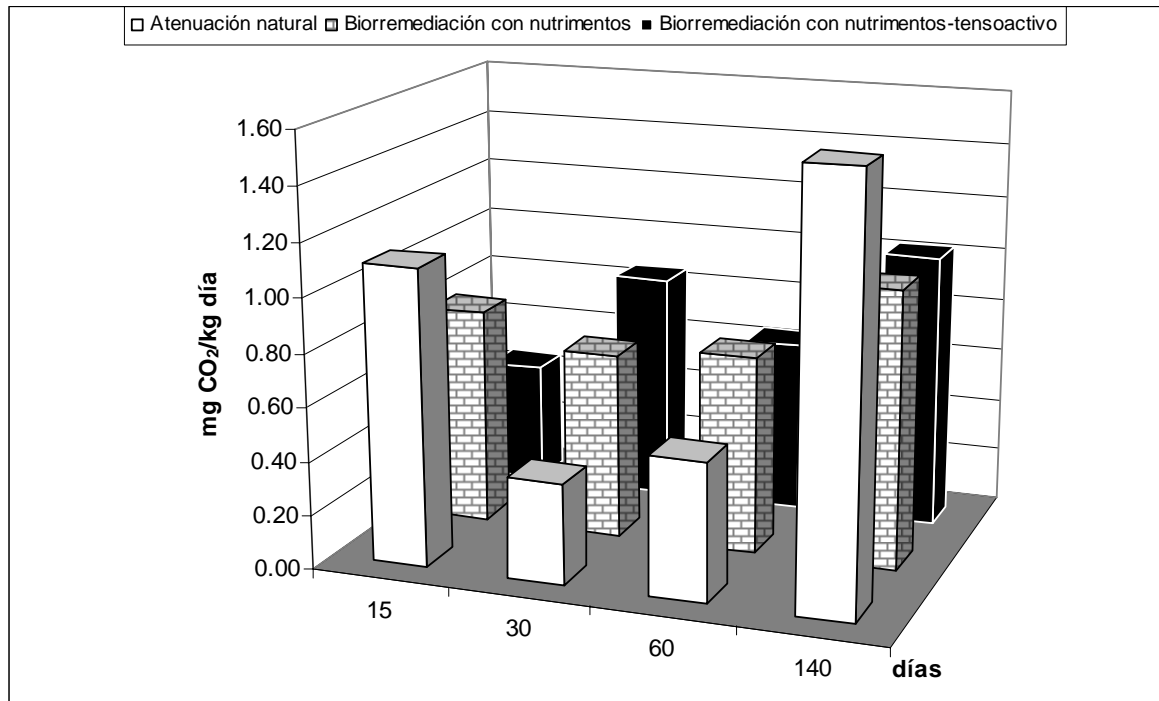


Figura IV.4. Actividad microbiana por respirometría (CO<sub>2</sub>) de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).

Otra forma de analizar la tendencia de generación de CO<sub>2</sub> es por medio de los valores acumulados, en vez de hacerlo de manera puntual en cada día de muestreo; de esta manera se puede estimar la cantidad total de CO<sub>2</sub> que se generó durante un cierto tiempo a partir de los hidrocarburos presentes en el suelo, y además se puede evaluar si existe correlación entre estas dos variables.

En la Figura IV.5 se muestra el CO<sub>2</sub> acumulado (mg/kg) para los tres tratamientos biológicos a los 15, 30, 60 y 140 días. La tendencia de la generación de CO<sub>2</sub> acumulado durante los 140 días se puede considerar lineal en los tres casos, ya que el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) es  $> 0.9$ , sin embargo, se puede ver que en los primeros 30 días la generación también sigue una tendencia lineal ( $r^2 > 0.9$ ) pero más pronunciada que en los 110 días restantes, lo cual se puede corroborar por sus pendientes, que representan la tasa de generación de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub>/kg día) durante el tratamiento (Kim *et al.*, 2005; Plaza *et al.*, 2005). Si se utilizan los valores de ordenada al origen y pendiente de la ecuación para cada intervalo de tiempo, se puede estimar la generación total de CO<sub>2</sub> durante todo el tiempo de tratamiento (Anexo VII.4). De

esta manera se tiene que para cada tratamiento biológico se generaron en total 434.88, 429.04 y 393.21 mg CO<sub>2</sub>/kg para atenuación natural, biorremediación con nutrimentos y biorremediación con nutrimentos-tensoactivo, respectivamente (Figura IV.6).

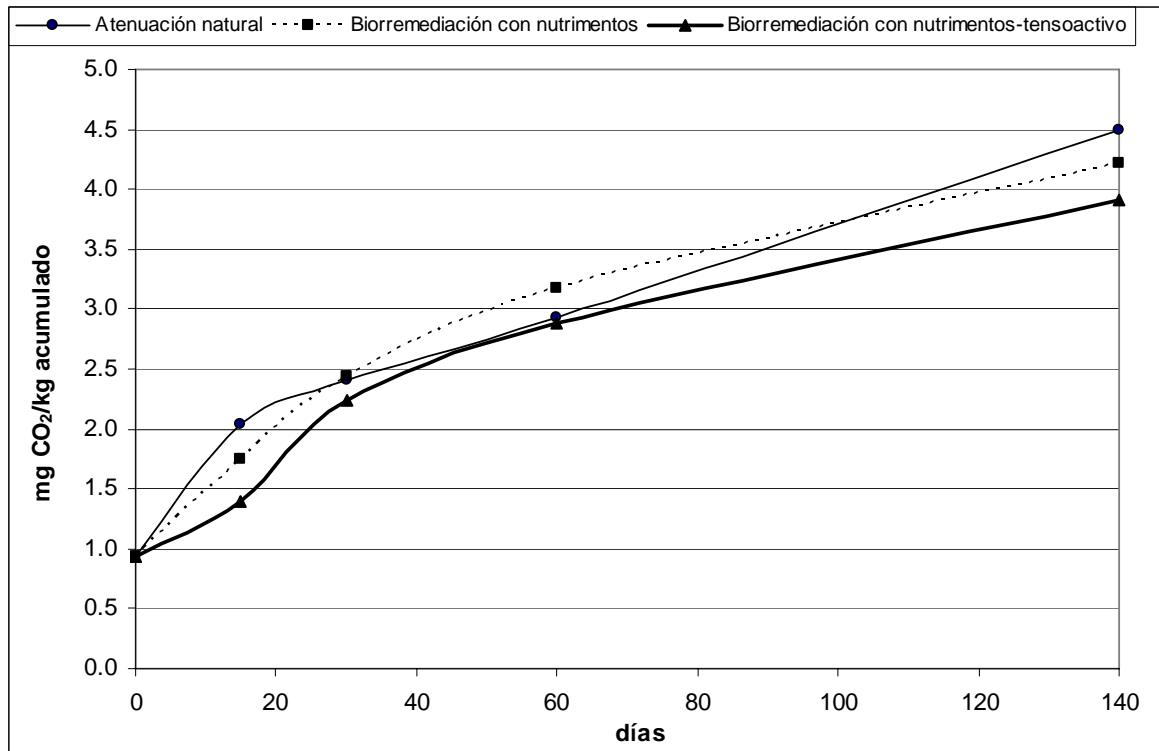
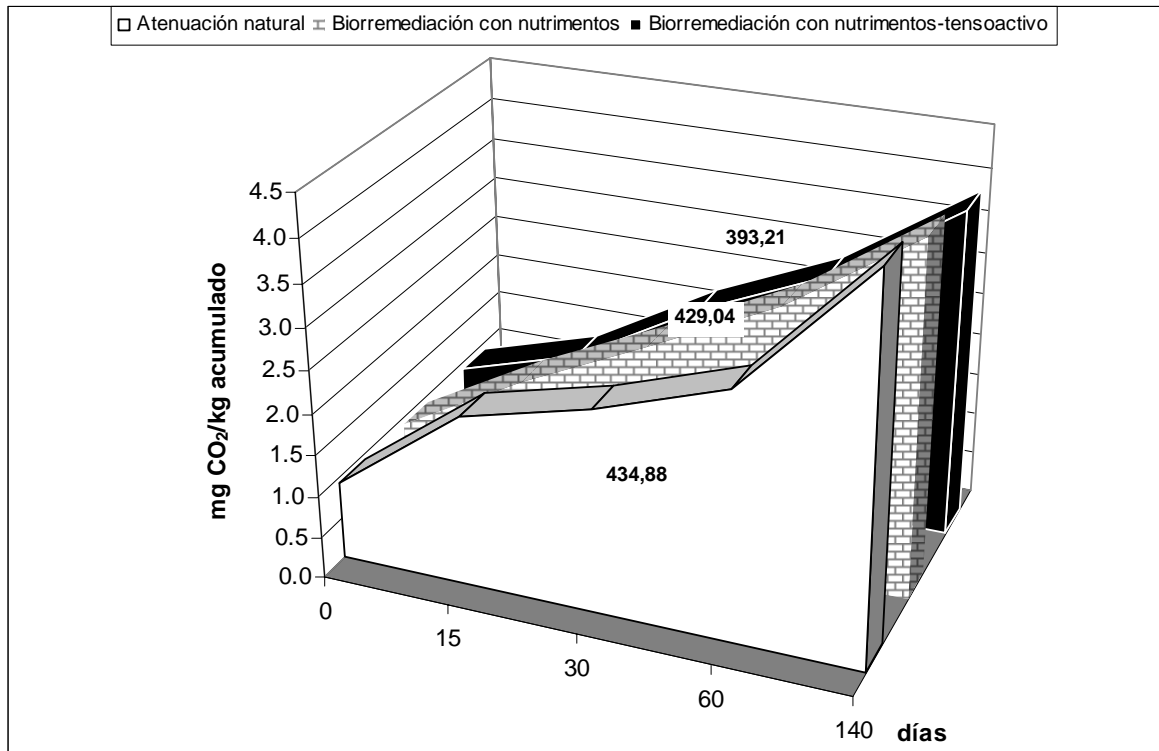


Figura IV.5. CO<sub>2</sub> acumulado medido (mg CO<sub>2</sub>/kg) en tratamientos biológicos.



**Figura IV.6. CO<sub>2</sub> acumulado total estimado (mg CO<sub>2</sub>/kg) en tratamientos biológicos.**

Considerando que en cada tratamiento se utilizaron 6 kg de suelo, se puede calcular la cantidad de CO<sub>2</sub> generado (medido y estimado) para el intervalo considerado, así como también la cantidad de HTP removidos (Tablas IV.5, IV.6 y IV.7). De esta manera se pueden correlacionar ambas variables, en este caso sí se encontró correlación lineal ( $r^2 > 0.95$ ) (Figuras IV.7, IV.8 y IV.9).

**Tabla IV.5. CO<sub>2</sub> generado total medido (mg CO<sub>2</sub>) en tratamientos biológicos.**

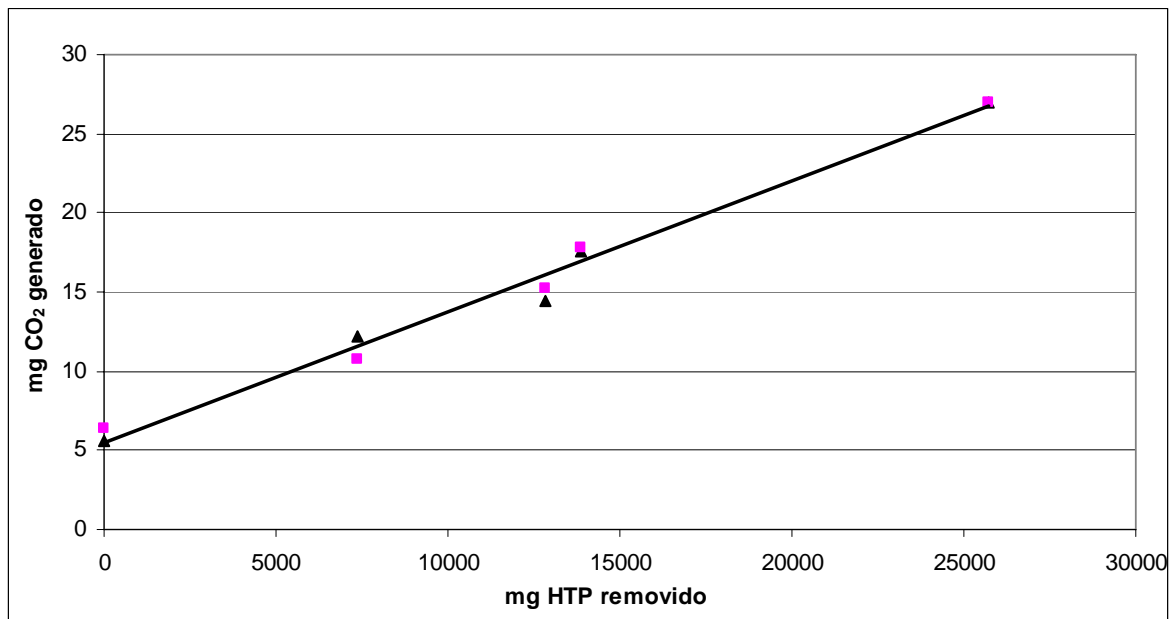
Días	15	30	60	140
Atenuación natural	12.24	14.48	17.56	26.99
Biorremediación con nutrientes	10.48	14.66	19.08	25.30
Biorremediación con nutrientes-tensoactivo	8.34	13.47	17.34	23.51

**Tabla IV.6. CO<sub>2</sub> generado total estimado (mg CO<sub>2</sub>) en tratamientos biológicos.**

Días	15	30	60	140
Atenuación natural	10.77	15.20	17.76	26.93
Biorremediación con nutrimentos	10.24	14.76	18.14	25.58
Biorremediación con nutrimentos-tensoactivo	9.14	13.06	16.62	23.68

**Tabla IV.7. HTP removidos del suelo (mg HTP) en tratamientos biológicos.**

Días	15	30	60	140
Atenuación natural	7,368.93	12,809.52	13,873.11	25,725.63
Biorremediación con nutrimentos	8,188.74	14,632.26	16,044.66	23,837.34
Biorremediación con nutrimentos-tensoactivo	5,454.93	13,567.26	13,933.41	26,385.78



**Figura IV.7. Correlación entre la cantidad de HTP removidos y la cantidad de CO<sub>2</sub> generado (medido▲ y estimado ■) en atenuación natural.**

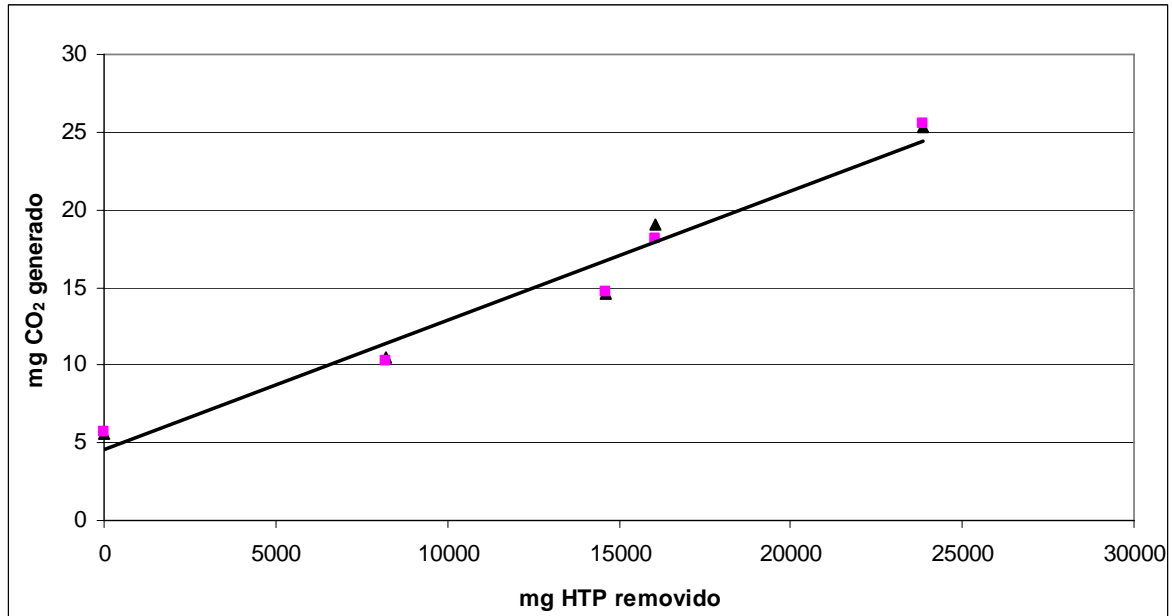


Figura IV.8. Correlación entre la cantidad de HTP removidos y la cantidad de CO<sub>2</sub> generado (medido ▲ y estimado ■) en biorremediación con nutrientes.

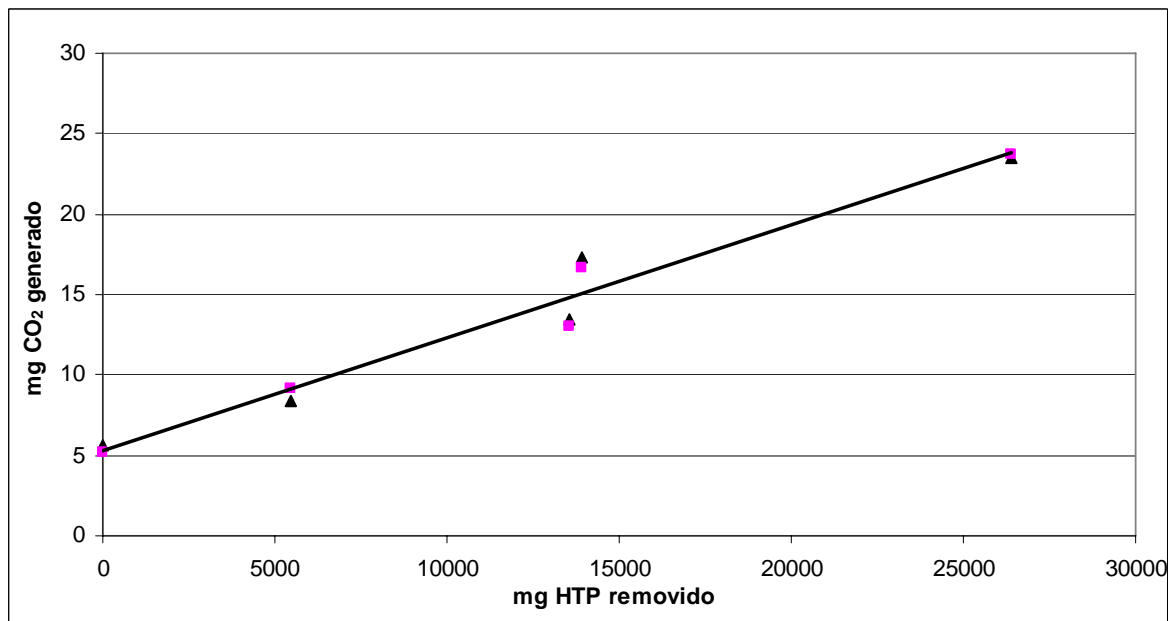
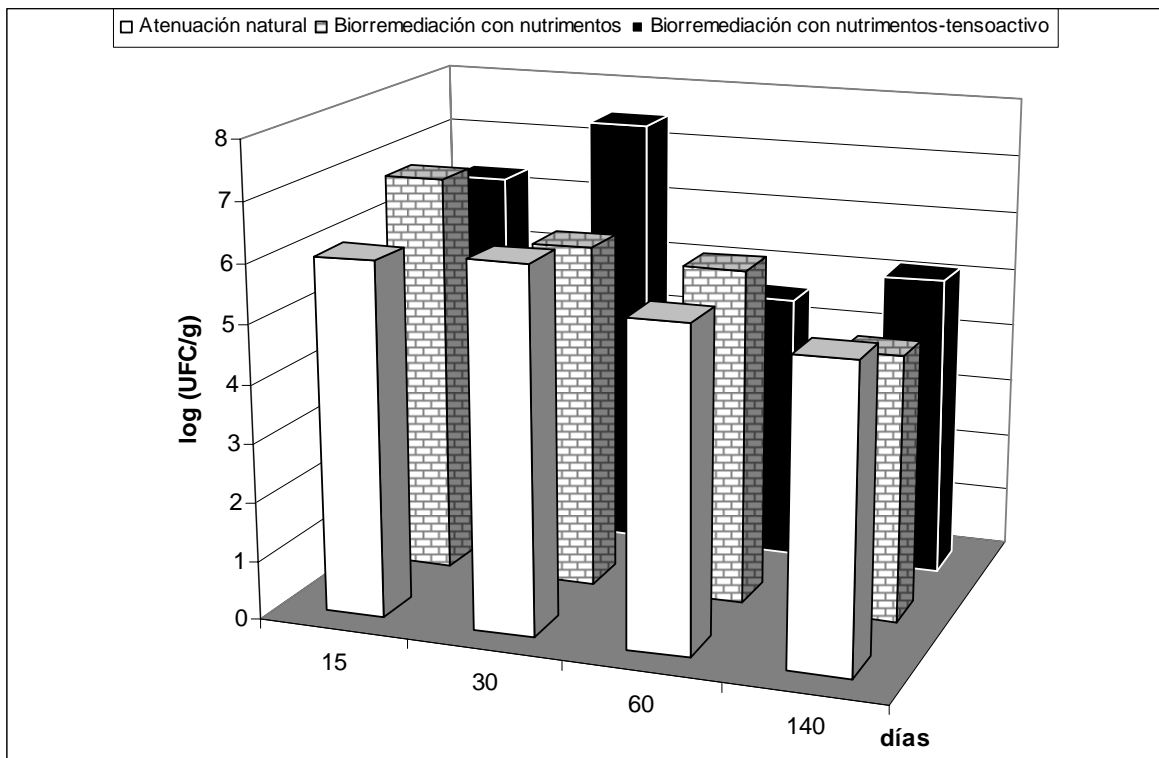


Figura IV.9. Correlación entre la cantidad de HTP removidos y la cantidad de CO<sub>2</sub> generado (medido ▲ y estimado ■) en biorremediación con nutrientes-tensoactivo.

**C Cantidad de bacterias aerobias**

En los tres tratamientos en general se presentó un comportamiento similar en cuanto a la cantidad de bacterias aerobias (log UFC/g). En un principio hubo un incremento en la cuenta bacteriana con el máximo a los 30 días en atenuación natural y biorremediación con nutrimentos-tesoactivo, mientras que en biorremediación con nutrimentos fue en el día 15, posteriormente en los tres casos hubo un decremento en la cuenta con el mínimo al final del tratamiento (140 días), excepto en biorremediación con nutrimentos-tesoactivo ya que después del mínimo a los 60 días la población bacteriana se volvió a incrementar, debido posiblemente a la segunda adición de fósforo (en el día 86) (Figura IV.10).



**Figura IV.10. Bacterias aerobias en suelo (log UFC/g) de tratamientos biológicos (valores promedio de dos réplicas).**

**D Especies de bacterias identificadas**

Se identificaron cinco bacterias Gram negativas y cinco bacterias Gram positivas al finalizar el tiempo de tratamiento (140 días), destacando la presencia de bacterias con capacidad degradativa de hidrocarburos del petróleo: *Stenotrophomonas maltophilia* (Cruz et al., 2005), *Enterobacter cloacae* (Escalante, 2002), *Sphingomonas paucimobilis* (Altamirano y Pozzo, 2000), *Acinetobacter baumannii* (Escalante, 2002) y *Brevibacillus brevis* (Pineda et al., 2002) (Tabla IV.8).

**Tabla IV.8. Especies de bacterias identificadas en los tratamientos biológicos.**

Tinción Gram	Especie	Hidrocarbonoclasta
Gram negativas	<i>Shigella spp.</i>	---
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (anteriormente <i>Pseudomonas maltophilia</i> ó <i>Xanthomonas maltophilia</i> )	Cruz et al., 2005
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Escalante, 2002
	<i>Sphingomonas paucimobilis</i> (anteriormente <i>Pseudomonas paucimobilis</i> )	Altamirano y Pozzo, 2000
	<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>	Escalante, 2002
Gram positivas	<i>Brevibacillus brevis</i> (anteriormente <i>Bacillus brevis</i> )	Pineda et al., 2002
	<i>Paenibacillus alvei</i> (anteriormente <i>Bacillus alvei</i> )	---
	<i>Listeria monocitogenes</i>	---
	<i>Gemella morbillorum</i>	---
	<i>Enterococcus faecium</i>	---



## IV.2.2 Métodos fisicoquímicos

### A Eficiencia de remoción con respecto a HTP

En el caso del lavado de suelo por inundación se observó que el tensoactivo EW600 1% disminuyó la concentración de HTP en los primeros 7 ciclos de lavado, de 11,176.83 a 4,471.15 mg/kg, y en los siguientes 7 ciclos, sólo removió el equivalente a 88 mg/kg, alcanzando una eficiencia total después de 14 ciclos de lavado de 61%. En segundo lugar quedó el suelo lavado con TW80 1% y en tercero el agua, siendo su comportamiento relativamente similar a los 7 y 14 ciclos de lavado. Las eficiencias de remoción finales con estas soluciones de lavado fueron 31 y 24%, respectivamente (Figura IV.11, Tabla IV.9). En este caso si se encontraron diferencias significativas entre las soluciones de lavado ( $P < 0.05$ ), resultando ser la mejor en la que se empleó el EW600 1%.

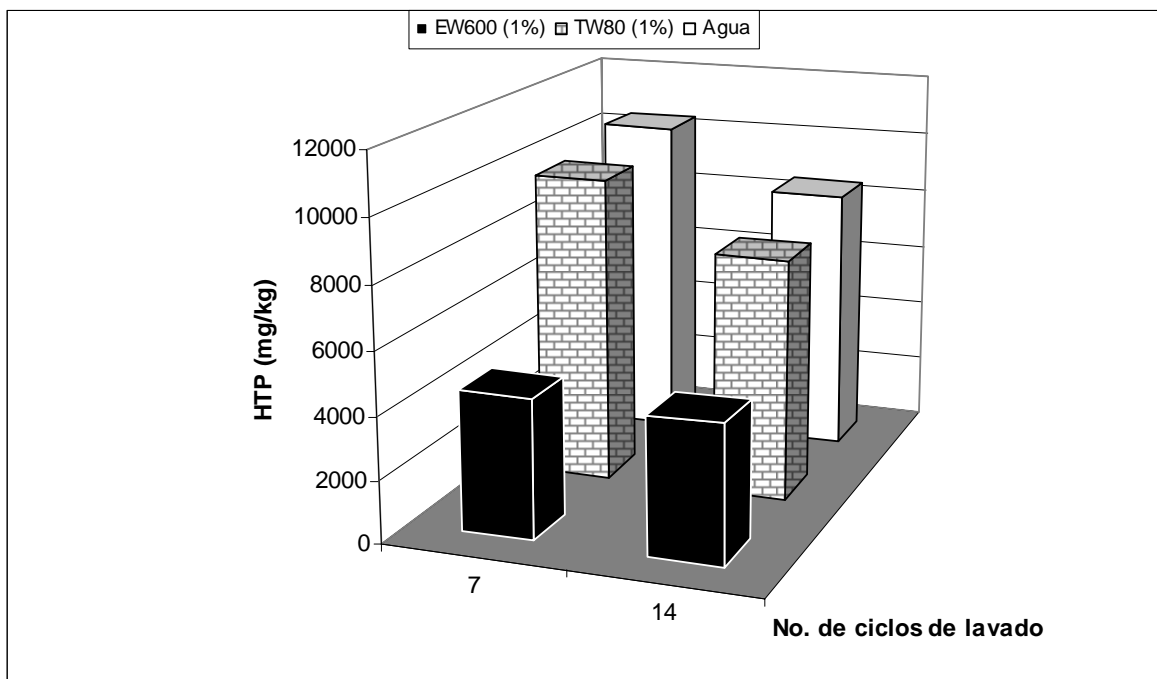


Figura IV.11. Concentración de HTP en el suelo en lavado de suelo por inundación (valores promedio de dos réplicas).

**Tabla IV.9. Eficiencia de remoción de HTP (%) en lavado de suelo por inundación (valores promedio de dos réplicas).**

No. de ciclos de lavado	7	14
Agua	6.90	23.73
TW80 (1%)	12.02	30.78
EW600 (1%)	60.00	60.78

Una forma de conocer la eficiencia de remoción de HTP con respecto a la cantidad de tensoactivo, es mediante la relación g HTP removido/g tensoactivo utilizado, para lo cual se considera la cantidad de suelo tratado, la concentración de HTP en el suelo, la eficiencia de remoción, la dosis o concentración de tensoactivo y la cantidad de solución de lavado empleada (Torres *et al.*, 2005c). En la Tabla IV.10 se observan estas relaciones en una de las réplicas de cada tratamiento con tensoactivo; de manera parcial para los primeros 7 ciclos de lavado y los siguientes 7 ciclos, así como el total con 14 ciclos. La réplica 2 de EW600 (1%) presentó mayor eficiencia total que la réplica 2 de TW80 (1%) (0.079 g HTP/g EW600 y 0.059 g HTP/g TW80). También explica, al menos para el EW600 1%, que la mayor remoción de hidrocarburos se presenta en los primeros ciclos de lavado (0.145 g HTP/g EW600 en los primeros 7 ciclos de lavado y 0.025 g HTP/g EW600 en los siguientes 7 ciclos).

**Tabla IV.10. Eficiencias parciales y totales en lavado de suelo por inundación (g HTP/g tensoactivo).**

Tratamiento	Eficiencia parcial (35 L solución de lavado)		Eficiencia total (70 L solución de lavado)
	Primeros 7	Siguientes 7	
Ciclos de lavado			14 en total
TW80 2 (1%)	0.015	0.102	0.059
EW600 2 (1%)	0.145	0.025	0.079

Por otro lado, aunque estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre las soluciones de lavado en la modalidad de mezclado mecánico, cabe destacar que el EW600 1% redujo drásticamente la concentración de HTP con respecto a las otras soluciones de lavado en los cuatro ciclos. Sin embargo, cabe mencionar que en el segundo ciclo de lavado hubo un aparente incremento en la concentración del contaminante, lo que se puede atribuir a la falta de homogeneidad en la toma de muestra de suelo para el análisis, pues en algunos casos a pesar de que se trataba de separar la fase líquida de la sólida, la muestra tenía un gran contenido de agua mezclada con el hidrocarburo. Considerando los cuatro ciclos de lavado, en segundo lugar quedó también el TW80 1% al igual que en el lavado por inundación, y en tercer lugar el agua. Las eficiencias de remoción de HTP después del cuarto ciclo de lavado fueron: 95, 85 y 72% respectivamente para EW600 1%, TW80 1% y agua (Figuras IV.12 y IV.13).

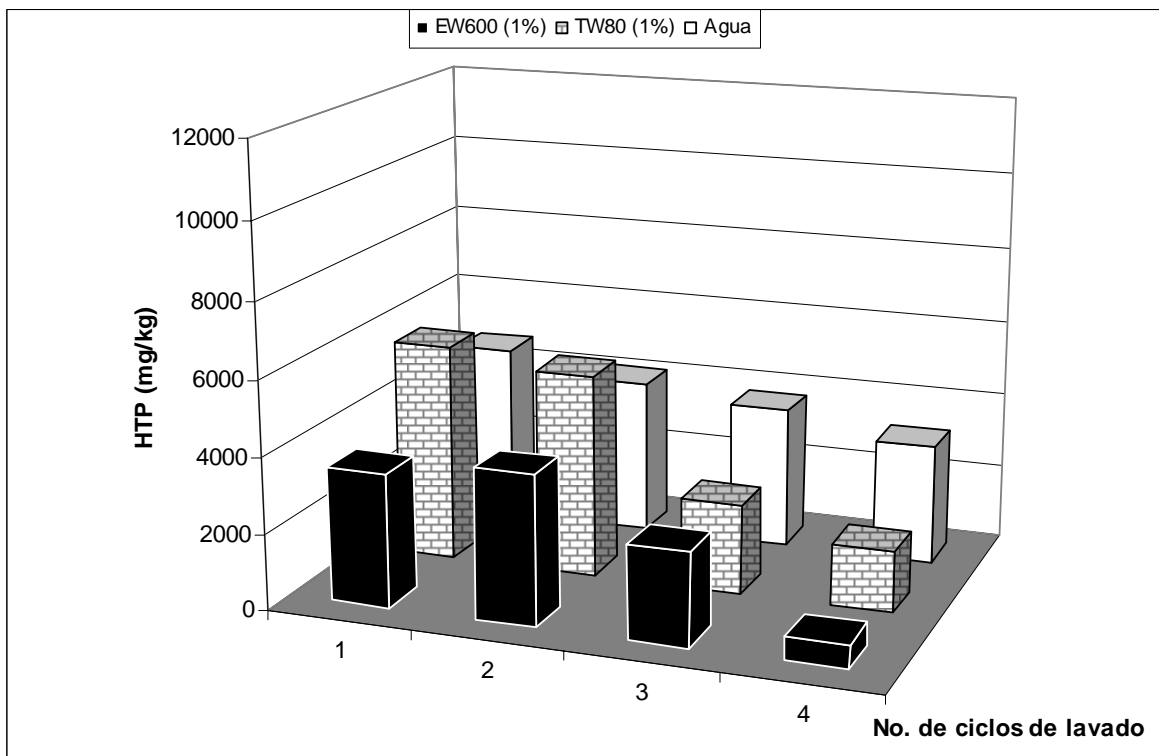


Figura IV.12. Concentración de HTP en el suelo en lavado de suelo mecánico (valores promedio de dos réplicas).

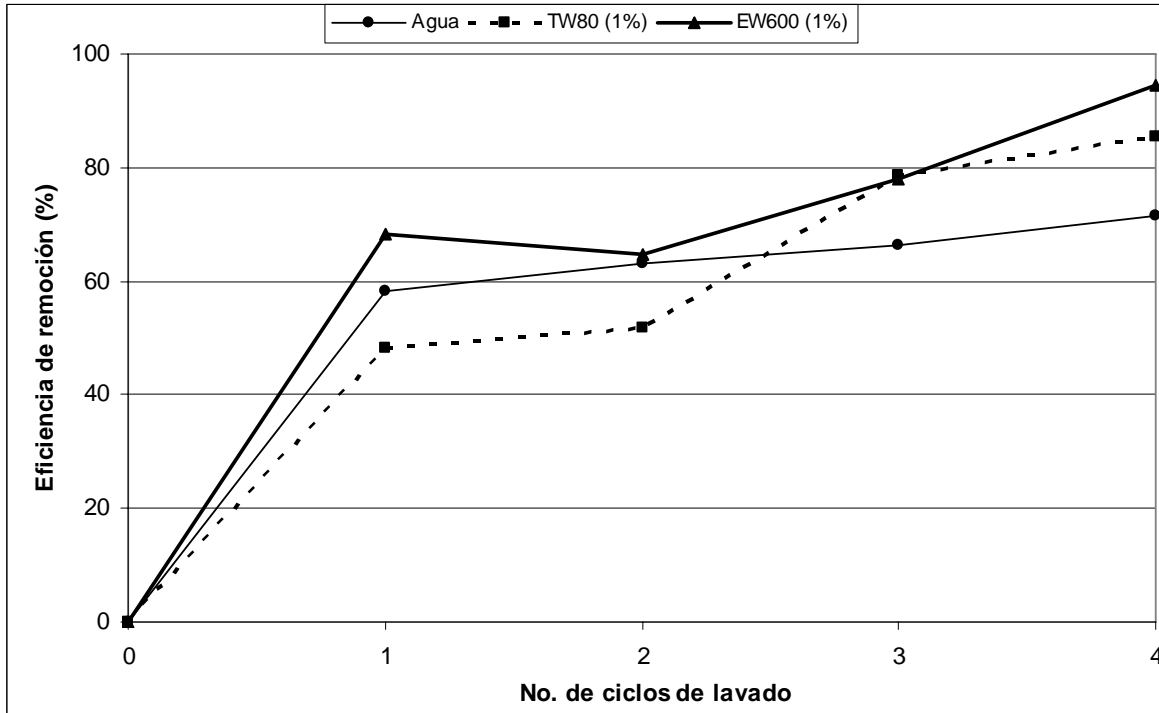


Figura IV.13. Eficiencia de remoción de HTP (%) en lavado de suelo mecánico (valores promedio de dos réplicas).

En la Tabla IV.11 se puede ver que la réplica 1 de EW600 (1%) presentó mayor eficiencia total que la réplica 1 de TW80 (1%) cuando se compara la cantidad de HTP removido con respecto a la cantidad de tensoactivo utilizado, 0.431 g HTP/g EW600 y 0.416 g HTP/g TW80. Las eficiencias parciales en cada ciclo fueron muy variables en ambos tensoactivos, destacando que en el primer ciclo de lavado se obtuvieron las mayores eficiencias, 1.114 g HTP/g EW600 y 0.987 g HTP/g TW80.

Tabla IV.11. Eficiencias parciales y totales en lavado de suelo mecánico (g HTP/g tensoactivo).

Tratamiento	Eficiencia parcial (5 L solución de lavado)				Eficiencia total (20 L solución de lavado)
	1	2	3	4	
Ciclos de lavado	1	2	3	4	4 en total
TW80 1 (1%)	0.987	0.157	0.472	0.049	0.416
EW600 1 (1%)	1.114	0.216	0.122	0.340	0.431

Según Cochran y Cox (1991) se pueden distinguir dos fuentes principales de errores experimentales, la primera es la variabilidad inherente a la unidad experimental a la cual se aplican los tratamientos, y la segunda fuente es la falta de uniformidad en la conducción física del experimento, es decir, la deficiencia en poder uniformizar la técnica experimental; a esto se atribuye que el lavado de suelo mecánico no fue homogéneo en cada par de réplicas de los tres tratamientos evaluados, lo cual se vio reflejado en el incremento de la concentración de HTP, en vez del decremento conforme ocurrieron los ciclos de lavado en las réplicas: agua 1, TW80 2 (1%) y EW600 2 (1%) (Anexo VII.3). Esto se puede atribuir a la falta de homogeneidad en la toma de muestra de suelo para el análisis, puesto que al drenar el efluente no se separaba completamente la fase sólida de la fase líquida (con alto contenido de partículas finas y petróleo), por lo que la concentración de HTP en el suelo era mayor que el en el ciclo anterior. Por esta razón se decidió no tomar en cuenta las réplicas antes mencionadas para analizar la cinética de remoción para cada solución de lavado, utilizando en este caso las réplicas: agua 2, TW80 1 (1%) y EW600 1 (1%). La función que se obtuvo con la concentración de HTP y el número de ciclos de lavado fue de tipo exponencial ( $r^2 > 0.80$ ); de esta manera el número de ciclos de lavado para alcanzar la concentración del LMP para suelo agrícola o residencial que es de 3,000 mg/kg (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003) es: 4, 2 y 2 ciclos de lavado mecánico con agua, TW80 1% y EW600 1%, respectivamente (Figura IV.14 y Tabla IV.12); lo cual se traduce en la utilización de 30 L de agua cuando no se adiciona ningún tensoactivo, o de 20 L cuando se emplea tween 80 o emulgín 600 a una concentración del 1%, este mismo volumen de agua tendría que ser tratado por métodos fisicoquímicos o biológicos.

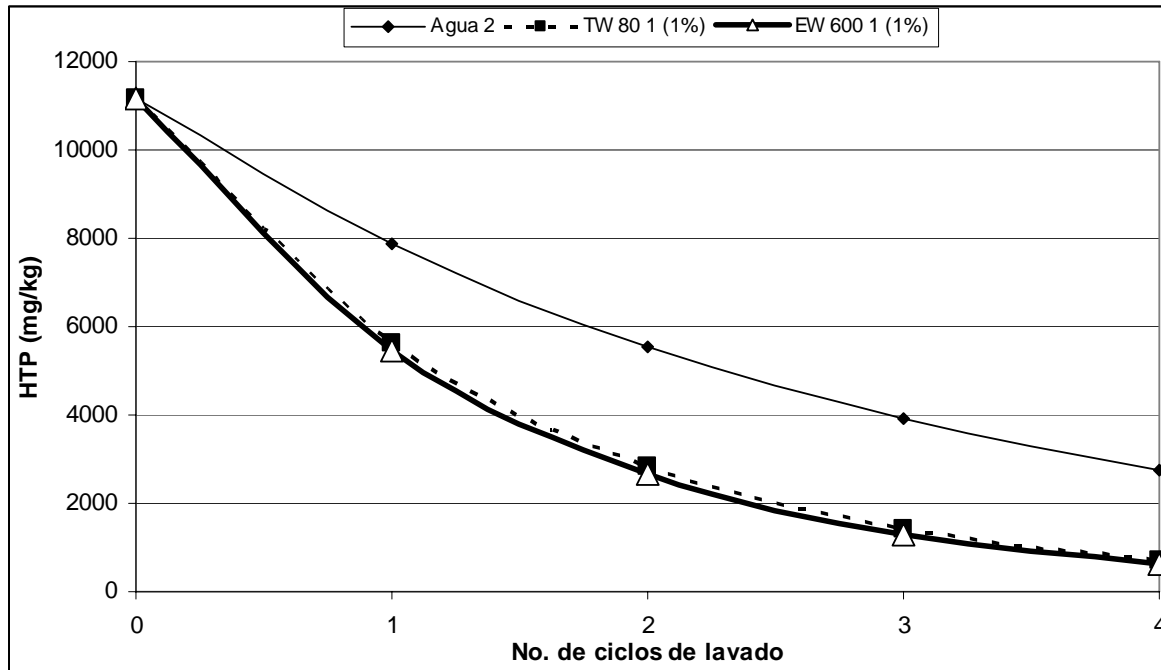


Figura IV.14. Cinética de remoción en lavado de suelo mecánico (valores promedio de dos réplicas).

Tabla IV.12. Número de ciclos de lavado de acuerdo a la cinética de remoción en lavado de suelo mecánico.

Tratamiento	Ecuación (exponencial)	R <sup>2</sup>	No. de ciclos de lavado para alcanzar el LMP para uso agrícola o residencial (3,000 mg/kg)
Agua 2	$HTP = 11,176e^{-0.3500c}$	0.84	4
TW80 1 (1%)	$HTP = 11,176e^{-0.6889c}$	0.96	2
EW600 1 (1%)	$HTP = 11,176e^{-0.7168c}$	0.88	2

HTP: concentración de HTP en el ciclo c (mg/kg)  
c: ciclo de lavado (No. de ciclos de lavado)

### ***B Concentración de HTP en el efluente***

Las concentraciones de HTP en el efluente de lavado de suelo por inundación fueron bajas cuando se utilizó como solución de lavado agua (2.06-12.10 mg/L) y TW80 1% (3.13-3.43 mg/L), a diferencia del EW600 1%, que presentó niveles incluso dos órdenes de magnitud mayores (520.24-1,400.08 mg/L) (Figuras IV.15 y IV.16), algo similar ocurrió en el lavado de suelo mecánico, ya que en los cuatro ciclos de lavado con agua las concentraciones variaron entre 4.88 y 13.09 mg/L, entre 5.13 y 15.15 mg/L en el caso del TW80 1% y entre 25 y 519.52 mg/L cuando se lavó con EW600% (Figuras IV.17 y IV.18). Estos resultados indican que los hidrocarburos del petróleo tienden a solubilizarse o a formar emulsiones con mayor facilidad en el EW600 1%, lo que se puede atribuir, a que la concentración que se utilizó está 222 veces por arriba de la CMC, promoviendo de esta manera la captura del contaminante dentro de las micelas. Actualmente no existen NOM que establezcan el LMP para HTP en agua, sin embargo, se puede tomar como referencia un parámetro muy relacionado con los hidrocarburos que se contempla en la NOM-001-SEMARNAT-1996 sobre descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, las grasas y aceites, cuyo LMP es de 15 mg/L. Por lo tanto si sobrepasa dicha concentración, sería necesario tratar el efluente.

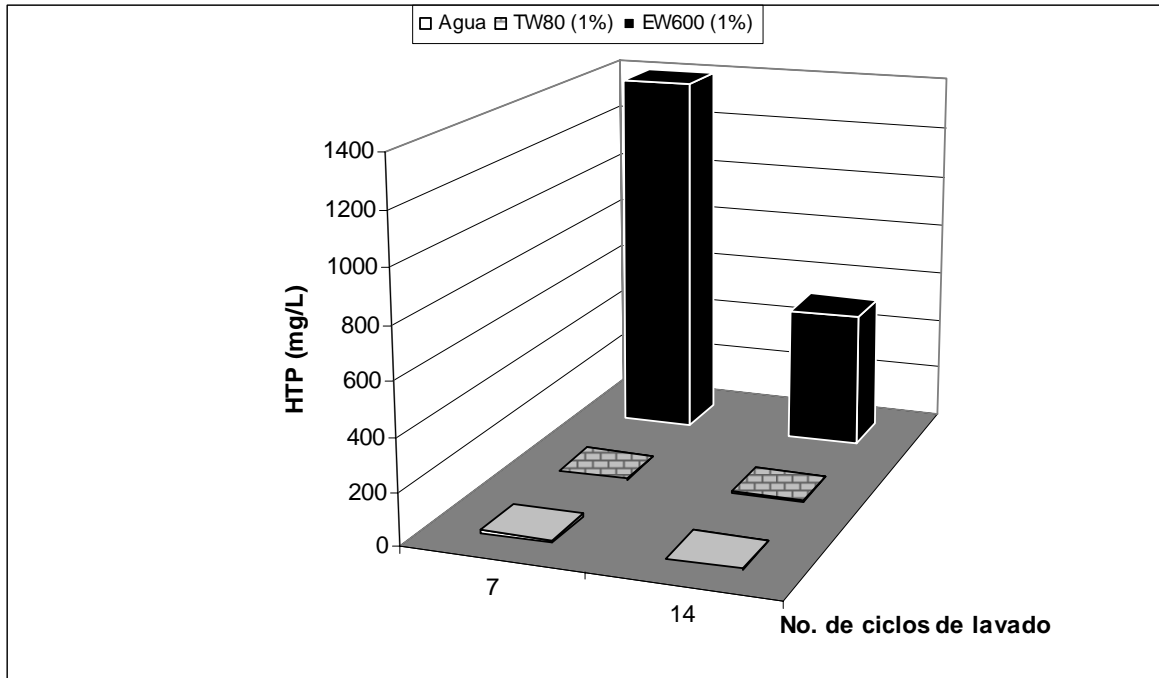


Figura IV.15. Concentración de HTP en el efluente (agua de enjuague) en lavado de suelo por inundación (valores promedio de dos réplicas).

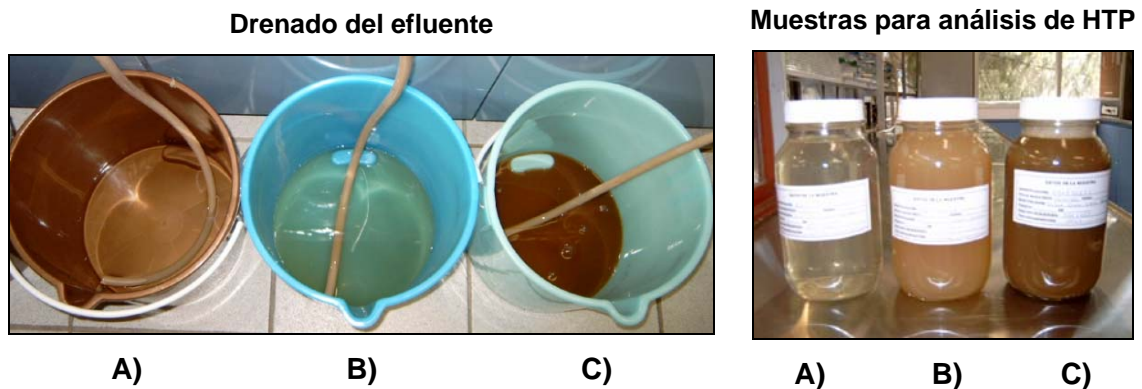


Figura IV.16. Efluentes (agua de enjuague) de lavado de suelo por inundación con: A) Agua, B) TW80 1% y C) EW600 1%.



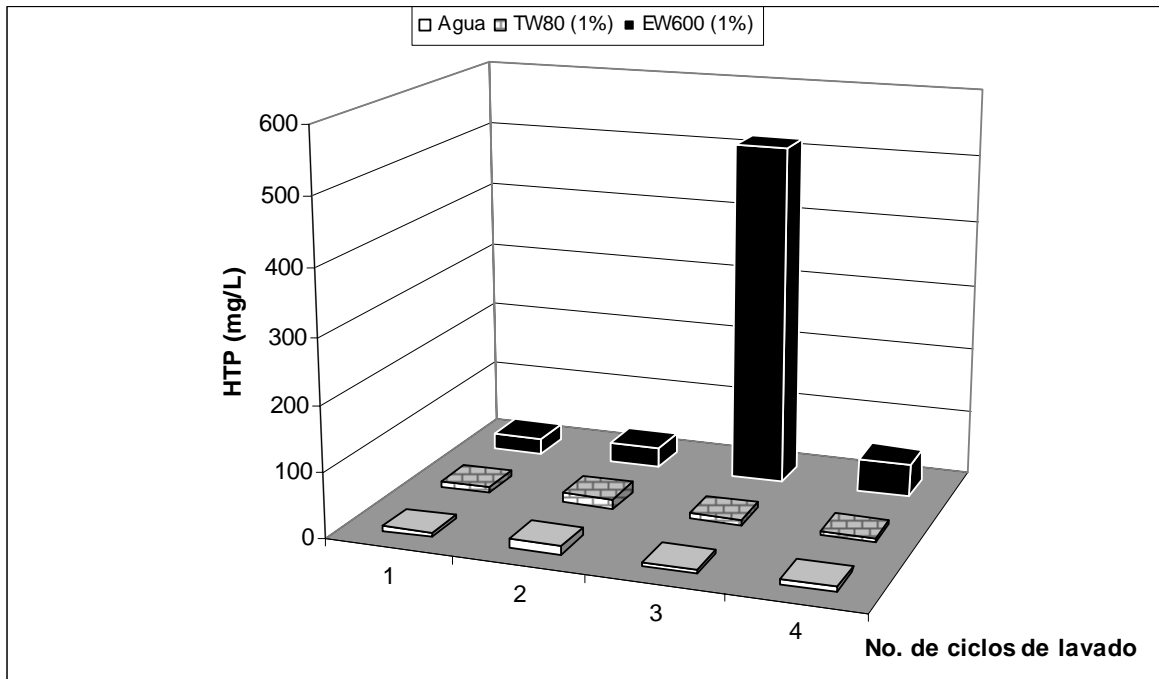


Figura IV.17. Concentración de HTP en el efluente (agua de enjuague) en lavado de suelo mecánico (valores promedio de dos réplicas).

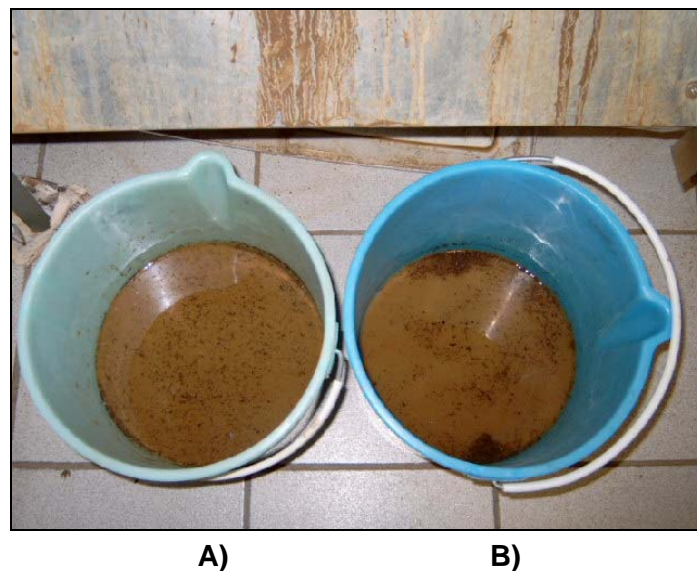


Figura IV.18. Efluentes de lavado de suelo mecánico con: A) solución de lavado EW600 1% y B) agua de enjuague.

Por cada 8 kg de suelo, los volúmenes totales de efluente generados en 14 ciclos de lavado por inundación fueron aproximadamente 140 L, mientras que en el lavado mecánico fueron 40 L en 4 ciclos de lavado. Cabe mencionar que las concentraciones del contaminante varían alternadamente, dependiendo de si se utiliza la solución de lavado o el agua de enjuague, lo cual es importante considerar para el tratamiento de estas aguas residuales ya sea por métodos biológicos o fisicoquímicos. Además, en el lavado mecánico con TW80, se debe tomar en cuenta que el hidrocarburo forma costras en la mezcladora mecánica (Figura III.17), lo cual tiene repercusiones en su operación y mantenimiento, a diferencia de cuando se utiliza EW600, en el que se solubiliza el contaminante.

## V ANÁLISIS DE RESULTADOS

### V.1 Métodos biológicos a escala de laboratorio y consideraciones para el escalamiento en campo

En los tres tratamientos biológicos, atenuación natural, biorremediación con nutrimentos y biorremediación con nutrimentos-tensoactivo, se observaron tres periodos con diferente tendencia en la eficiencia de remoción de los hidrocarburos, reflejada en sus pendientes (Figura IV.2). Es evidente que en el periodo comprendido entre los 30 y 60 días se afectaron algunos factores, lo que pudo haber influido en la biodegradación. Uno de los posibles factores es la temperatura. Los tratamientos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (promedio 18°C) por 140 días, del 19 de octubre de 2005 al 8 de marzo de 2006; durante el periodo de 30 a 60 días (mediados de noviembre a mediados de diciembre) se registraron temperaturas relativamente más bajas (promedio 15.5°C); en los días fríos la temperatura del suelo osciló entre 11 y 16°C, mientras que en los días templados estuvo entre 14 y 17°C. Esto es importante, debido a que según Alquati *et al.* (2003) la temperatura es un factor limitante, que algunas veces está correlacionado positivamente con la velocidad de rompimiento de los contaminantes por los microorganismos, ya que influye en las actividades enzimáticas de éstos (Ramos, 2000); por esta razón la biorremediación es más lenta en ambientes fríos que en ambientes tropicales. Por lo tanto, es de esperarse que la aplicación de métodos biológicos de remediación a escala de campo -biolabranza por ejemplo- sean más eficientes en cuanto a la temperatura, ya que según datos de la estación meteorológica más cercana al sitio de muestreo (La Venta), la temperatura promedio es de 22°C, el mes más cálido es mayo con temperatura máxima promedio de 35°C y el mes mas frío se ha registrado en los meses de enero y febrero con temperaturas de 17.7°C (CP, 1999).

Otro factor que posiblemente influyó sobre la biodegradación de los hidrocarburos fue la adición de fertilizante (fosfato de potasio dibásico), ya que éste se aplicó en los tratamientos de biorremediación con nutrimentos y biorremediación con nutrimentos-tensoactivo al inicio del proceso y transcurridos 86 días. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias con respecto al tratamiento no estimulado o control, denominado atenuación natural (Figura IV.2).



Los resultados de las poblaciones de bacterias aerobias en los tres tratamientos tuvieron una tendencia similar, incluso el tratamiento de atenuación natural presentó un incremento en la cuenta bacteriana, aún cuando no se le adicionó ningún fertilizante o tensoactivo (Figura IV.10), esto coincide con lo reportado para un experimento similar con bacterias degradadoras de hidrocarburos por Margesin *et al.* (2000). De las 10 bacterias identificadas al terminar los tratamientos biológicos (140 días), cinco de ellas se han reportado con capacidad de degradar hidrocarburos: *Stenotrophomonas maltophilia* (Cruz *et al.*, 2005), *Enterobacter cloacae* (Escalante, 2002), *Sphingomonas paucimobilis* (Altamirano y Pozzo, 2000), *Acinetobacter baumannii* (Escalante, 2002) y *Brevibacillus brevis* (Pineda *et al.*, 2002). Estas especies posiblemente producen metabolitos más sencillos que a su vez pueden ser consumidos por las otras especies identificadas y que contribuyen en las altas cuentas bacterianas en el suelo: *Shigella spp.*, *Paenibacillus alvei*, *Listeria monocitogenes*, *Gemella morbillorum* y *Enterococcus faecium* (Tabla IV.8). Es posible que durante el tiempo de tratamiento la comunidad microbiana haya sufrido cambios en su composición y tamaño, debido a la disponibilidad de nutrimentos y necesidades de cada especie (Smith *et al.*, 1998), además de otros factores como temperatura y cantidad de hidrocarburos biodisponibles.

En estudios de biodegradación de contaminantes orgánicos se ha utilizado la generación de CO<sub>2</sub> acumulado como medida de la actividad microbiana o de la biodegradación de dichos contaminantes (Pineda *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2005). Sin embargo, el CO<sub>2</sub> no solamente se produce a partir del contaminante en estudio, sino también a partir de la materia orgánica presente en el suelo (Kim *et al.*, 2005). Como se describió en el apartado de resultados, el CO<sub>2</sub> acumulado en los tres tratamientos evaluados se incrementó linealmente durante todo el tiempo de tratamiento ( $r^2 > 0.9$ ), sin embargo, se distinguieron dos fases, en la primera (0-30 días) la tasa de generación de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub>/kg día) fue mayor que en la segunda fase (30-140 días) (Figura IV.5). El CO<sub>2</sub> estimado que se produjo durante los 140 días fue 434.88, 429.04 y 393.21 mg CO<sub>2</sub>/kg de suelo para atenuación natural, biorremediación con nutrimentos y biorremediación con nutrimentos-tensoactivo, respectivamente (Figura IV.6, Anexo VII.4). Cabe mencionar que se correlacionó positivamente la cantidad de HTP removidos con la cantidad de CO<sub>2</sub> generado (medido y estimado) ( $r^2 > 0.95$ )

(Figuras IV.7, IV.8 y IV.9). Chokshi y Nelson (2003), Kim *et al.* (2005) y Plaza *et al.* (2005) también encontraron que la tendencia de CO<sub>2</sub> acumulado en función del tiempo es lineal, por otra parte, Margesin *et al.* (2000) reportaron la existencia de una correlación lineal entre el CO<sub>2</sub> acumulado y la cantidad de hidrocarburos residuales en el suelo.

Es imprescindible mantener las condiciones óptimas en cuanto a la aireación del suelo y contenido de agua para garantizar condiciones aerobias, ya que los microorganismos quimioheterótrofos aerobios son los principales responsables de la biodegradación de hidrocarburos al utilizar el oxígeno como aceptor final de electrones. De esta manera las principales rutas metabólicas para la degradación de hidrocarburos saturados y aromáticos requieren de la participación de las enzimas conocidas como oxigenasas que pertenecen al grupo de oxidoreductasas (Mayo, 2001). En el caso de la aireación por mezclado manual en las charolas (6 kg de suelo), ésta puede ser mayor y más homogénea que la que se puede llevar a cabo en campo para biolabranza por medio de maquinaria agrícola. Por lo tanto, las velocidades de remoción del contaminante en campo pueden ser muy diferentes que las observadas en laboratorio (Chokshi y Nelson, 2003). En cuanto al contenido de agua en el suelo, se sabe que los microorganismos requieren humedad para transportar los nutrientes, llevar a cabo los procesos metabólicos y mantener la estructura de la célula, sin embargo, un exceso de humedad es indeseable debido a que el agua ocuparía gran parte de los poros del suelo, limitando la permeabilidad del aire y reduciendo la eficiencia de aireación (Fahnestock *et al.*, 1998) debido a la baja tasa de difusión del oxígeno en agua. En un estudio realizado en un suelo arcilloso por Chokshi y Nelson (2003), se determinó que la máxima producción de CO<sub>2</sub> se obtuvo entre 15 y 20% de contenido de agua, sin embargo, disminuye cuando es  $\geq 25\%$ , debido probablemente a la falta de permeabilidad del oxígeno en la matriz húmeda del suelo.

En un estudio en laboratorio Corona e Iturbe (2005), compararon la eficiencia de remoción de HAP en un suelo arenoso con aireación manual y contenido de agua a dos niveles, 15 y 30%, aplicando tratamientos similares a los del presente estudio: sin estimulación, estimulación con nutrientes y estimulación con nutrientes-tensoactivo; concluyeron que el tratamiento más factible fue estimulación con nutrientes-tensoactivo con 30% de contenido de agua. También evaluaron la

actividad microbiana por respirometría ( $\text{CO}_2$ ) y la cantidad de bacterias aerobias presentes, destacando que en el suelo testigo (sin aireación y sin adición de agua), después de 24 horas ya no se registró  $\text{CO}_2$  por la ausencia de  $\text{O}_2$ , aún cuando existen bacterias heterótrofas degradadoras de hidrocarburos. Como ya se mencionó, también en el presente estudio la mayor eficiencia se obtuvo con el tratamiento biorremediación con nutrimentos-tensoactivo, pero en este caso el contenido de agua fue de  $16\pm 4\%$ , valor que se encuentra dentro del intervalo de humedad óptimo para la actividad biológica en el suelo (50-70% la capacidad de retención), sin embargo, a nivel de campo este parámetro podría ser muy variable por la frecuencia e intensidad de lluvias que se registran en la región occidental de Tabasco. De acuerdo con la estación meteorológica más cercana al sitio de muestreo (La Venta), la precipitación es superior a los 1,500 mm anuales, el temporal comprende el período de mediados de junio a mediados de octubre, registrando lluvias de moderadas a fuertes de junio a agosto, y lluvias fuertes a torrenciales en septiembre y octubre (383.2 y 463.5 mm, respectivamente), además de que estos dos últimos meses coinciden con la presencia de huracanes (CP, 1999).

Como ya se dijo anteriormente, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas entre las eficiencias de remoción de hidrocarburos en los tres tratamientos biológicos, sin embargo, el tiempo estimado para alcanzar la concentración del LMP para suelo agrícola o residencial que es de 3,000 mg/kg (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003) es de 14 meses para atenuación natural, 16 meses para biorremediación con nutrimentos y 13 meses para biorremediación con nutrimentos-tensoactivo (Tabla IV.4), lo cual repercute directamente en los costos de tratamiento a nivel de campo. Por lo tanto, con base en el menor tiempo de tratamiento y la relativamente mayor eficiencia de remoción del contaminante (39%), se seleccionó la biorremediación con nutrimentos-tensoactivo para estimar los costos del escalamiento a nivel de campo en el sitio donde ocurrió el derrame de petróleo por medio de biolabranza fuera del sitio (on site), ya que en términos prácticos el procedimiento es muy similar a lo que se hizo en el laboratorio.

En la biolabranza el suelo se irriga y se ara para optimizar los niveles de humedad e incrementar la aireación, y si es necesario se adicionan nutrientes inorgánicos, promoviendo de esta manera la biodegradación aerobia de los hidrocarburos; el sitio

debe tener características que permitan prever la migración de los contaminantes a otros sitios, dentro de estas características están la profundidad del nivel freático, distancias a zonas habitacionales y clima (Iturbe *et al.*, 1998).

Es importante mencionar que cuando un proceso se quiere escalar, posiblemente las tasas de remoción del contaminante y los tiempos estimados de tratamiento sean diferentes en laboratorio que en campo, aunque se traten de mantener las mismas condiciones; en este sentido es necesario tener un plan alternativo de tratamiento (medidas correctivas) para alcanzar los LMP o límites de limpieza. En el caso particular de la técnica de biolabranza, los factores en campo que podrían determinar desviaciones en los parámetros estimados en laboratorio, podrían ser principalmente la aireación insuficiente y la saturación del suelo por efecto del agua pluvial, en detrimento de las condiciones aerobias para la biodegradación de hidrocarburos.

Para llevar a cabo en campo la biolabranza de acuerdo con el tratamiento seleccionado a escala de laboratorio, biorremediación con nutrimentos-tensoactivo, se tendrían que adicionar las cantidades correspondientes de fósforo y tensoactivo (EW600) en función de la cantidad de suelo tratado, y mantener las condiciones de humedad y aireación óptimas durante todo el tratamiento.

Varios autores han reportado mejores eficiencias de remoción de hidrocarburos en tratamientos de bioestimulación cuando se utilizan tensoactivos (Mata *et al.*, 2000; Corona e Iturbe, 2005; Kim *et al.*, 2005; Molina, 2006). Los tensoactivos en solución acuosa mojan fácilmente las superficies, penetran en los materiales porosos y emulsifican compuestos hidrofóbicos como los hidrocarburos, mejorando la biodisponibilidad para el ataque de los microorganismos (Ramos, 2000) debido a que aumentan su solubilidad en la fase acuosa (Sobisch *et al.*, 2000). Es importante tomar en cuenta varios factores para seleccionar la dosis adecuada del tensoactivo en tratamientos de biorremediación, como por ejemplo, que la dosis suministrada al suelo no altere la preferencia del hidrocarburo como sustrato al microorganismo (Corona e Iturbe, 2005) y que no inhiba la actividad microbiana sobre los contaminantes, una vez que estos son incorporados a la pseudofase acuosa micelar. Debido a su estructura molecular, los tensoactivos a concentraciones por arriba de la CMC pueden inhibir la biodegradación, ya sea, al bloquear el contacto microorganismo-contaminante o por causar efectos tóxicos sobre los microorganismos. Por otra parte, los tensoactivos

pueden interferir con el transporte del sustrato dentro de la célula, al dañar irreversiblemente la estructura de su pared celular (desnaturalizando proteínas o disolviendo el material que la constituye) (Mata *et al.*, 2000). En un estudio realizado por Kim *et al.* (2005), la adición del tensoactivo TW80 a una concentración de 1 CMC fue suficiente para mejorar la biodegradación de 60,000 mg/kg de petróleo crudo en un suelo arenoso. En el caso particular del tratamiento en el que se agregó el tensoactivo no iónico EW600 al suelo arenoso en el presente estudio (biorremediación con nutrimentos-tensoactivo), la concentración utilizada de 20 mg/kg, resultó adecuada para facilitar la remoción de hidrocarburos del suelo por parte de los microorganismos.

La estructura molecular del tensoactivo y del contaminante, así como la naturaleza de la pared celular son factores importantes que pueden influir en la velocidad en que los microorganismos consumen los contaminantes. Por la naturaleza de su pared celular, los microorganismos pueden ser hidrofóbicos o hidrofílicos con respecto a moléculas orgánicas. Los primeros poseen una pared celular que permite el transporte directo de compuestos orgánicos a través de ellos, mientras que los microorganismos hidrofílicos requieren un compuesto anfipático que facilite el transporte de compuestos orgánicos a través de la pared celular. En ausencia de tensoactivos sintéticos, algunos microorganismos hidrofílicos pueden producir sus propios tensoactivos, conocidos como biosurfactantes, que facilitan la asimilación de los sustratos hidrofóbicos. Los tensoactivos microbianos o biosurfactantes son moléculas complejas sintetizadas por bacterias, hongos y levaduras, pueden ser péptidos, glicolípidos, glicopéptidos, ácidos grasos y fosfolípidos (Mata *et al.*, 2000).

De las bacterias identificadas en el suelo del campo petrolero Cinco Presidentes en el presente estudio, destaca la bacteria *Acinetobacter calcoaceticus* que produce un lipopolisacárido que actúa como tensoactivo, además se ha encontrado que algunas especies de los géneros *Pseudomona* y *Bacillus* también sintetizan otros biosurfactantes (Mulligan *et al.*, 2001; Cybulski *et al.*, 2003; Ortega-Trejo y Edyvean, 2006), por lo que es posible que también las especies identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* (anteriormente *Pseudomonas maltophilia*) y *Sphingomonas paucimobilis* (anteriormente *Pseudomonas paucimobilis*), *Brevibacillus brevis* (anteriormente *Bacillus brevis*) y *Paenibacillus alvei* (anteriormente *Bacillus alvei*) (Tabla IV.8) también los produzcan dada su similitud filogenética, contribuyendo



activamente en la biorremediación del suelo contaminado. Sería interesante evaluar si efectivamente estas especies producen biosurfactantes para mejorar la biodegradación de los hidrocarburos y de esta manera evitar el uso de tensoactivos sintéticos, dadas las ventajas de los biosurfactantes: mayor biodegradabilidad, mayor tolerancia a la variación de pH, temperatura y sales, y sobre todo, menor costo (Mulligan *et al.*, 2001). De las 10 bacterias identificadas, cinco de ellas se han reportado con capacidad de degradar hidrocarburos, *Stenotrophomonas maltophilia* (Cruz *et al.*, 2005), *Enterobacter cloacae* (Escalante, 2002), *Sphingomonas paucimobilis* (Altamirano y Pozzo, 2000), *Acinetobacter baumannii* (Escalante, 2002) y *Brevibacillus brevis* (Pineda *et al.*, 2002) (Tabla IV.8). En un estudio realizado por Rivera (2001 y 2002b) en el campo petrolero La Venta, se identificaron bacterias y hongos degradadores de petróleo en el suelo (Gleysol), incluyendo benzo(a)pireno, destacando que la mayor cantidad de microorganismos tolerantes a este HAP, se encontraron en un sitio con derrames crónicos de petróleo, en comparación con un sitio con derrame reciente. Por lo anterior y de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, sería factible realizar un estudio sobre la abundancia y diversidad bacteriana (además de hongos) con capacidad de degradar hidrocarburos en los campos petroleros Cinco Presidentes y La Venta, para seleccionar un consorcio microbiano que se pueda utilizar en la remediación de suelos por medio de bioaumentación. En un estudio realizado por Escalante (2002) se aislaron bacterias de suelo de la región conocida como Trompeteros Iquitos, Perú, con la finalidad de seleccionar un consorcio bacteriano capaz de degradar petróleo crudo de la refinería La Pampilla. De las bacterias identificadas sobresalieron por su elevada actividad emulsificante y actividad degradativa: *Acinetobacter calcoaceticus Iwoffii*, *Enterobacter agglomerans*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Hafnia Alvei*.

De acuerdo con Rivera y Trujillo (1998) para analizar procesos de biorremediación se deben considerar tres ejes principales, la fisiología de la bacteria u hongo, la masa transferida y los factores ambientales; en cuanto a la fisiología de la bacteria u hongo se debe tomar en cuenta la diversidad enzimática y la capacidad de transformación, crecimiento rápido, competitividad y forma de crecimiento, en masa transferida se incluye el sustrato, nutrimentos, aproximación espacial por los microorganismos y

sustancias tóxicas; y en los factores ambientales deben considerarse el agua, pH, temperatura, nitrógeno y fósforo, y el potencial redox.

Finalmente cabe señalar, que aunque en este trabajo sólo se evaluó la remoción de hidrocarburos en condiciones aerobias, sería conveniente analizar la eficiencia y tasa de remoción del contaminante en condiciones anaerobias, ya que éstas predominan en la región donde se encontró el derrame de petróleo, y serían determinantes para llevar a cabo la remediación del suelo por medio de la técnica de atenuación natural.

Existen varias evidencias de que el suelo presenta condiciones anaerobias, posiblemente debido a inundaciones en la región, lo que hace mucho más lenta la biodegradación aerobia de los hidrocarburos. Se encontraron rasgos hidromórficos del suelo, producto de procesos de oxidación y reducción asociados con contenidos variables de agua durante el año, según Stoops y Eswaran (1985 citado en Gutiérrez y Zavala, 2002) las evidencias de estos procesos son la presencia de motas, contenido elevado de materia orgánica y microorganismos anaerobios. Cuando se recolectó y posteriormente cuando se mezcló el suelo, se observaron manchas gris-verdosas (Figuras III.5, y III.7), lo cual es indicativo de la precipitación del hierro debido posiblemente a que se presentaron condiciones reductoras y luego ligeramente oxidantes, es decir, el ión férrico pasó a ión ferroso (Gutiérrez y Zavala, 2002), en cuanto al contenido de materia orgánica efectivamente fue elevado (5.82% o 58,200 mg/kg) y se identificó una especie de bacteria anaerobia (*Gemella morbillorum*) y cuatro bacterias anaerobias facultativas (*Enterobacter cloacae*, *Shigella spp.*, *Listeria monocitogenes* y *Enterococcus faecium*) (Tabla IV.8).

Otras pruebas de que en el sitio donde ocurrió el derrame -y en general en la mayor parte del campo petrolero Cinco Presidentes- se presentan condiciones anaerobias, lo cual determina una lenta biodegradación de los hidrocarburos son las siguientes:

1. Los potenciales de reducción determinados durante la época de lluvias en el suelo saturado por Roth (2000 citado en Cram *et al.*, 2004) en esta región tabasqueña, fluctuaron entre -39 y 128 mV en los primeros 0.5 cm del suelo a -96 a -240 mV en los horizontes más profundos del suelo, lo cual refleja condiciones reductoras y por lo tanto anaerobias.

2. De acuerdo con un estudio realizado por Cram *et al.* (2004) en los campos petroleros Cinco Presidentes y La Venta, los derrames que ocurrieron aproximadamente hace 30 años (viejos) siguen conteniendo grandes cantidades de hidrocarburos de bajo peso molecular (30-49% de los HAP totales y 50-84% de los alcanos totales), lo que significa que es lenta la volatilización y la degradación microbiana en estos suelos (Histosoles y Gleysoles) que se encuentran inundados la mayor parte del año, esto podría ser debido por una parte a las condiciones anaerobias que inhiben la actividad microbiana (aerobia), y por otra parte a la adsorción de los compuestos dentro de la materia orgánica sólida o disuelta, con la consecuente disminución en la volatilización y biodisponibilidad.
3. De acuerdo con el Colegio de Postgraduados (1999) el contenido de materia orgánica en los suelos de los campos petroleros Cinco Presidentes, La Venta y Rodador oscila entre 2.5 y 90%, en orden decreciente: Gleysol-Histosol e Histosol (64 a 90%), Solonchak (47.5%), Antrosol (21%), Gleysol, Alisol y Arenosol (2.5 a 14.1%), lo cual supone baja biodegradación.
4. Rivera (2002a) analizó bacterias y hongos de suelos (Gleysoles) contaminados por petróleo crudo en el campo petrolero La Venta, encontrando que la distribución de los microorganismos se relaciona con los contenidos de nutrientes y de oxígeno en el espacio poroso. Los hongos se hallaron principalmente en horizontes superficiales y disminuyen con la profundidad, mientras que las bacterias aisladas en los horizontes saturados con agua pueden pertenecer al grupo de las especies anaerobias obligadas o anaerobias facultativas.

En el Anexo VII.1 se hace una descripción ambiental más amplia del campo petrolero Cinco Presidentes.



## V.2 Métodos fisicoquímicos a escala de laboratorio y consideraciones para el escalamiento en campo

A nivel de laboratorio el lavado de suelo por inundación representó la aplicación a nivel de campo de la técnica de lavado de suelo *in situ* (soil flushing) y el lavado de suelo mecánico fuera del sitio (soil washing), lo cual involucra la extracción del suelo para su posterior tratamiento. Con los resultados obtenidos se comprobó que el lavado con tensoactivo es más eficiente cuando además de poner en contacto la solución de lavado con el suelo contaminado, existe un mezclado mecánico (Figuras IV.11, IV.12 y IV.13, Tabla IV.9). En ambas modalidades se debe tomar en cuenta el gasto adicional que representa el tratamiento del efluente.

Las soluciones de lavado que se utilizaron tanto en el lavado de suelo por inundación como en el lavado mecánico fueron: agua corriente, TW80 1% y EW600 1%, estas dos últimas corresponden a tensoactivos no iónicos (Tabla V.1).

**Tabla V.1. Tensoactivos no iónicos utilizados para el lavado de suelo (Torres *et al.*, 2003).**

Nombre comercial	Nombre químico	Peso molecular (g/gmol)	CMC (mg/L)	HLB
TW80 (tween 80 o canarcel TW80)	Monooleato de sorbitán etoxilado	1,308	65.40	15
EW600 (emulgín 600 o surfacpol 906)	Nonilfenol etoxilado	483	45.06	11

CMC: Concentración Micelar Crítica

HLB: por sus siglas en inglés Hydrophile Lipophile Balance (Balance Hidófilo Lipófilo)

Los principales factores que deben ser considerados cuando se seleccionan tensoactivos son: eficiencia de remoción del contaminante, facilidad para reciclarse, costo, biodegradabilidad, toxicidad a humanos, animales y plantas, y percepción pública y regulatoria (Mulligan *et al.*, 2001). También se deben tomar en cuenta las interacciones entre el tensoactivo y el suelo como son: precipitación, adsorción y cambios en la conductividad hidráulica (Liu y Roy, 1995), que pueden influir en efectos físicos y químicos en el suelo, así como un exceso de uso del tensoactivo, y que podrían traducirse en pérdidas económicas o efectos inadecuados en el suelo de acuerdo al uso que éste tenga. Otros factores son los operativos, como turbidez y generación de espuma (Deshpande *et al.*, 1999).

La concentración del tensoactivo se puede seleccionar con base en la mejor eficiencia de remoción, para lo cual Deshpande *et al.*, (1999) proponen realizar pruebas de solubilidad del contaminante por abajo y por arriba de la CMC. Según un estudio realizado por Torres *et al.* (2003) cuando se utiliza el TW80 y el EW600 a una concentración mayor que su CMC, las eficiencias de remoción de HTP (fracción diesel) aumentan. Zheng y Obbard (2002) determinaron que la solubilización de HAP es proporcional a la dosis del tensoactivo por arriba de la CMC. En el presente trabajo se emplearon concentraciones (1%) de 153 y 222 veces la CMC del TW80 y EW600, respectivamente (Tabla V.1).

Otro parámetro fisicoquímico propio del tensoactivo que se toma en cuenta para determinar su factibilidad en la remoción de contaminantes orgánicos, es el número de HLB. Un alto número de HLB generalmente indica buena solubilidad del tensoactivo en agua, y un bajo HLB indica una solubilidad baja en agua y afinidad relativamente alta para la fase orgánica (Simpkin *et al.*, 1999). El HLB del TW80 es de 15 y el del EW600 es 11, por lo tanto, el primero es más hidrofílico y el segundo más hidrofóbico (Tabla V.1). Cuando se utiliza como solución de lavado un tensoactivo, a diferencia del agua corriente únicamente, se forman micelas que permiten la solubilización micelar de importantes cantidades de compuestos orgánicos hidrofóbicos por arriba de su solubilidad acuosa estándar (Mata *et al.*, 2000), esto sucede porque los monómeros de tensoactivo forman estructuras esféricas o laminares con pseudofases interiores orgánicas (Mulligan *et al.*, 2001), removiendo de esta manera a los hidrocarburos. Típicamente las micelas contienen de 50 a 100 monómeros (moléculas de tensoactivo) (Jafvert, 1996).

### V.2.1 Lavado de suelo por inundación

Un dato interesante que se obtuvo a partir de los resultados de granulometría y textura del suelo, es que los granos de suelo contaminado presentan mayor tamaño con respecto al tamaño de las partículas minerales (arena, limo y arcilla), debido a que el petróleo y/o la materia orgánica se encuentran adsorbidos a dichas partículas. En la Figura V.1 se observa que la granulometría sobreestima con respecto a la textura la cantidad de arenas, cuyo tamaño real corresponde al de las arcillas, esto se puede atribuir al engrosamiento de las partículas por el petróleo y materia orgánica adsorbidos a éstas. Lo anterior se pudo comprobar en el lavado de suelo por



inundación con los tensoactivos TW80 y EW600, en comparación con el lavado con agua solamente, ya que al desorberse el hidrocarburo de las partículas de suelo por medio del tensoactivo, éstas fueron reduciendo su tamaño y migrando paulatinamente hacia la válvula de salida del cajón, lo cual se reflejó en la disminución de las velocidades de infiltración del efluente a partir del sexto ciclo de lavado, por lo que se deduce que decreció la conductividad hidráulica. Según Liu y Roy (1995) la inyección de tensoactivos a la matriz del suelo decrece la conductividad hidráulica por efecto de la movilización de partículas finas o por la precipitación de tensoactivo. En relación a la precipitación del tensoactivo, cabe mencionar que se observaron costras blancas en las orillas de los cajones con suelo, sobre todo con el TW80, por la acumulación del tensoactivo que no fue utilizado para desorber el petróleo del suelo, lo cual repercutió en la baja eficiencia de hidrocarburo removido respecto al tensoactivo utilizado (Tabla IV.10).

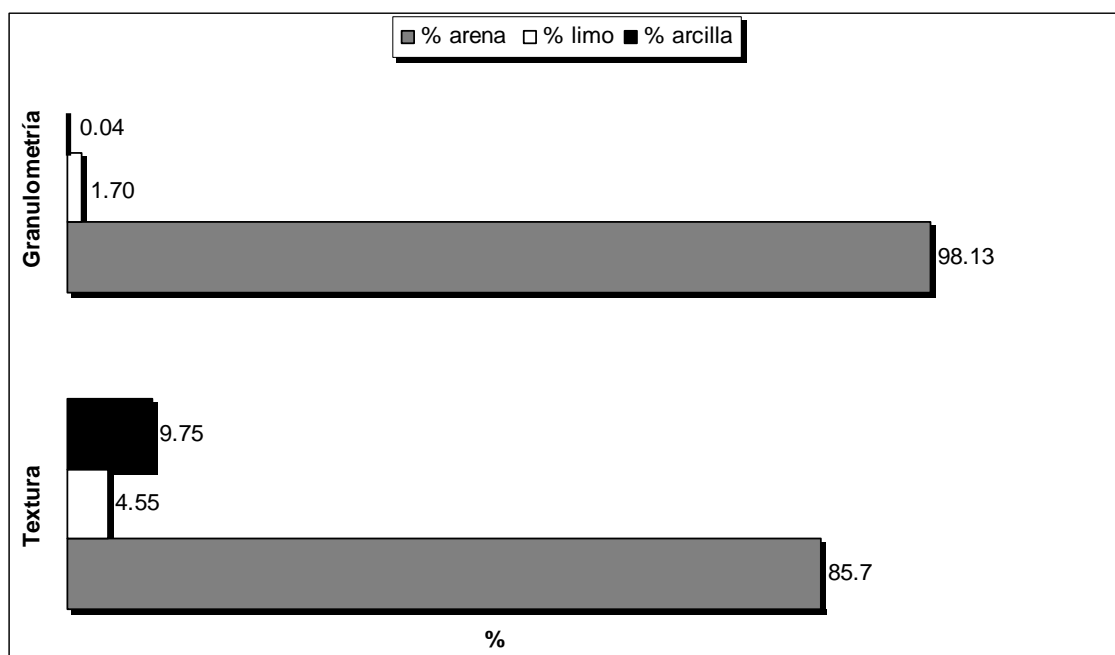


Figura V.1. Valores porcentuales de partículas del suelo con dos metodologías (granulometría y textura).

Cabe mencionar que en el lavado por inundación, fue evidente el incremento en la concentración de HTP en el efluente de soluciones de lavado con tensoactivo, sobre todo con EW600, ya que fue el tensoactivo que solubilizó en mayor medida el petróleo y cuya coloración fue la más oscura (café); en el caso del efluente de enjuague (agua solamente), el color fue ligeramente más claro. Con respecto al suelo lavado por inundación solamente con agua corriente, el color prácticamente se mantuvo igual, amarillo traslúcido (Figura IV.16). Lo anterior se confirmó con los resultados analíticos en el efluente, ya que la concentración de HTP cuando se utilizó EW600 1% como solución de lavado, fue dos órdenes de magnitud mayor (1,400.08 mg/L) en comparación con las otras soluciones de lavado (Figura IV.15) e incluso con el LMP de grasas y aceites (15 mg/L) establecido en la NOM-001-SEMARNAT-1996, que es el parámetro que podría tomarse como referencia en la descarga de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Otra prueba a favor del EW600 fue el análisis estadístico de la concentración de HTP en suelo (análisis de variancia y prueba de diferencia mínima significativa), ya que se encontraron diferencias significativas entre las soluciones de lavado ( $P < 0.05$ ), de las cuales, la mejor fue EW600 1%. Lo anterior fue muy evidente en la Figura IV.11 y Tabla IV.9.

Por lo anterior, es posible que exista una relación entre la concentración de HTP y el color, que permita utilizar este último parámetro como variable de respuesta, con la ventaja de que es más fácil de medir, rápido y económico. Para apreciar con mayor claridad el comportamiento de la concentración de HTP en el efluente con respecto al tiempo, tanto en la solución de lavado como en el agua de enjuague, sería necesario realizar con mayor frecuencia el muestreo y análisis de hidrocarburos a escala piloto. Se recomienda tomar muestras compuestas como se describe en la NOM-001-SEMARNAT-1996, es decir, el volumen de cada una de las muestras simples será proporcional al caudal de la descarga en el momento de su toma.

De acuerdo con los resultados obtenidos por López (2004) a escala de laboratorio, el lavado de un suelo arenoso por inundación con EW600 al 1%, en condiciones similares a las del presente estudio, tuvo una alta eficiencia de remoción de HTP (48.96%) comparado con otros tensoactivos (SDS 0.5% y TW80 0.5%), sin embargo, fue el que presentó mayores cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, sobre todo en los parámetros de conductividad eléctrica, sodio, calcio,

fósforo disponible y población de bacterias aerobias heterótrofas; ligeros cambios en nitrógeno total, potasio, magnesio, carbono orgánico y materia orgánica, pero no hubo cambios, en granulometría, densidad real, densidad aparente y pH. En este sentido, es preciso enfatizar la importancia de la caracterización del suelo una vez que termine el lavado de suelo con tensoactivos, ya sea por inundación o mecánicamente, para tomar las medidas necesarias sobre los cambios físicos, químicos y biológicos del suelo que puedan presentarse.

Como ya se mencionó, a nivel de laboratorio el lavado de suelo por inundación representó la aplicación a nivel de campo de la técnica de lavado de suelo *in situ* (soil flushing). Sin embargo, en el presente estudio sólo se lavaron 8 kg de suelo, lo que en términos de profundidad del suelo equivale a 12 cm aproximadamente (espesor de acuerdo con las dimensiones del cajón donde se llevó a cabo el experimento), a diferencia de la profundidad real o espesor de un suelo contaminado, donde influyen varios factores geohidrológicos. Por lo tanto, para obtener resultados que se puedan aplicar a escala de campo, sería conveniente hacer un estudio a escala piloto en el que se simulen las características geohidrológicas del sitio donde se quiere realizar el lavado de suelo. También es conveniente enfatizar, la necesidad de corroborar si efectivamente la conductividad hidráulica del suelo cambia, ya que podría incrementar el tiempo que tarda en pasar la solución de lavado (o en su caso el agua de enjuague) a través del suelo, afectando de esta manera el tiempo total de tratamiento, y por lo tanto, también los costos.

Lee *et al.* (2005) utilizaron el tensoactivo TW80 al 2% para remover diesel de un sitio contaminado a escala piloto (4mX4mX4m) en Corea. Para el lavado de suelo *in situ* inyectaron cinco volúmenes de poro. La concentración de HTP en el efluente con la solución de lavado (tensoactivo) se incrementó a 1,761 mg/L, la cual fue 200 veces más alta que la concentración promedio del agua de enjuague (agua sola). En el presente trabajo, aunque no se midió la concentración en ambos efluentes (sólo en el agua de enjuague), fue evidente que ocurrió algo similar por la diferencia en el color, sobre todo en el tratamiento con EW600, y en los últimos ciclos de lavado con el TW80 (Figura IV.16).

A nivel de campo Martel *et al.* (1998b) utilizaron 0.9 volúmenes de poro de una solución de lavado que contenía: un alcohol (n-butanol), un tensoactivo (Hostapur



SAS) y dos disolventes (d-limoneno y tolueno) para recobrar 86% de la concentración inicial (55,000 mg/kg) de DNAPL (por sus siglas en inglés Dense Non Aqueous Phase Liquid ó líquido denso en fase no acuosa) en Thouin Sand Pit, Canadá.

A nivel de campo, en una refinería ubicada en el norte de México Iturbe *et al.* (2004a) utilizaron TW80 al 0.5% en el lavado *in situ* de 41.6 m<sup>3</sup> de suelo contaminado (69.5 toneladas) con 55,156 mg/kg de HTP, llegando al 98% de eficiencia de remoción en seis semanas, alternando ciclos de agua-tensoactivo y agua solamente, en cuanto a la eficiencia de remoción con respecto a la cantidad de tensoactivo utilizado obtuvieron 9,783 g HTP/g TW80 (0.5%). Cabe mencionar que además de la remoción de los hidrocarburos, también se obtuvo el 70% de eficiencia de remoción de hierro y 94.4% de vanadio.

### V.2.2 Lavado de suelo mecánico

A diferencia del lavado de suelo por inundación, en el lavado mecánico se observó un cambio brusco en la coloración del efluente desde el primer ciclo de lavado, incluso cuando se utilizó agua corriente como solución de lavado. La remoción del contaminante fue por una parte, un proceso físico, y adicionalmente a un proceso fisicoquímico cuando se utilizaron tensoactivos. El primero correspondió a la separación física del material fino (limos y arcillas) que generalmente se encuentra asociado con mayor cantidad de contaminantes hidrofóbicos, por efecto del mezclado y posteriormente de la sedimentación diferencial por tamaño y peso de las partículas, por lo tanto, los hidrocarburos removidos del suelo se concentraron en el efluente. El proceso fisicoquímico se presentó únicamente en los tratamientos con tensoactivo, aparentemente tuvo un efecto sinérgico en la remoción del contaminante, debido a la solubilización micelar (Figuras IV.12, IV.13 y IV.14). Sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la solución de lavado empleada, lo que significa que se podría ahorrar el costo del tensoactivo si se usara como solución de lavado agua corriente, aprovechando solamente el proceso físico. De esta manera, también se facilitaría y reduciría el costo del tratamiento del efluente, que solamente contendría hidrocarburo adsorbido a las partículas de suelo, y no tensoactivo como en los otros casos. Respecto al proceso físico mencionado para remover los hidrocarburos del suelo, Anderson *et al.* (1999) coinciden en que es de gran ayuda la separación por tamaño de partícula para reducir el volumen del material

a tratar; incluso se puede utilizar para suelos contaminados con metales pesados y/o radiactivos.

Cabe destacar que al utilizar el TW80 para lavar el suelo, se formaron costras de petróleo en la mezcladora mecánica (Figura III.17), lo cual tiene repercusiones en su operación y mantenimiento, a diferencia de cuando se utilizó el EW600, en el que fue evidente la solubilización del contaminante, hecho que se confirmó con las concentraciones en el efluente, sobre todo en el tercer ciclo de lavado en donde se alcanzó la concentración de 519.52 mg/L (Figura IV.17). Lo anterior se debe tomar en cuenta en el escalamiento de esta técnica de saneamiento, sobre todo por los costos adicionales que implicaría la operación y mantenimiento del sistema de mezclado si se utilizara el TW80.

Para escalar el lavado de suelo mecánico de nivel laboratorio a nivel de campo, se debe tomar en cuenta que en el primer caso se utilizó una mezcladora mecánica tipo tanque rotatorio para 10 L de capacidad (mezcla suelo-líquido), y en el segundo caso se tendría que diseñar y construir un equipo semejante o utilizar mezcladoras comerciales pero de mayor capacidad, como por ejemplo, una olla revolvedora de concreto (12 m<sup>3</sup>). En México se ha llevado a cabo el lavado de suelo fuera del sitio en estanques de lavado contruidos ex profeso, en donde el suelo y la solución de lavado son mezclados mediante una retroexcavadora, y posteriormente el efluente generado se bombea a un tanque de sedimentación para tratar las aguas residuales mediante un método fisicoquímico (Iturbe *et al.*, 2004b). Si se llevara a cabo el escalamiento del lavado de suelo en estanques con los resultados de laboratorio de la solución de lavado más eficiente, EW600 1% (mezclado continuo por 4 h en 2 ciclos de lavado), es importante mencionar que las eficiencias de remoción obtenidas podrían no ser las mismas en campo, debido a las diferencias entre ambas escalas en los sistemas de mezclado, así como también, debido al tiempo de contacto del suelo contaminado con el tensoactivo por las condiciones operativas del propio tratamiento y del drenado del efluente. No obstante, se seleccionó este tratamiento para estimar los costos de su implementación en campo.

Iturbe *et al.* (2004b) trataron 1,540 m<sup>3</sup> de suelo contaminado de una estación de almacenamiento y distribución de petróleo ubicada en el norte de México, mediante el lavado mecánico en estanques con el tensoactivo TW80 al 0.5%. El suelo

contaminado se lavó en cuatro lotes; el número de aplicaciones de solución de lavado en cada uno de ellos varió entre 1 y 3, al final se enjuagó con agua corriente; dando como resultado que la eficiencia de remoción variara entre 50.3 y 92.8% (promedio 83.42%), por otro lado, las eficiencias que consideran la cantidad de hidrocarburo removido con respecto a la cantidad de tensoactivo utilizado fueron de 7.88 a 55.45 g HTP/g de TW80 (0.5%). Comparando estos resultados con los del presente estudio, se puede decir que la eficiencia de remoción del contaminante cuando se utilizó el EW600 1% fue satisfactoria (95%), sin embargo, fue muy baja la eficiencia de remoción de hidrocarburos con respecto a la cantidad de tensoactivo utilizado (0.431 g HTP/g de EW600) (Figuras IV.12 y IV.13, Tabla IV.11), lo cual indica que posiblemente se deba optimizar la concentración de la solución de lavado, de tal manera que se evite el desperdicio del tensoactivo. Como ya se dijo anteriormente, se podría ahorrar el costo del tensoactivo si se usara como solución de lavado agua corriente, ya que también presentó alta eficiencia de remoción del contaminante (72%) por separación física del material fino (en el que está adsorbido el petróleo principalmente), por efecto del mezclado y posteriormente de la sedimentación diferencial por tamaño y peso de las partículas. De esta manera, también se facilitaría y reduciría el costo del tratamiento del efluente, que solamente contendría hidrocarburo y no tensoactivo.

Finalmente para llevar a cabo el lavado de suelo en estanques a nivel de campo, se debe considerar la disponibilidad y suministro de agua tanto para las soluciones de lavado como para el enjuague, así como, la infraestructura para tratar las aguas residuales generadas.

### V.3 Análisis técnico-económico

Para evaluar la factibilidad de aplicar una técnica de remediación en un sitio en particular se deben considerar tres cosas (Ellis, 2004):

- Factibilidad técnica, para lo cual se realiza un estudio de tratabilidad.
- Diseño ingenieril a escala de campo, considerando los resultados del estudio de tratabilidad y el siguiente punto.
- Condiciones específicas del sitio en estudio, incluye aspectos geográficos, legislativos, económicos, políticos y comerciales.

Aunado a lo anterior se debe calcular el costo de la aplicación de la técnica de remediación a escala de campo, para lo cual es necesario conocer todos los factores que intervienen en el proceso para analizarlos a detalle, como son: localización del proyecto, características propias del lugar, materiales y/o equipos necesarios, etc. Una forma de estimar el costo de una obra o proyecto, es por medio de los costos unitarios (Roldán, 2001), es decir, el precio de venta por cada unidad de obra, para cada concepto de trabajo. El precio unitario engloba los costos directos e indirectos, la utilidad, cargos adicionales y cargos por financiamiento (Bonilla, 2006).

De acuerdo con los resultados obtenidos y las consideraciones para el escalamiento en campo que se hicieron en el capítulo anterior, desde el punto de vista técnico se considera viable la aplicación a nivel laboratorio la biorremediación con nutrimentos-tensoactivo en el caso de los tratamientos biológicos, y en el caso de los fisicoquímicos, el lavado de suelo mecánico con EW600 1% o incluso con agua corriente solamente. A continuación se hace la estimación del costo de ambas técnicas de saneamiento a nivel de campo (on site): biolabranza y lavado de suelo mecánico con tensoactivo en estanques. En los dos casos se consideró como base de cálculo 1,000 m<sup>3</sup> de suelo contaminado (suponiendo que el área contaminada tiene 50 m largo X 20 m ancho X 1 m de profundidad), para lo cual tomó en cuenta los costos de mano de obra, materiales, maquinaria y equipo, y auxiliares para cada actividad (concepto de trabajo) que se describe en las Tablas V.2 y V.3. Finalmente el costo se expresó en pesos mexicanos por metro cúbico de suelo tratado (\$/m<sup>3</sup>) y su equivalente en dólares estadounidenses por metro cúbico de suelo tratado (USD/m<sup>3</sup>) considerando el tipo de cambio de \$10.85/USD (Banco de México, 2006).

### V.3.1 Biolabranza

De acuerdo con los resultados de los tratamientos biológicos, el menor tiempo de tratamiento y la mayor eficiencia de remoción del contaminante se obtuvo con la biorremediación con nutrimentos-tensoactivo. El tiempo estimado para que el suelo contaminado con 11,176.83 mg/kg de HTP, reduzca la concentración por abajo del LMP para uso agrícola o residencial (3,000 mg/kg) fue de 13 meses (Figuras IV.1, IV.2 y IV.3, y Tablas IV.3 y IV.4), por lo tanto, durante éste tiempo a nivel de campo se tratarían de mantener condiciones similares que a nivel de laboratorio, en cuanto al contenido de agua, nutrientes, tensoactivo y al mezclado de suelo, para promover la biodegradación aerobia de los hidrocarburos. En términos generales la biolabranza a nivel de campo consistiría en las actividades que se resumen en la Tabla V.2.

**Tabla V.2. Actividades para llevar a cabo la biolabranza.**

<b>Etapa (tiempo)</b>	<b>Actividad</b>
<b>Preparación del sitio (2 semanas)</b>	Desmante y despalme tanto del sitio contaminado (1,000 m <sup>2</sup> ) como del área de tratamiento (2,500 m <sup>2</sup> ).
	Construcción de bodega.
	Excavación de la celda de biorremediación de 60 m de largo X 40 m de ancho X 0.3 m de profundidad (720 m <sup>3</sup> ). La celda tiene que estar nivelada con un pendiente de por lo menos 2% (2 m de altura por cada 100 m de largo) hacia una fosa de lixiviados.
	Colocación de la membrana impermeable en la celda (2,500 m <sup>2</sup> : 61 m largo X 41 m ancho) y en la fosa de lixiviados (15 m <sup>2</sup> : 5 m de largo X 1 m de ancho X 0.5 m de profundidad), es recomendable emplear una membrana de por lo menos 30 mil (aproximadamente 0.76 mm) de grosor, de polietileno de alta densidad (HDPE) sellado térmicamente.
<b>Operación y mantenimiento (52 semanas = 13 meses)</b>	Excavación de 1,000 m <sup>3</sup> de suelo contaminado (50 m largo X 20 m ancho X 1 m de profundidad) y traslado de suelo a la celda de tratamiento.
	Bombeo y traslado del agua en camión pipa con sistema de bombeo integrado (de la Laguna El Yucateco al sitio de trabajo, 1 Km aproximadamente). Suponiendo que el suelo tiene 10% de contenido de agua, entonces se le agregará el 6% (en peso) adicional para mantener la mismas condiciones de humedad que en el laboratorio. Se sabe que la densidad real del suelo en estudio es de 1.15 g/cm <sup>3</sup> (1,150 kg/m <sup>3</sup> ), por lo tanto la cantidad de agua necesaria es 69,000 L = 69 m <sup>3</sup> . La capacidad del camión pipa es de 10 m <sup>3</sup> , por lo tanto se requiere el equivalente a 7 pipas de agua.
	Adición de nutrimentos y tensoactivo en solución (disueltos en 69 m <sup>3</sup> de agua). Se considerarán dos aplicaciones: al inicio y a la mitad del tratamiento (6.5 meses). La relación C:N:P es 100:29:0, pero para tratamientos de biorremediación se debe ajustar a 100:10:1 de acuerdo con el 80% de los HTP, por lo tanto, se requieren 89 mg P/kg, es decir, 102.35 kg. De acuerdo con la concentración de tensoactivo utilizada en laboratorio, 20 mg/kg de emulgín 600 (EW600), se adicionarán 23 kg de este tensoactivo.
	Volteo o mezclado del suelo (1,000 m <sup>3</sup> ), agua (69 m <sup>3</sup> ), fertilizante y tensoactivo (125.35 kg), aproximadamente 1,070 m <sup>3</sup> en la celda de biorremediación (60 m largo X 40 m ancho X 0.45 m de espesor).
	Durante los 13 meses que se estimó bajará la concentración de HTP, de 11,176.83 a 3,000 mg/kg que es el LMP para uso de suelo agrícola o residencial, se mantendrá el contenido de agua en 16% (adición de acuerdo a necesidades pero se puede suponer que se tendrán que aplicar 69 m <sup>3</sup> de agua por semana que es el equivalente a 7 pipas). Considerando que se van a utilizar dos retroexcavadoras para mezclar el suelo, el volteo de toda la mezcla (1,070 m <sup>3</sup> ) se realizaría 2 veces por semana.
	Muestreo y análisis bimestral (al tiempo 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 13 meses) de 10 muestras de suelo para HTP, bacterias aerobias, actividad microbiana por respirometría (CO <sub>2</sub> ).
<b>Abandono (2 semanas)</b>	Colocación de 1,000 m <sup>3</sup> de suelo tratado en su lugar de origen.
	Colocación del suelo excavado de la celda de biorremediación (suelo limpio) 720 m <sup>3</sup> .
	Ordenamiento y limpieza del sitio.
	Sembrado de especies vegetales autóctonas del sitio.

### V.3.2 Lavado de suelo mecánico con tensoactivo en estanques

De acuerdo con los resultados obtenidos en el lavado de suelo mecánico, la mejor solución de lavado para la remoción de HTP del suelo fue en la que se utilizó como tensoactivo el EW600 al 1%, requiriendo 2 ciclos de lavado para cumplir con el LMP para uso agrícola o residencial (3,000 mg/kg) (Figuras IV.12, IV.13 y IV.14 y Tablas IV.11 y IV.12). Sin embargo, para escalar esta técnica de saneamiento de nivel laboratorio a nivel de campo, se debe tomar en cuenta que en el primer caso se utilizó una mezcladora mecánica tipo tanque rotatorio para 10 L de capacidad (mezcla suelo-líquido), y en el segundo caso se tendría que diseñar y construir un equipo semejante o utilizar mezcladoras comerciales pero de mayor capacidad, como por ejemplo, una olla revolvedora de concreto (12 m<sup>3</sup>).

En México se ha llevado a cabo el lavado de suelo fuera del sitio en estanques de lavado, en donde una retroexcavadora mezcla el suelo con la solución de lavado, y posteriormente el efluente generado se bombea a un sistema de tratamiento de aguas residuales (Iturbe *et al.*, 2004b). El costo para esta técnica de remediación en campo se estimó con base en este procedimiento, sin embargo, se debe tomar con reserva puesto que no se tiene la certeza de que el mezclado de suelo sea igual de homogéneo y eficiente como indicaron los resultados de laboratorio, por otra parte, también se debe considerar que el tiempo de contacto del suelo contaminado con el tensoactivo es muy diferente en las dos escalas por las condiciones operativas del propio tratamiento y del drenado del efluente. Las actividades para llevar a cabo esta técnica de saneamiento se resumen en la Tabla V.3.

**Tabla V.3. Actividades para llevar a cabo el lavado de suelo mecánico con tensoactivo en estanques.**

<b>Etapa (tiempo)</b>	<b>Actividad</b>
<b>Preparación del sitio (4 semanas)</b>	Desmonte y despalme.
	Trazo y nivelación del terreno.
	Construcción de 2 estanques de lavado (A y B) de 120 m <sup>3</sup> (10 m de largo X 10 m de ancho X 1.2 m de alto).
	Construcción de 2 estanques de almacenamiento de agua (limpia y sucia) de 100 m <sup>3</sup> (20 m de largo X 5 m de ancho X 1 m de alto).
	Construcción de bodega.
	Bombeo y traslado del agua (de la Laguna El Yucateco al sitio de trabajo, 1 Km aproximadamente) para abastecer el tanque de almacenamiento de agua limpia.
	Instalación de los sistemas de bombeo de agua limpia (para solución de lavado y agua de enjuague) y sucia (para efluente).
<b>Operación y mantenimiento (26.5 semanas): 8 lotes de suelo de 128 m<sup>3</sup></b>	Excavación y traslado de 64 m <sup>3</sup> de suelo a cada estanque de lavado (A y B).
	Bombeo de 46 m <sup>3</sup> de agua a cada estanque de lavado para preparar la solución de lavado con 0.46 ton de EW600.
	Mezclado de suelo por 25 horas (3 jornadas de 8 horas) con la solución de lavado.
	Sedimentación (un día).
	Bombeo del efluente al estanque de almacenamiento de agua sucia.
	Bombeo de 64 m <sup>3</sup> de agua a cada estanque de lavado como agua de enjuague.
	Mezclado de suelo por 25 horas (3 jornadas de 8 horas) con el agua de enjuague.
	Sedimentación (un día).
	Bombeo del efluente al estanque de almacenamiento de agua sucia.
	Repetir las actividades anteriores (desde preparación de la solución de lavado) para el siguiente ciclo de lavado.
	Traslado del suelo tratado al área de secado.
	Limpieza de los estanques de lavado.
	Muestreo y análisis de HTP en el suelo tratado después de cada ciclo de lavado.
	<b>Abandono (2 semanas)</b>
Demolición de infraestructura.	
Ordenamiento y limpieza del sitio.	
Sembrado de especies vegetales autóctonas del sitio.	



De acuerdo con las actividades propuestas en la Tabla V.2, la biolabranza tendría una duración de un año y dos meses aproximadamente y el costo unitario para tratar el suelo en estudio sería de \$1,235/m<sup>3</sup> (114 USD/m<sup>3</sup>). Por otro lado, para llevar a cabo el lavado de suelo en estanques considerando las actividades de la Tabla V.3, se requerirían ocho meses y medio aproximadamente y el costo de tratamiento del suelo únicamente sería de \$1,407/m<sup>3</sup> (130 USD/m<sup>3</sup>), sin embargo, se tendría que sumar el costo adicional del tratamiento de las aguas residuales. De acuerdo con datos comerciales el costo de tratamiento de éstas es de aproximadamente \$2,800/m<sup>3</sup> (258 USD/m<sup>3</sup>). En la Tabla V.4 se puede ver que los tratamientos de tipo biológico como las biopilas o biolabranza son más baratos que los de tipo fisicoquímico como el lavado de suelo, ya sea *in situ* (soil flushing) o fuera del sitio (soil washing).

**Tabla V.4. Costos de tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos.**

Tipo de tratamiento	Costo (USD/m <sup>3</sup> )	Referencia
Biorremediación	131.00	Davis <i>et al.</i> , 1994
Tratamientos convencionales (fisicoquímicos y térmicos)	251.00	Davis <i>et al.</i> , 1994
Lavado de suelo <i>in situ</i> (soil flushing)	104.20	Iturbe <i>et al.</i> , 2004a
Lavado de suelo en estanques (soil washing)	140.00	Iturbe <i>et al.</i> , 2004b
Biopilas	94.20	Iturbe <i>et al.</i> , 2004b
Lavado de suelo en estanques (soil washing)*	130.00	Este trabajo
Biolabranza (landfarming)	114.00	Este trabajo

USD: dólares estadounidenses

\*no incluye el tratamiento de las aguas residuales generadas

Además del menor costo de tratamiento del suelo, una ventaja adicional que tiene la técnica de biolabranza con respecto al lavado de suelo, es que no genera subproductos que tengan que ser sometidos a un tratamiento adicional, como el agua residual de lavado. Sin embargo, en la biolabranza se requiere mayor tiempo de tratamiento y una superficie grande para poderse llevar a cabo.

## VI CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### VI.1 Conclusiones

1. De los métodos biológicos: atenuación natural, biorremediación con nutrientes y biorremediación con nutrientes-tensoactivo, las eficiencias de remoción de HTP del suelo al cabo de 140 días fueron muy similares (38, 36 y 39%, respectivamente), y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos.
2. El tiempo estimado para alcanzar la concentración del LMP para suelo agrícola o residencial que es de 3,000 mg/kg de HTP es: 14 meses para atenuación natural, 16 meses para biorremediación con nutrientes y 13 meses para biorremediación con nutrientes-tensoactivo.
3. El CO<sub>2</sub> que se produjo durante los 140 días fue estimado en 434.88, 429.04 y 393.21 mg CO<sub>2</sub>/kg para atenuación natural, biorremediación con nutrientes y biorremediación con nutrientes-tensoactivo, respectivamente.
4. Se determinó que existe correlación lineal entre la cantidad de HTP removidos y el CO<sub>2</sub> generado acumulado.
5. Se identificaron cinco bacterias Gram negativas y cinco bacterias Gram positivas, destacando la presencia de bacterias hidrocarbonoclastas: *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Acinetobacter baumannii* y *Brevibacillus brevis*.
6. El costo estimado para tratar el suelo por biolabranza a nivel de campo es de \$1,235/m<sup>3</sup> (114 USD/m<sup>3</sup>) y tendría una duración aproximadamente de un año y dos meses. Sin embargo, este tiempo está sujeto a factores ambientales regionales que podrían mejorar o limitar la biodegradación aerobia de los hidrocarburos, como es la temperatura y la precipitación pluvial, respectivamente.
7. De los métodos fisicoquímicos se comprobó que el lavado mecánico es más eficiente que el lavado por inundación, independientemente de la solución de lavado que se utilice (eficiencia después de 4 ciclos de lavado 72-95% vs eficiencia después de 14 ciclos 24-61%, respectivamente).

8. De las tres soluciones de lavado estudiadas: agua, TW80 1% y EW600 1%, la que presentó mejores eficiencias de remoción fue EW600 1%, seguido de TW80 1% y al final el agua tanto en la modalidad de lavado mecánico como por inundación
9. En el lavado por inundación se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre una u otra solución de lavado, resultando ser mejor la de EW600 1%.
10. En el lavado mecánico no se encontraron diferencias significativas entre las soluciones de lavado utilizadas, por lo tanto, se considera factible utilizar agua corriente para lavar el suelo. La remoción del contaminante se debió a un proceso físico (separación del material fino en el efluente), y adicionalmente a un proceso fisicoquímico cuando se utilizaron tensoactivos (solubilización del contaminante).
11. El número de ciclos de lavado estimado para alcanzar el LMP (3,000 mg/kg de HTP) por medio de lavado mecánico es: 4 ciclos con agua, 2 con TW80 1% y 2 con EW600 1%.
12. Las concentraciones de HTP en el efluente fueron muy bajas cuando se utilizó como solución de lavado agua y TW80 1%, a diferencia del EW600 1%, que presentó niveles dos órdenes de magnitud mayores, tanto en lavado de suelo por inundación como mecánico (1400.08 mg/L y 519.52 mg/L, respectivamente).
13. El costo estimado para tratar el suelo por lavado mecánico en estanques a nivel de campo es de \$1,407/m<sup>3</sup> (130 USD/m<sup>3</sup>), sin embargo, se tendría que sumar el costo adicional del tratamiento de las aguas residuales. El tiempo de tratamiento sería de ocho meses y medio aproximadamente.

## VI.2 Recomendaciones

- Para la determinación de textura y densidad real en suelos con altos contenidos de materia orgánica e hidrocarburos, que producen la formación de agregados y una alta hidrofobicidad del suelo seco, se recomienda realizar la extracción de los hidrocarburos del petróleo con hexano en equipo Soxhlet y posteriormente la oxidación de la materia orgánica con peróxido de hidrógeno (8%).
- Para evaluar la biodegradación de hidrocarburos en suelos, se debe incluir un control abiótico que permita medir la remoción del contaminante por otras vías como volatilización, adsorción y reacciones químicas. También se recomienda medir la cantidad de bacterias hidrocarbonoclastas del suelo, además de las bacterias heterótrofas.
- Evaluar si las 10 especies de bacterias identificadas en el presente trabajo participan en la biodegradación del petróleo crudo. Incluso sería conveniente realizar un estudio sobre la abundancia y diversidad bacteriana con capacidad de degradar hidrocarburos en el campo petrolero Cinco Presidentes, para seleccionar un consorcio microbiano que se pueda utilizar en la remediación de suelos por medio de bioaumentación.
- Analizar la eficiencia y tasa de remoción del contaminante en condiciones anaerobias, ya que éstas predominan en la región donde se encontró el derrame de petróleo, y serían determinantes si se quisiera llevar a cabo la remediación del suelo por medio de la técnica de atenuación natural.
- Hacer un estudio a escala piloto de lavado de suelo por inundación en el que se simulen las características geohidrológicas del sitio contaminado, que permita obtener resultados aplicables a escala de campo.
- Determinar si efectivamente existe una relación entre la concentración de HTP y el color en el efluente de lavado de suelo por inundación, que permita utilizar este último parámetro como variable de respuesta, con la ventaja de que sería más fácil, rápido y económico.
- Para apreciar con mayor claridad el comportamiento de la concentración de HTP en el efluente con respecto al tiempo, tanto en la solución de lavado como en el agua de enjuague, sería necesario realizar con mayor frecuencia el muestreo y análisis de

hidrocarburos. Se recomienda tomar muestras compuestas como se describe en la NOM-001-SEMARNAT-1996.

- Corroborar si efectivamente la conductividad hidráulica del suelo disminuye durante el lavado por inundación, ya que podría incrementar el tiempo que tarda en pasar la solución de lavado (o en su caso el agua de enjuague) a través del suelo, afectando de esta manera el tiempo total de tratamiento, y por lo tanto, también los costos.
- Comparar a escala piloto el proceso físico y el fisicoquímico en el lavado de suelo mecánico con agua y con tensoactivo respectivamente, para comprobar si efectivamente se obtienen eficiencias de remoción del contaminante similares (sin y con tensoactivo). Para evitar desperdicio de tensoactivo, se recomienda hacer pruebas en laboratorio para optimizar la concentración de la solución de lavado, posiblemente sea menor a la utilizada en este trabajo (1%).
- Por la naturaleza del contaminante del suelo, petróleo crudo, es posible que además de hidrocarburos también contenga metales pesados, por lo que se recomienda evaluar su remoción por medio de lavado de suelo mecánicamente.
- Con respecto al diseño experimental se recomienda analizar por lo menos tres réplicas por cada tratamiento en futuros estudios.

## VII ANEXOS

---

### VII.1 Descripción ambiental del campo petrolero Cinco Presidentes

#### A. Hidrología

Se ubica en la cuenca del Río Tonalá y Lagunas del Carmen y Machona, dentro de la Región hidrológica No. 29 que a su vez forma parte de la Región No. XI Frontera Sur (CNA, 2003). Los cuerpos de agua más importantes dentro de la zona son el río Chicozapote, que recorre en su parte media a los campos petroleros Cinco Presidentes, San Ramón, Rodador, Sánchez Magallanes y que se comunica con la laguna El Yucateco y continua hasta desembocar en el río Tonalá cerca del Golfo de México (CIMADES, 2001). La laguna El Yucateco tiene un área de aproximadamente 270 ha, además existe una vasta red de canales (~33 Km) que construyó PEMEX en los años 60's, con una superficie de aproximadamente 130 ha, los cuales drenan un considerable volumen de agua dulce al cuerpo lagunar producto del escurrimiento de los terrenos sujetos a inundación (pantanos) que circundan el área (CIMADES, 1997) (Figuras II.1 y II.2).

En cuanto a la hidrología subterránea, pertenece a la región geohidrológica No. 2702 La Chontalpa. En el área Agua Dulce-La Venta, el acuífero está contenido en material aluvial de poco espesor y en areniscas del Terciario que en conjunto reportan espesores de hasta 1,500 m, los primeros 500 m reportan agua dulce, en tanto que a mayor profundidad la cantidad de sólidos disueltos se incrementa al igual que la salinidad, hasta en ocasiones encontrar agua completamente salada. La dirección general del flujo de agua subterránea es de Sur a Norte, hasta llegar a su destino final, el Golfo de México. La permeabilidad es media y se da en material no consolidado (INEGI, 2001). Se trata de un acuífero no confinado (Cram *et al.*, 2004), el manto freático está o en la superficie (época de lluvias) o a menos de 1 m de profundidad (época de secas) (PARS, 1999a).

### ***B. Geología***

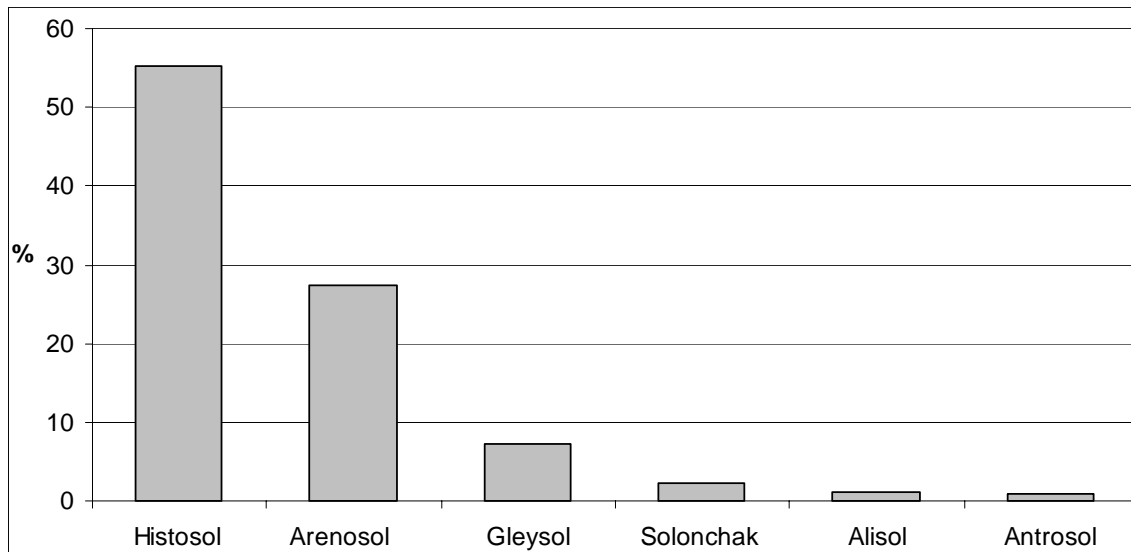
Geológicamente las formaciones dominantes dentro de la Región Hidrológica No. 29 corresponden a las eras Mesozoica y Cenozoica, y dentro de ellas las más importantes son del cretácico inferior, oligoceno, mioceno, pleistoceno y reciente (SARH, 1969). El Activo Cinco Presidentes abarca parcialmente cinco regiones geomorfológicas compuestas de sedimentos fluviales y marinos de edad cuaternaria, de norte a sur se distinguen: barrera litoral costera, lagunas costeras y marismas, pantanos de agua dulce, llanuras aluviales y lomeríos del pleistoceno (CODEZPET, 1989).

### ***C. Fisiografía***

La zona está comprendida en la Provincia de la llanura costera del sur, el relieve en esta zona es casi nulo con pocos metros sobre el nivel del mar, existen innumerables zonas sujetas a inundación. Tiene un relieve compuesto de terrenos planos con áreas de depresión a una altitud que varía de 2 a 17 msnm, no encontrando elevaciones superiores a 25 m (INEGI, 1988).

### ***D. Suelos***

Un estudio realizado por el Colegio de Postgraduados (1999) en los campos petroleros Cinco Presidentes, La Venta (Norte) y Rodador, determinó que existen 6 unidades de suelo: Histosol (55.3%), Arenosol (27.5%), Gleysol (7.2%), Alisol (1.1%), Antrosol (0.9%) y Solonchak (2.2%) (Figura VII.1).



**Figura VII.1. Unidades de suelo en los campos petroleros Cinco Presidentes y La Venta (Norte) (CP,1999).**

Los Histosoles son suelos orgánicos que presentan acumulación de materia orgánica en diferentes estados de descomposición, son ricos en nutrimentos, sus limitantes son muy baja densidad aparente, alta retención de humedad, manto freático elevado, inundación durante la mayor parte del año, régimen de humedad ácuico (saturación con agua casi todo el año) y acidez, en ocasiones presentan salinidad y sodicidad; fisiográficamente se localizan en extensas llanuras palustres con pendientes cóncavas próximas a lagunas, y en antiguas depresiones geomorfológicas ocupadas por materiales fluviales y palustres, principalmente entre los Ríos Tonalá, Chicozapote y la llanura litoral. Los Arenosoles son suelos de textura más gruesa que franco arenosa hasta una profundidad de al menos 100 cm, tienen baja fertilidad, manto freático elevado en época de lluvias y en algunos de ellos encharcamiento; se localizan en la llanura litoral estrecha, entre el Río Tonalá y la llanura palustre en forma paralela a la línea costera del Golfo de México. Los Gleyzoles presentan manto freático elevado durante una buena parte del año, inundaciones frecuentes y régimen de humedad ácuico, son suelos formados sobre materiales no consolidados (excluyendo materiales de texturas gruesas y depósitos aluviales que tengan propiedades flúvicas), que presentan propiedades gléyicas a menos de 50 cm de profundidad; se localizan bordeando los suelos Histosol y/o en pantanos adyacentes a llanuras aluviales bajas.



### **E. Clima**

El clima es cálido húmedo con abundantes lluvias en verano, la precipitación media anual es de 2,560 mm y la temperatura media anual de 25.9°C. La fórmula climática es  $Am(f)(i')gw$  (García, 1988 citado en Rivera, 2004a). De acuerdo con la estación meteorológica más cercana, La Venta (que se encuentra en el poblado del mismo nombre), la temperatura promedio es de 22°C, el mes más cálido es mayo con temperatura máxima promedio de 35°C, el mes mas frío se registra en los meses de enero y febrero con temperaturas de 17.7 °C. La precipitación es superior a los 1,500 mm anuales, el temporal comprende el período de mediados de junio a mediados de octubre, se puede considerar que junio, julio y agosto, es un período medio lluvioso, registrándose lluvias de moderadas a fuertes, septiembre y octubre se considera lluvioso, registrándose lluvias fuertes o torrenciales (383.2 y 463.5 mm, respectivamente); estos meses de septiembre y octubre, coinciden en la presencia de ciclones (CP, 1999). La humedad ambiental en el estado oscila entre 75 y 95% durante todo el año (González, 1995).

### **F. Vegetación**

En cuanto a la vegetación según el Colegio de Postgraduados (1999), en los campos petroleros Cinco Presidentes, La Venta (Norte) y Rodador los tipos de vegetación que destacan por su extensión son las comunidades de hidrófitas enraizadas emergentes (16.5%), el matorral espinoso e inerme inundable (13.8%), la selva baja inundable (7.37%) y el acahual o vegetación secundaria (6.4%). Mención aparte debe de hacerse del manglar, el cual ocupa el 10.28% del área y guarda una estrecha relación con la salinidad de los suelos (Solonchaks e Histosoles sodi-térricos). Existen además algunas otras asociaciones vegetales que se presentan en menores superficies como son: el manglar asociado con la selva baja inundable (0.22%), el matorral espinoso e inerme inundable asociado con selva baja inundable (1.26%), el palmar inundable (2.57%) y la asociación de este último con la comunidad hidrófita enraizada emergente (0.35%). Además es importante mencionar que existen seis especies de flora arbórea vulnerables (amenazadas, en protección especial o raras) de acuerdo con la NOM-059-ECOL-1994 y la norma internacional de la Convención Internacional Sobre el Tratado de Especies Amenazadas (CITES) (Tabla VII.1).

**Tabla VII.1. Flora maderable en algún estatus de vulnerabilidad de los campos petroleros Cinco Presidentes, La Venta (Norte) y Rodador según NOM-059-ECOL-1994 (CP, 1999).**

Nombre científico	Familia	Estatus de vulnerabilidad
<i>Avicennia germinans L.</i>	Verbenaaceae	protección especial
<i>Calophyllum brasiliense Camb.</i>	Clusiacea	amenazada
<i>Laguncularia racemosa (L). Gaertn.</i>	Combretaceae	protección especial
<i>Rhizophora mangle L.</i>	Rhizophoraceae	protección especial
<i>Roystonea regia H.B.K.</i>	Arecaceae	rara
<i>Spondias radlkoferi Donn. Smith</i>	Anacardiaceae	amenazada

**G. Actividades productivas**

Aparte de la actividad industrial petrolera, las actividades productivas que se desarrollan en el campo petrolero Cinco Presidentes son: agricultura (cocoteros, pastizales y frutales), ganadería (ganado bovino principalmente cebú), forestal (manglar rojo, blanco y negro) y pesca (peces y crustáceos) (CIMADES, 1997; CP, 1999).

## VII.2 Identificación de bacterias

### VII.2.1 Selección y purificación de colonias bacterianas

Los pasos que se siguieron para la selección y purificación de colonias bacterianas fueron los siguientes:

1. Se hicieron diluciones decimales a partir de la dilución primaria de 1 g de suelo y 9 mL de solución salina (0.85 g NaCl en 100 mL de agua destilada); para lo cual se toma 1 mL de dicha dilución y se adicionan a 9 mL de solución salina para obtener la dilución  $1 \times 10^{-1}$ , tomando ahora 1 mL de ésta para obtener la dilución  $1 \times 10^{-2}$ , y así sucesivamente hasta llegar a la dilución  $1 \times 10^{-6}$  o la que se requiera dependiendo del tipo de suelo y de la concentración bacteriana.
2. Se sembró superficialmente 0.1 mL de cada dilución decimal en cajas petri con 25 mL de medio de cultivo Agar Soya Trypticaseína (TSA), previamente pasadas por la prueba de esterilidad e incubación (28°C/24 h).
3. De cada dilución se identificó y caracterizó morfológicamente (color y forma) las colonias de bacterias que se observaron claramente aisladas y diferentes entre sí (Figura III.18).
4. Se tomó una alícuota de cada colonia seleccionada con una asa bacteriológica y se sembró por estría en cajas petri con 25 mL de medio de cultivo TSA, previamente pasadas por la prueba de esterilidad e incubación (28°C/24 h).
5. Se corroboró cualitativamente que las bacterias tuvieran la misma morfología colonial para nuevamente sembrar por estría en TSA (28°C/24 h). Se repitió este procedimiento por cinco veces para purificar el cultivo.
6. Se aplicó la tinción de Gram a cada colonia para distinguir a las bacterias Gram positivas y Gram negativas, y a la par se determinó su morfología celular (cocos o bacilos) (Figura III.19).

## VII.2.2 Bacterias Gram positivas (BBL Crystal Rapid Gram-positive ID System)

Se utilizó el sistema BBL Crystal Rapid Gram-positive ID System (Becton Dickinson, Francia) para bacterias Gram positivas. Es un método de identificación en miniatura que utiliza substratos convencionales, fluorogénicos y cromogénicos modificados, para la identificación de bacterias Gram positivas aerobias. Incluye pruebas para la fermentación, la oxidación, la degradación y la hidrólisis de varios substratos. Después de un periodo de incubación (35-37°C/4 h), se examinaron los cambios de color o presencia de fluorescencia que resultaron de las actividades metabólicas de los microorganismos. La serie de colores resultante de las 29 reacciones dieron como resultado un número de perfil de diez dígitos que se utilizó como la base de identificación. La identificación se deriva de un análisis comparativo entre las series de reacciones del aislado de prueba y de la base de datos BBL Crystal. Se utilizaron aislados puros en Agar Soya Trypticaseína con 5% de sangre de cordero de 24 horas (BD, 2006) (Figura III.20).

A continuación se describe el procedimiento, pero se recomienda consultar el instructivo.

1. Se sembraron por estría las colonias de bacterias Gram positivas en Agar Soya Trypticaseína con sangre de cordero (TSA II BBL Crystal) y se incubaron a 28°C por 24 h.
2. Se realizaron las pruebas de catalasa, oxidasa y movilidad.
3. Con un palillo de madera estéril se tomó una muestra de una colonia para ponerla en suspensión en un tubo de fluido de inóculo BBL Crystal, se agitó en un vórtex por 10-15 segundos y se comparó la turbidez hasta igualarla a un patrón McFarland No. 2.
4. Se vertió el contenido del tubo en el área demarcada de la base balanceándola suavemente hasta que los pocillos se llenaron con el inóculo, escurriendo el exceso, y posteriormente se colocó la tapa hasta sentir una leve resistencia.
5. Se incubó el panel boca abajo de de 35-37°C/4 h.
6. Los paneles se leyeron boca abajo usando una lámpara de luz ultravioleta y la plantilla de reacciones de color (BBL CRYSTAL Rapid Gram-positive



Identification Color Chart) (Figura VII.2) dentro de los 30 minutos después de sacarlos de la incubadora, se registraron los resultados positivos o negativos en la hoja de resultados (Figura VII.3).

7. Se calculó el No. de perfil de 10 dígitos, considerando que cada reacción positiva (excepto 4a, que se utilizó como control negativo de fluorescencia recibe un valor de 4, 2 ó 1, correspondiente a la fila donde se encuentre la reacción). Cada resultado negativo recibió un valor de 0 (cero). Los valores resultantes de cada reacción positiva en cada columna se sumaron.
8. Se determinó la especie de la bacteria utilizando el libro electrónico de códigos BBL Crystal versión 4.0 (BD, 1999), introduciendo el No. de perfil y la morfología celular.

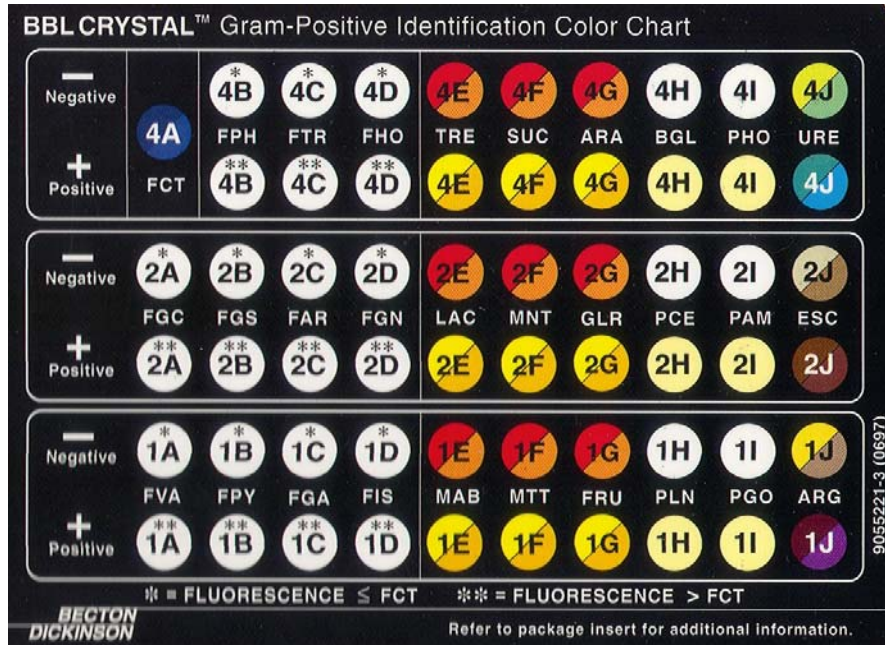


Figura VII.2. Plantilla de reacciones de color BBL.

**BD BBLCRYSTAL™**  
Rapid Gram-Positive ID System / RGP 同定検査キット

Reference # / 参照番号: \_\_\_\_\_  
 N° de referencia / Referenznr. / N° di riferimento / N° de referencia /  
 Referencia / Referenz

Source/Site / 検体採取部位: \_\_\_\_\_  
 Origine/Site / Quelle/Labor / Provenienza/Sede / Fuente/Lugar /  
 Fonte/Local / Källa/Plats / Kilde/Sted

Organism ID / 同定番号 / ID de l'organisme / ID des  
 Organismus ID dell'organismo / ID del organismo /  
 ID do Organismo / Organism-ID / Organisme-ID

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	FCT	FAR	FHO	FVA	ARA	MNT	TRE	POG	BGL	URE
2	FGC	FME	FPY	FPH	MAL	GAL	MNS	AGL	PHO	ESC
1	FPR	FCE	FTR	FGS	DXT	AGN	MTT	PCE	PPG	ORN

# / N° \_\_\_\_\_  
 番号 \_\_\_\_\_

Supplemental Test Information / 追加検査の情報  
 Information d'analyse supplémentaire / Zusätzliche Testinformationen  
 Informazioni di test supplementari / Información del análisis suplementario  
 Informações Suplementares para o Teste / Ytterligere testinformation  
 Supplementäre testinformation

Additional Information / その他の情報  
 Information supplémentaire / Zusätzliche Informationen  
 Informazioni supplementari / Información adicional /  
 Informações Suplementares / Ytterligere opplysninger /  
 Ytterligere information

Becton, Dickinson and Company  
 Sparks, Maryland 21152 USA  
 3880 Le Pont de Claix, France  
 日本ベクトン・ディキンソン株式会社

9055101 (0900)

Figura VII.3. Hoja de resultados BBL.

### VII.2.3 Bacterias Gram negativas (API20E)

Se utilizó el sistema de identificación API20E (Biomérieux, Francia) para bacterias Gram negativas. Es un sistema estandarizado que permite la identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes, que incluye 21 pruebas bioquímicas miniaturizadas, así como una base de datos. La galería se compone de 20 microtubos que contienen los sustratos deshidratados (la prueba de oxidasa se realiza aparte). Los microtubos se inoculan con una suspensión bacteriana que reconstituye las pruebas. Las reacciones producidas durante el periodo de incubación (35-37°C/24 h) se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos. La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la tabla de lectura (colores de reacciones positivas y negativas) y la identificación se obtiene con la ayuda del software de identificación (APIWeb) (Biomérieux, 2005) (Foto III.21).

A continuación se describe el procedimiento, pero se recomienda consultar el instructivo.

1. Se sembraron por estría las colonias de bacterias Gram negativas en TSA, previamente pasadas por la prueba de esterilidad e incubación (28°C/24 h).
2. Se aplicaron las pruebas de catalasa, oxidasa y movilidad.
3. Se distribuyeron aproximadamente 5 mL de agua destilada en los alvéolos de la cámara de incubación para crear la atmósfera húmeda.
4. Con un palillo estéril de madera se tomó una muestra de una colonia, y se puso en suspensión en un tubo de vidrio con tapón de rosca que contenía 5 mL de solución salina estéril (0.85 g NaCl en 100 mL de agua destilada). Esta suspensión se agitó en un vórtex por 10-15 segundos y se comparó su turbidez hasta igualarla con un patrón McFarland No. 1.
5. Con una pipeta estéril desechable se llenaron los tubos de las galerías con la suspensión bacteriana, y en los casos de las pruebas de CIT, VP y GEL se llenaron también las cúpulas. Posteriormente se adicionó aceite de parafina (aceite mineral) en las cúpulas de las pruebas de ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S y URE para crear anaerobiosis.

6. Se cubrieron las cámaras de incubación con sus respectivas tapas y se incubaron de 35-37°C/24 h.
7. Se registraron en la hoja de resultados (Figura VII.4) las reacciones espontáneas ya sea positivas o negativas de la galería por medio de la tabla de lectura (Figura VII.5), se tuvo especial cuidado en la prueba GLU antes de revelar las pruebas que requieren reactivos: TDA (una gota del reactivo TDA), IND (una gota del reactivo James), VP (una gota de los reactivos VP1 y VP2), NO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> (una gota de los reactivos NIT 1 y NIT 2 en el tubo GLU, se registraron las reacciones y al final se adicionó 2-3 g de Zn en el mismo tubo). Las pruebas VP, NO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> liberan gas que puede alterar la interpretación de las otras pruebas por lo que deben dejarse para el final.
8. Se determinó perfil numérico de 7 dígitos de acuerdo a lo siguiente: en la hoja de resultados las pruebas están separadas en grupos de tres y se indica para cada una un valor de 1, 2 ó 4. Como la galería API20E contiene 20 pruebas, sumando al interior de cada grupo los valores que corresponden a reacciones positivas, se obtuvo un perfil numérico de 7 cifras (a la reacción de la oxidasa que constituye la prueba No. 21 se le asignó el valor de 4 cuando fue positiva) (Figura VII.4).
9. Se determinó la especie de la bacteria utilizando el APIWeb V4.0, utilizando el bionúmero.





		CE 07223 B	REF.: _____ / _____ / _____
		Origine / Source / Herkunft / Origen / Origem / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :	
			
1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4 1 2 4		1 2 4 1 2 4	
ONPG ADH LDC ODC LGIT H <sub>2</sub> S URE TDA IND LVP LGEL GLU MAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA OX		NO <sub>2</sub> N <sub>2</sub> MOB McC OF-0 OF-F	
Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy :		Ident. / Ταυτοποίηση :	

Figura VII.4. Hoja de resultados API20E.

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	QTE (mg/cúp)	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
				NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	2-nitro-fenil-β-D-galactopiranosida	0,223	β-galactosidasa (orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosidasa)	incoloro	amarillo (1)
ADH	L-arginina	1,9	Arginina-dihidrolasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
LDC	L-lisina	1,9	Lisina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
ODC	L-ornitina	1,9	Ornitina Decarboxilasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
[CIT]	citrato trisódico	0,756	utilización del CITrato	verde pálido/amarillo	azul-verde/azul (3)
H <sub>2</sub> S	tiosulfato sódico	0,075	producción de H <sub>2</sub> S	incoloro/grisáceo	depósito negro/fin liserado
URE	urea	0,76	UREasa	amarillo	rojo/anaranjado (2)
TDA	L-triptófano	0,38	Triptófano DesAminasa	TDA / inmediato amarillo   marrón-rojizo	
IND	L-triptófano	0,19	producción de INDole	JAMES / inmediato incoloro   rosa verde pálido/ amarillo	
[VP]	piruvato sódico	1,9	producción de acetoina (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / 10 min incoloro   rosa/rojo (5)	
[GEL]	Gelatina (origen bovino)	0,6	Gelatinasa (GELatina)	no difusión	difusión pigmento negro
GLU	D-glucosa	1,9	fermentación/oxidación (GLUcosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo/amarillo grisáceo
MAN	D-manitol	1,9	fermentación/oxidación (MANitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
INO	inositol	1,9	fermentación/oxidación (INOsitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SOR	D-sorbitol	1,9	fermentación/oxidación (SORbitol) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
RHA	L-ramnosa	1,9	fermentación/oxidación (RHAmaosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
SAC	D-sacarosa	1,9	fermentación/oxidación (SACarosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
MEL	D-melibiosa	1,9	fermentación/oxidación (MELibiosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	0,57	fermentación/oxidación (AMYgdalina) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
ARA	L-arabinosa	1,9	fermentación/oxidación (ARAbinosa) (4)	azul/azul verdoso	amarillo
OX	(ver ficha técnica del test de oxidasa)		citocromo-OXidasa	(ver ficha técnica del test de oxidasa)	

(1) Un color amarillo muy ligero también implica resultado positivo.  
(2) La aparición de un color naranja tras 36-48 H de incubación debe considerarse negativa.  
(3) Lectura en la cúpula (zona aerobia).  
(4) La fermentación comienza en la parte inferior de los tubos, mientras que la oxidación empieza en la cúpula.  
(5) Una ligera coloración rosa, que aparece tras 10 minutos, debe ser leída como negativa.  
• Las cantidades indicadas pueden ser ajustadas en función de los títulos de las materias primas.  
• Ciertas cúpulas contienen componentes de origen animal, notablemente peptonas.

Figura VII.5. Tabla de lectura API20E.

### VII.3 Resultados de las variables de respuesta (2 réplicas)

A continuación se muestran los resultados de las concentraciones de HTP en el suelo, la cantidad de bacterias aerobias y la cantidad de CO<sub>2</sub> generado en cada una de las unidades experimentales (R<sub>1</sub>: réplica 1, R<sub>2</sub>: réplica 2) de los métodos biológicos (Tablas VII.2, VII.3 y VII.4).

**Tabla VII.2. Concentración de HTP en suelo (mg/kg) en cada unidad experimental de los tratamientos biológicos.**

Días	Atenuación natural	Biorremediación con nutrientes	Biorremediación con nutrientes-tensoactivo
15 R <sub>1</sub>	9,880.01	9,341.61	9,994.51
15 R <sub>2</sub>	10,017.34	10,282.47	10,540.84
30 R <sub>1</sub>	9,413.75	9,092.28	9,342.75
30 R <sub>2</sub>	8,670.07	8,383.96	8,488.49
60 R <sub>1</sub>	9,733.22	8,779.88	9,344.27
60 R <sub>2</sub>	7,996.07	8,225.56	8,364.92
140 R <sub>1</sub>	7,693.80	7,469.50	6,391.27
140 R <sub>2</sub>	6,084.65	6,938.38	7,167.13

**Tabla VII.3. Cantidad de CO<sub>2</sub> generado (mg CO<sub>2</sub>/kg hr) en cada unidad experimental de los tratamientos biológicos.**

Días	Atenuación natural	Biorremediación con nutrientes	Biorremediación con nutrientes-tensoactivo
15 R <sub>1</sub>	0.057	0.027	0.004
15 R <sub>2</sub>	0.035	0.040	0.034
30 R <sub>1</sub>	0.004	0.031	0.030
30 R <sub>2</sub>	0.027	0.027	0.041
60 R <sub>1</sub>	0.028	0.030	0.032
60 R <sub>2</sub>	0.015	0.032	0.022
140 R <sub>1</sub>	0.038	0.037	0.063
140 R <sub>2</sub>	0.093	0.049	0.023

**Tabla VII.4. Cantidad de bacterias aerobias (UFC/g) en cada unidad experimental de los tratamientos biológicos.**

Días	Atenuación natural	Biorremediación con nutrientes	Biorremediación con nutrientes-tensoactivo
15 R <sub>1</sub>	1.0X10 <sup>6</sup>	2.9X10 <sup>6</sup>	1.3X10 <sup>6</sup>
15 R <sub>2</sub>	1.1X10 <sup>6</sup>	1.1X10 <sup>7</sup>	3.1X10 <sup>6</sup>
30 R <sub>1</sub>	1.5X10 <sup>6</sup>	8.0X10 <sup>5</sup>	3.0X10 <sup>7</sup>
30 R <sub>2</sub>	1.5X10 <sup>6</sup>	6.8X10 <sup>5</sup>	3.0X10 <sup>7</sup>
60 R <sub>1</sub>	2.4X10 <sup>5</sup>	3.6X10 <sup>5</sup>	3.8X10 <sup>4</sup>
60 R <sub>2</sub>	3.6X10 <sup>5</sup>	6.3X10 <sup>5</sup>	3.8X10 <sup>4</sup>
140 R <sub>1</sub>	2.5X10 <sup>4</sup>	3.6X10 <sup>4</sup>	1.8X10 <sup>5</sup>
140 R <sub>2</sub>	2.4X10 <sup>5</sup>	2.9X10 <sup>4</sup>	9.9X10 <sup>4</sup>

A continuación se muestran los resultados de las concentraciones de HTP tanto en el suelo como en el efluente, en cada una de las unidades experimentales (R<sub>1</sub>: réplica 1, R<sub>2</sub>: réplica 2) de los métodos fisicoquímicos (Tablas VII.5, VII.6, VII.7 y VII.8).

**Tabla VII.5. Concentración de HTP en suelo (mg/kg) en cada unidad experimental de lavado de suelo por inundación.**

Ciclo de lavado	agua	TW80 1%	EW600 1%
Séptimo R <sub>1</sub>	11,310.58	9,154.76	4,101.32
Séptimo R <sub>2</sub>	9,500.22	10,511.09	4,840.97
Catorceavo R <sub>1</sub>	8,968.74	9,415.47	4,494.21
Catorceavo R <sub>2</sub>	8,080.53	6,057.98	4,272.93

**Tabla VII.6. Concentración de HTP en el efluente (mg/L) en cada unidad experimental de lavado de suelo por inundación.**

Ciclo de lavado	agua	TW80 1%	EW600 1%
Séptimo R <sub>1</sub>	24.19	4.66	2,264.92
Séptimo R <sub>2</sub>	0.00	2.20	535.23
Catorceavo R <sub>1</sub>	0.53	1.73	398.70
Catorceavo R <sub>2</sub>	3.58	4.53	641.77

**Tabla VII.7. Concentración de HTP en suelo (mg/kg) en cada unidad experimental de lavado de suelo mecánico.**

Ciclo de lavado	agua	TW80 1%	EW600 1%
Primero R <sub>1</sub>	4,363.22	5,009.83	4,213.38
Primero R <sub>2</sub>	4,977.94	6,529.94	2,865.63
Segundo R <sub>1</sub>	4,787.98	4,025.80	3,071.93
Segundo R <sub>2</sub>	3,423.88	6,732.76	4,833.60
Tercero R <sub>1</sub>	4,970.68	1,077.85	2,385.69
Tercero R <sub>2</sub>	2,565.52	3,689.45	2,556.55
Cuarto R <sub>1</sub>	2,705.53	769.17	412.49
Cuarto R <sub>2</sub>	769.17	2,512.37	824.21

**Tabla VII.8. Concentración de HTP en el efluente (mg/L) en cada unidad experimental de lavado de suelo mecánico.**

Ciclo de lavado	agua	TW80 1%	EW600 1%
Primero R <sub>1</sub>	2.50	9.70	29.50
Primero R <sub>2</sub>	11.05	9.89	20.49
Segundo R <sub>1</sub>	2.72	6.77	37.26
Segundo R <sub>2</sub>	23.46	23.52	27.25
Tercero R <sub>1</sub>	2.52	5.59	50.55
Tercero R <sub>2</sub>	7.24	11.41	988.49
Cuarto R <sub>1</sub>	4.13	5.60	22.41
Cuarto R <sub>2</sub>	12.37	4.66	78.13

## VII.4 Determinación del CO<sub>2</sub> acumulado total en los tratamientos biológicos

Otra forma de analizar la tendencia de generación de CO<sub>2</sub> es por medio de los valores acumulados, en vez de hacerlo de manera puntual en cada día de muestreo; de esta manera se puede estimar la cantidad total de CO<sub>2</sub> que se generó durante un cierto tiempo a partir de los hidrocarburos del suelo, y además se puede evaluar si existe correlación entre estas dos variables. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

Para cada tratamiento biológico se obtuvieron los valores promedio de la actividad microbiana en cada muestreo (0, 15, 30, 60 y 140 días), y después los valores acumulados de éstos. Como se muestra en la Figura IV.5 la tendencia de la generación de CO<sub>2</sub> acumulado durante los 140 días se puede considerar lineal en los tres casos, ya que el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) es  $> 0.9$ , sin embargo, se puede ver que en los primeros 30 días la generación también sigue una tendencia lineal ( $r^2 > 0.9$ ) pero más pronunciada que en los 110 días restantes, lo cual se puede corroborar por sus pendientes, que representan la tasa de generación de CO<sub>2</sub> (mg CO<sub>2</sub>/kg día) durante el tratamiento (Kim *et al.*, 2005; Plaza *et al.*, 2005) (Tabla VII.9). De esta manera al utilizar los valores de ordenada al origen y pendiente de la ecuación para cada intervalo de tiempo, se puede estimar la generación total de CO<sub>2</sub> durante todo el tiempo de tratamiento (Tabla VII.10).

**Tabla VII.9. Coeficientes de regresión lineal entre CO<sub>2</sub> generado acumulado y tiempo.**

Tratamiento	Intervalo de tiempo (días)	m = pendiente (mg CO <sub>2</sub> /kg día)	b = ordenada al origen (mg CO <sub>2</sub> /kg)
Atenuación natural	0-30	0.0492	1.0573
	30-140	0.0191	1.8145
Biorremediación con nutrimentos	0-30	0.0502	0.9544
	30-140	0.0155	2.0939
Biorremediación con nutrimentos-tensoactivo	0-30	0.0436	0.8686
	30-140	0.0147	1.8887

**Tabla VII.10. Estimación del CO<sub>2</sub> acumulado total (mg CO<sub>2</sub>/kg) en tratamientos biológicos durante 140 días.**

Día	Atenuación natural	Biorremediación con nutrientes	Biorremediación con nutrientes-tensoactivo
0	1.0573	0.9544	0.8686
1	1.1065	1.0046	0.9122
2	1.1557	1.0548	0.9558
3	1.2049	1.1050	0.9994
4	1.2541	1.1552	1.0430
5	1.3033	1.2054	1.0866
6	1.3525	1.2556	1.1302
7	1.4017	1.3058	1.1738
8	1.4509	1.3560	1.2174
9	1.5001	1.4062	1.2610
10	1.5493	1.4564	1.3046
130	4.2975	4.1089	3.7997
131	4.3166	4.1244	3.8144
132	4.3357	4.1399	3.8291
133	4.3548	4.1554	3.8438
134	4.3739	4.1709	3.8585
135	4.3930	4.1864	3.8732
136	4.4121	4.2019	3.8879
137	4.4312	4.2174	3.9026
138	4.4503	4.2329	3.9173
139	4.4694	4.2484	3.9320
140	4.4885	4.2639	3.9467
<b>Total (mg CO<sub>2</sub>/kg)</b>	<b>434.88</b>	<b>429.04</b>	<b>393.21</b>

De esta manera se tiene que para cada tratamiento biológico se generaron en total 434.88, 429.04 y 393.21 mg CO<sub>2</sub>/kg para atenuación natural, biorremediación con nutrimentos y biorremediación con nutrimentos-tensioactivo, respectivamente (Figura IV.6).



## VIII REFERENCIAS

---

- AA-117-SCFI-2001. Análisis de agua - determinación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - método de prueba.
- Aboul-Kassim T. A. T., Simoneit B. R. T., 2001. Microbial transformations at aqueous-solid phase interfaces: A bioremediation approach. En: Aboul-Kassim T. A. T., Simoneit B. R. T. (Eds). Pollutant-Solid Phase Interactions - Mechanisms, Chemistry and Modeling. pp. 315-425. The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 5 Part E. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Adams R., Domínguez R. V., García H. L., 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra*, **17**(2):159-174.
- Adams R. H. S., Domínguez R. V. I., Vinalay C. L., 2002. Evaluation of microbial respiration and ecotoxicity in contaminated soils representative of the petroleum-producing region of southeastern Mexico. *Terra*, **20**(3):253-265.
- Alef K., 1998. Soil respiration. En: Alef K., Nannipieri P. (Eds). Methods in applied soil microbiology and biochemistry. pp. 214-216. Academic Press. Harcourt Brace & Company, Publishers. Great Britain, 576 p.
- Alquati C., Papacchini M., Riccardi C., Spicaglia S. y Bestetti G., 2003. Characterization of naphthalene-degrading bacteria isolated from petroleum contaminated site. Second European Bioremediation Conference, pp. 465-468. Chania, Crete, Greece.
- Altamirano G. M. y Pozzo A. M. G., 2000. Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburohíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, III-131. Porto Alegre, Brasil. Disponible en: <http://www.ingenieroambiental.com/new2informes/bacteriasbioremediacionpetroleo.pdf>. Fecha de consulta: 3 de junio de 2006.

- Anderson R., Rasor E. y Van R. F., 1999. Particle size separation via soil washing to obtain volume reduction. *Journal of Hazardous Materials*, 66(1-2): 89-98
- ASTM, 1998. ASTM D422-63. Standard test method for particle-size analysis of soils. USA.
- Banco de México, 2006. Tipo de cambio interbancario pesos por dólar. Disponible en: <http://www.banxico.org.mx>. Fecha de consulta: 8 de diciembre de 2006.
- Baker K. H. y Herson D. S., 1994. *Biorremediation*. McGraw-Hill Inc, USA.
- BD, 1999. Libro electrónico de códigos BBL Cristal versión 4.0. Becton Dickinson and Company, USA.
- BD, 2006. Instructivo Sistemas de identificación BBL Cristal. Equipo para la identificación rápida de bacterias Gram-positivas (español). Becton Dickinson and Company, C.E. 8809711 2004/06, U.S. Pat. 5,182,082 y 5,338,666. USA, 43 p.
- Biomérieux, 2005. Instructivo Sistema de identificación de *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes (español). Ref 20 100/20 160, 07584E-ES-2004/05.
- Bolaynas L. R., 2003. Elaboración de criterios para la limpieza de sitios contaminados por hidrocarburos en el estado de Tabasco y Norte de Chiapas. Tesis de licenciatura. UJAT (Ingeniería Ambiental), Villahermosa, Tabasco.
- Bonilla M. F. 2006. Apuntes del taller de análisis de precios unitarios y elaboración de cotizaciones. Departamento de Control y Seguimiento de Proyectos de la Gerencia de Estudios de Ingeniería Civil, CFE.
- Botello A. V., Ponce V. G., y Macko S. A., 1996. Niveles de concentración de hidrocarburos en el Golfo de México. En: Botello A. V., Rojas Galaviz J. L., Benítez J. y Zárate Lomelí D. (Eds.). *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. pp. 225-253. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México, 666 p.
- Box G. E., Hunter W. G. y Hunter J. S., 2000. *Estadística para investigadores. Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*. Reverté S.A., México, 675 p.

- Brawn C. M., Campbell I. y Driest F. G., 1989. Introducción a la biotecnología. Acribia S. A., España, 167 p.
- CIMADES, 1997. Análisis de la calidad del agua y niveles de hidrocarburos del sistema Laguna El Yucateco – Río Chicozapote, Municipio de Cárdenas, Tabasco. Certeza Tabasco, 62 p.
- CIMADES, 2001. Descripción de las condiciones de la infraestructura petrolera y del entorno ambiental del Activo Cinco Presidentes, ubicado en los municipios de Cárdenas y Huimanguillo del estado de Tabasco. Estudios e investigaciones. Archivo interactivo. Gobierno del Estado de Tabasco, México.
- CNA, 2003. Programa Hidráulico Regional 2002-2006. Región XI Frontera Sur. Comisión Nacional del Agua, 132 p.
- Cochran W. G. y Cox G. M., 1991. Diseños experimentales. Trillas.
- CODEZPET, 1989. Diagnóstico preliminar de afectación ambiental de las instalaciones de los distritos de Agua Dulce y El Plan, de la Zona Sur de PEMEX en el Estado de Tabasco. CODEZPET, Subdirección de protección y restauración ecológica, 35 p.
- Corona-Ramírez L., Iturbe-Argüelles R., 2005. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, **VI**(2): 119-126.
- Cortinas de Nava C., 2002. Marco conceptual de la remediación de sitios contaminados. Proyecto desarrollo institucional para la gestión de sitios contaminados. PN:99.21.34.3. SEMARNAT-GTZ.
- CP (Colegio de Postgraduados), 1999. Diagnóstico de los recursos naturales, niveles de contaminación y alternativas para el desarrollo del área de influencia de los campos petroleros Cinco Presidentes y la Venta Norte, Tabasco. Gobierno del Estado de Tabasco, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas Campus Tabasco, CIMADES, 420 p.
- Cram S., Siebe C., Ortiz S. y Herre A., 2004. Mobility and persistence of petroleum hydrocarbons in peat soils of Southeastern Mexico. *Soil & Sediment Contamination*, **13**: 341-360.

- Cruz C. M. R., Jiménez H. R., Espitia C. A., Uribe H. K., Torrecilla D. V., Castañeda B. M. T., Pérez A. M. y Villalpando C. R. E., 2005. Bacterias nativas de suelos contaminados con residuos derivados de la explotación del petróleo. Memorias del 1<sup>er</sup> Congreso Interamericano de Residuos. Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental AC AIDIS. Mérida, Yucatán México.
- Cybulski Z., Dziurla E., Kaczorek E. y Olszanowski A., 2003. The influence of emulsifiers on hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonadacea* and *Bacillacea* strains. *Spill Science & Technology Bulletin*, **8**(5-6): 503-507.
- Chokshi B. G. y Nelson Y. M., 2003. Optimization of high-strength hydrocarbon biodegradation using respirometry. En: Magar V. S. y Kelley M. E. (Eds.). *In situ* and on-site bioremediation. (Paper O-10) Proceedings of the 7<sup>th</sup> International *in situ* and on-site bioremediation symposium. Orlando FL, June 2003. Battelle Press, Columbus, OH.
- Chu W. y Chan K. H., 2003. The mechanism of the surfactant-aided soil washing system for hydrophobic and partial hydrophobic organics. *The Science of the Total Environment*, **307**: 83-92.
- Davis K. L., Reed G. D. y Walter Lee., 1994. A comparative cost analysis of petroleum remediation technologies. En: Hinchee R. E., Alleman B. C., Hoeppel R. E. y Miller R. N. (Eds.). *Hydrocarbon bioremediation*. pp: 73-79. CRC Press, Inc. Lewis Publishers, Boca Ratón, Florida, USA.
- Deshpande S., Shiao B. J., Wade D., Sabatini D. A. y Harwell J. H., 1999. Surfactant selection for enhancing ex situ oil washing. *Water Environmental Research*, **33**(2): 351-360.
- Díaz E., 2004. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International microbiology*, **7**:173180.
- Dorn B. P., Vipon E. T., Salanitro P.J. y Wisniewski L.H., 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. *Chemosphere*, **37**: 845-860.
- Elías M. R. L., Trujillo N. A. y Calderón G., 1996. Estudio de suelos afectados por actividades petroleras en el estado de Tabasco. En: Quintero L. R., Reyna T.

- T., Corlay C. L., Ibáñez H. A. y García C. N. E. (Eds.). La edafología y sus perspectivas al siglo XXI. pp. 230-238. Tomo I. Investigación y educación hacia la sostenibilidad edáfica para el tercer milenio.
- Ellis B., 1994. Reclaiming contaminated land: *in situ/ex situ* remediation of creosote and petroleum hydrocarbon contaminated sites. En: Flathman P. E., Jerger D. E. y Exner J. H. (Eds.). Bioremediation field experience. Chapter 6, pp.107-143. Lewis Publishers CRC Press, USA.
- EPA 418.1-1978. Petroleum Hydrocarbons, Total Recoverable. Spectrophotometric infrared.
- EPA 3051-1996. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Revisión 2.
- EPA 6010B-1996. Inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. Revisión 2.
- EPA 8310-1986. Polynuclear aromatic hydrocarbons. Revisión 0.
- EPA 9071b-1996. n-Hexane Extractable Material (HEM) for sludge, sediment, and solid samples. Revisión 1.
- EPA 1664a-1996. n-Hexane Extractable Material (HEM; oil and grease) and silica gel treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; non-polar material) by extraction and gravimetry.
- Ércoli E., Fuentes B. J., Gilbert M., Galvez J. y Arreghini M., 1995. Tratamiento biológico de lodos de refinería. Segundo simposio de producción de hidrocarburos. Tomo 1, pp. 497-506. Instituto Argentino del Petróleo. Mendoza, Argentina.
- Ércoli E., Videla P. M. S., Calleja C., Galvez J., Cantero J., Dipaola M., Medaura C. y Videla O., 2000. Biorremediación de suelos por técnica de Acumulación Aireada. IV Jornadas de Preservación de Agua, Aire y Suelo en la Industria del Petróleo y del Gas. IAPG, 2000, Salta. Argentina.
- Escalante G. R. M., 2002. Biodegradación de crudo de petróleo en terrarios. Tesis de maestría (Biotecnología). UNMSM, Lima, Perú. Disponible en:

<[http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/tesis/Salud/Escalante\\_G\\_R/Escalante\\_G\\_R.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BibVirtual/tesis/Salud/Escalante_G_R/Escalante_G_R.htm)>. Fecha de consulta: 18 mayo de 2006.

- Fahnestock F. M., Wickramanayake G. B., Kratzke R. J. y Major W. R., 1998. Biopile design, operation and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils. Battelle Press, USA, 163 p.
- Fernández L. L. C., 2002. Atenuación natural de sitios contaminados con hidrocarburos. Memorias del Seminario Internacional de Manejo de Residuos, Ciudad de México.
- Fernández L. L. C., 2004. Atenuación Natural de Sitios Contaminados con Hidrocarburos. Reporte final IMP/PBP/PIMAS/D.00023 (CD).
- Gandoy B. W., 1990. Manual de laboratorio para el manejo físico de suelos. Temporal y riego. Parcela y cuenca. Versión interna para el departamento de suelos, UACH (1992).
- García E., 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Cuarta edición, Indianápolis, México, D.F., 219 p.
- García H. L. y García S. N., 2003. Derrames de hidrocarburos del petróleo en Tabasco, orígenes y situación actual. *KUXULKAB Revista de Divulgación*, 9(17): 19-22.
- Gavande S. A., 1991. Física de suelos, principios y aplicaciones. Limusa, México.
- González R. G. A., 1995. Impacto ambiental de la industria petrolera en el Estado de Tabasco. Memoria de práctica profesional (Ingeniero Agrónomo Fitotecnista). UNACH. Villaflores, Chiapas, 102 p.
- Gutiérrez M. C. y Zavala J., 2002. Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. *Terra*, 20: 101-111.
- Gutiérrez P. H. y de la Vara S. R., 2004. Análisis y diseño de experimentos. McGraw-Hill Interamericana, 571 p.
- Guzmán O. F. J., 2005. Pruebas de factibilidad a escala laboratorio para la remediación del suelo contaminado con hidrocarburos de la Presa Agua de

- Mina de la Unidad Minera Texistepec, Veracruz. Tesis de licenciatura (Ingeniería Ambiental). UJAT, Villahermosa, Tabasco, 94 p.
- Halmemies S., Gröndahl S., Nenonen K. y Tuhkanen T., 2003. Estimation of the time periods and processes for penetration of selected spilled oils and fuels in different soils in the laboratory. *Spill Science & Technology Bulletin*, **8(5-6)**:451-465.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2002. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans and their supplements: a complete list. Disponible en: <<http://monographs.iarc.fr/monoeval/allmonos.html>>. Última actualización: 4 de diciembre de 2002, fecha de consulta: 10 de diciembre de 2002.
- IMP, 2006. Acerca del petróleo. Disponible en: <<http://www.imp.mx/petroleo/>>. Fecha de consulta: 27 de julio de 2006.
- INEGI, 1988. Síntesis geográfica del estado de Tabasco. México.
- INEGI, 2001. Síntesis de información geográfica del estado de Tabasco. Formato digital.
- Iturbe A. R., Castro R. A. y Madrigal M. I., 1998. Técnicas de rehabilitación de suelos y acuíferos. Series del Instituto de Ingeniería, UNAM. Núm. 612, 97 p.
- 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.
- Iturbe R., Flores C., Chávez C., Ramírez A., Torres L. G., 2004a. *In situ* flushing of contaminated soils from a refinery: organic compounds and metal removals. *Remediation Journal*, **14(2)**: 141-152.
- Iturbe R., Flores C., Chávez C., Bautista G., Torres L. G., 2004b. Remediation of contaminated soil using soil washing and biopile methodologies at a field level. *Journal of Soil and Sediments*, **4(2)**: 115-122.
- Iturbe-Argüelles R., 2006. Comunicación personal. Instituto de Ingeniería.

- Jafvert C. T., 1996. Surfactants/cosolvents. Technology Evaluation Report E Series: TE-96-02. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC). Pittsburgh, PA, 45 p.
- Kim S.-J., Choi D. H., Sim D. S. y Oh Y. S., 2005. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. *Chemosphere*, **59**: 845-852
- Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M, Schreckemberger P. C. y Winn W. C., 2001. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Quinta edición. Editorial médica Panamericana, España, 1,432 p.
- Kuehl R. H., 2001. Diseño de experimentos, principios estadísticos de diseño y análisis de investigación. Segunda edición. Thomson Learning, México, 666 p.
- Kuyukina M. S., Ivshina I. B., Litvinenko L. V., Cunningham C. J. y Philp J. C., 2003. Biosurfactant enhanced crude oil mobilization in a soil system: laboratory simulation and mathematical modelling. Second European Bioremediation Conference, pp. 83-86. Chania, Crete, Greece.
- LAN, 2004. Ley de Aguas Nacionales. Última reforma DOF (24/04/2004).
- Lee M., Kang H. y Do W., 2005. Application of nonionic surfactant-enhanced *in situ* flushing to a diesel contaminated site. *Water Research*, **39**: 139-146.
- LGEEPA, 2003. Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. Última reforma DOF 13/06/2003.
- LGPGIR, 2003. Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. Publicada DOF 08/10/2003.
- Li X., Feng Y. y Sawatsky N., 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. I Plant growth. *Plant and Soil*, **192**: 219-226.
- Liu M. y Roy D., 1995. Surfactant-induced interactions and hydraulic conductivity changes in soil. *Waste Management*, **15**(7): 463-470.
- López O. J., 2004. Cambios físicos, químicos y biológicos en un suelo contaminado con hidrocarburos debido al saneamiento con la técnica de lavado de suelo. Tesis de Maestría (Ingeniería Ambiental), Facultad de Ingeniería, UNAM, México, 131 p.



- Margesin R., Zimmerbauer A. y Schinner F., 2000. Monitoring of biorremediation by soil biological activities. *Chemosphere*, **40**: 339-346.
- Martel R., Lefebvre R., y Gélina P. J., 1998a. Aquifer washing by micellar solutions: 2. DNAPL recovery mechanisms for an optimized alcohol-surfactant-solvent solution. *Journal of Contaminant Hydrology*, **30**: 1-31.
- Martel R., Gélina P. J. y Saumure L., 1998b. Aquifer washing by micellar solutions: 3. Field test at the Thouin Sand Pit (L'Assomption, Québec, Canada). *Journal of Contaminant Hydrology*, **30**: 33-48.
- Mata S. J. C., Karns J. y Torrents A., 2000. The influence of surfactants and biosurfactants on the bioavailability of hydrophobic organic pollutants in subsurface environments. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, **16** (4): 193-203.
- Mayo L. T. M., 2001. Aplicación del ensayo enzimático deshidrogenasa para la evaluación del potencial de biodegradación de hidrocarburos en zonas pantanosas del Estado de Tabasco, México. Tesis de licenciatura (Biología). UJAT. Villahermosa, Tabasco, 93 p.
- Molina V. D. M., 2006. Efecto del tipo de surfactante y dosis del mismo sobre la biodegradación de tres distintos crudos (Batab, Paredón y Carrizo) presentes en el suelo. Tesis de licenciatura (Ingeniería química). Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, 71 p.
- Mulligan C. N., Yong R. N., y Gibbs B.F., 2001. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, **60**: 371-380.
- Nelson M. J. K., Compeau G. C., Maziarz T. y Mahaffey W. R., 1994. Laboratory treatability testing for assessment of field applicability. En: Flathman P. E., Jerger D. E. y Exner J. H. (Eds). *Bioremediation field experience*. Chapter 4, pp. 59-78. Lewis Publishers CRC Press, USA.
- NOM-001-SEMARNAT-1996. Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. DOF (06/01/1997).

- NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. DOF (31-12-2002).
- NOM-115-SEMARNAT-2003. Que establece las especificaciones de protección ambiental que deben observarse en las actividades de perforación y mantenimiento de pozos petroleros terrestres para exploración y producción en zonas agrícolas, ganaderas y eriales, fuera de áreas naturales protegidas o terrenos forestales. DOF (27-08-2004).
- NOM-116-SEMARNAT-2003. Que establece las especificaciones de protección ambiental para prospecciones sismológicas terrestres que se realicen en zonas agrícolas, ganaderas y eriales. DOF (7-11-2005).
- NOM-117-SEMARNAT-1998. Que establece las especificaciones de protección ambiental para la instalación y mantenimiento mayor de los sistemas para el transporte y distribución de hidrocarburos y petroquímicos en estado líquido y gaseoso, que se realicen en derechos de vía terrestres existentes, ubicados en zonas agrícolas, ganaderas y eriales. DOF (24-11-1998).
- NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. DOF (30-03-2005).
- NOM-141-SEMARNAT-2003. Que establece los requisitos para la caracterización del sitio, proyecto, construcción, operación y postoperación de presas de jales. DOF (13-09-2004).
- NOM-143-SEMARNAT-2003. Que establece las especificaciones ambientales para el manejo de agua congénita asociada a hidrocarburos. DOF (3-03-2005).
- NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. DOF (12/12/1995).
- NOM-110-SSA1-1994. Bienes y servicios. preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. DOF (10/05/1995).
- Olán C. D., 2000. Estimación de niveles permisibles de hidrocarburos totales de petróleo, poliaromáticos carcinogénicos y metales, en el Activo Cinco

- Presidentes, Tabasco. Tesis de licenciatura (Biología). UJAT. Villahermosa, Tabasco, 88 p.
- Ortega-Trejo T. X. y Edyvean R. G. J., 2006. Biosurfactant production by petroleum hydrocarbon degrading *Pseudomonas fluorescens* 11712 and *Bacillus subtilis* subsp *subilis*. Environmental Biotechnology and Engineering. Proceedings of the Second International Meeting on Environmental Biotechnology and Engineering (2IMEBE). 26-29 September, 2006. México City, México.
- Ortiz S. R., 2001. Migración de hidrocarburos en suelos orgánicos cercanos a sitios de explotación petrolera en el Distrito de Agua Dulce, Tabasco. Tesis de Maestría (Ciencias: Edafología). Facultad de Ciencias, UNAM, México, 112 p.
- O'Shaughnessy J. C y Blanc F. C., 2000. Aqueous solvent removal of contaminants from soils. En: Wise D. L., Trantolo D. J., Cichan E. J., Inyang H. I. y Stottmeister U. (Eds.). Remediation engineering of contaminated soils, pp. 617-637. Marcel Decker, Inc. USA, 996 p.
- PARS (Proyecto Ambiental de la Región Sur). 1999a. Diagnóstico de los efectos ambientales de la industria petrolera asociados a la región sur de PEP. Subproyecto Monitoreo edafocológico, Siebe C. y Cram S. Informe final. PEMEX-Batelle/UNAM/IMP.
- PARS (Proyecto Ambiental de la Región Sur). 1999b. Diagnóstico de los efectos ambientales de la industria petrolera asociados a la región sur de PEP. Subproyecto Sistemas acuáticos, bioacumulación de hidrocarburos y metales, Botello A. V. Informe final. PEMEX-Batelle/UNAM/IMP.
- PARS, 2000. Diagnóstico de los efectos ambientales de la industria petrolera asociados a la región sur de PEP. Proyecto Ambiental de la Región Sur (PARS), versión Internet. PEMEX-Batelle/UNAM/IMP. Disponible en: [http://www.pemex.com/files/pdf/Libro\\_Blanco\\_1-7.pdf](http://www.pemex.com/files/pdf/Libro_Blanco_1-7.pdf). Fecha de consulta: 21 de julio de 2006.
- PEMEX, 1980. El petróleo. Subdirección técnica administrativa. Gerencia de información y relaciones públicas. México, D.F. 108 p.

- PEMEX, 2006. Las reservas de hidrocarburos de México, evaluación al 1 de enero de 2006. Disponible en: <<http://www.pemex.com/index.cfm?action=content&sectionID=2&catID=2624&subcatID=2634>>. Fecha de consulta: 30 de agosto de 2006.
- Pineda F. G., Boll A. G. y Mesta H. A. M., 2002. Biodegradación de asfaltenos por un consorcio microbiano aislado de petróleo crudo "Maya". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, **18**(2): 67-73.
- Plaza G., Ulfing K., Worsztynowicz A., Krzeminska B. y Brgmon R. L., 2005. Respirometry for assessing the biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Environmental Technology*, **26**: 161-169.
- PROFEPA, 2001. Problemática de emergencias ambientales asociadas con instalaciones de PEMEX. Subprocuraduría de auditoria ambiental, Dirección general de auditoria del riesgo ambiental y prevención de accidentes. Disponible en: <<http://www.profepa.gob.mx/Profepa/InspeccionIndustrial/EmergenciasAmbientalesIndustria/AnalisisNacionaldeEmergenciasAmbientales/EstadisticasdeEmergenciasAmbientales/PrincipalesEmergenciasAmbientales.htm>>. Fecha de consulta: 27 de julio de 2006.
- PROY-NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. Que establece criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plomo, selenio, talio y vanadio (Consulta Pública: 11-noviembre-2005).
- Ramos M. F., 2000. Aplicación de agentes tensoactivos en procesos de biorremediación. *KUXULKAB revista de divulgación*, **V**(11): 12-16.
- Reglamento de la LGPGIR (Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos), 2006. Publicado DOF 30/11/2006.
- Reyes J. I., 1996. Fundamentos teórico-prácticos de temas selectos de la ciencia del suelo. Parte I. UAM-I., México, 257 p.
- Rhodes A. N. y Hendricks C. W., 1990. A continuous-flow method for measuring effects of chemical on soil nitrification. *Toxicity Assess*, **5**:77-89.

- Rifai H. S., Newell C. J., Miller R. N., Taffinder S. y Rounsaville M., 1995. Simulation of natural attenuation with multiple electron acceptors. En: Hinche R. E., Wilson J. J. y Downey D. (Eds.). *Intrinsic bioremediation*. pp. 53-58. Battelle Press, USA, 266 p.
- Riser-Roberts E., 1998. Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical processes. CRC Press, Lewis Publishers. Boca Ratón, Florida, USA. 542 p.
- Rittmann B. E., Kremer F. y Bekins B., 2004. Monitored natural attenuation forum: a panel discussion. *Remediation Journal*, **14**(2): 153-158.
- Rivera C. M. C. y Trujillo N. A., 1998. Los microorganismos en el proceso de biorremediación de contaminantes orgánicos en el suelo. Una revisión bibliográfica. Memorias de la XI Reunión científica tecnológica forestal y agropecuaria, pp. 246-252, Villahermosa, Tabasco.
- Rivera C. M. C., 2001. Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán (*Echinochloa polystachya*) (H.B.K.) Hitchc.) y cabezón (*Paspalum virgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y el benzo(a)pireno. Tesis de doctorado (Ciencias). CP, Montecillos, Texcoco, Edo. de México, 400 p.
- Rivera C. M. C., 2004a. Clasificación de suelos tropicales influenciados por derrames de petróleo en Tabasco. *Tecnociencia universitaria*, **3**(7): 6-25.
- Rivera C. M. C., 2004b. Normatividad ambiental mexicana y tecnologías de limpieza de suelos contaminados con petróleo. Memorias de la XVII Reunión científica-tecnológica forestal y agropecuaria Tabasco 2004, pp. 176-185, 4 y 5 de noviembre de 2004, Villahermosa, Tabasco.
- Roldán M. G. A., 2001. Biopilas como alternativa de tratamiento para la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de maestría (Ingeniería Ambiental). Facultad de Ingeniería, UNAM, 183 p.
- Roote D. S., 1997. *In situ* flushing. Technology Evaluation Report O Series: TO-97-02. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC). Pittsburgh, PA, 19 p.

- Rosen M. J., 1989. Surfactants and interfacial phenomena. John Wiley & Sons. USA, 430 p.
- Roth B., 2000. Die Verteilung von Schwermetallen in Sedimenten und reoximorphen Böden in der durch Erdölförderung geprägten Region Tabasco, Mexico. Master's thesis, Universitaet Hohenheim, Institut für Bodenkunde und Standortslehre.
- Salazar G. I., 2002. Evaluación técnica y seguimiento a la restauración de sitios contaminados por hidrocarburos. Tesis de maestría (Ingeniería y protección ambiental). UJAT. Villahermosa, Tabasco, 85 p.
- Samanta S. K., Singh O. V. y Jain R. K., 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. *Trends in biotechnology*, **20**(6): 243-248.
- SARH, 1969. Boletín hidrológico de la región hidrológica No. 29 Coatzacoalcos.
- Sarmiento T. M. R., Ortiz E. E. y Álvarez R. J., 2003. Emergencias ambientales asociadas a sustancias químicas en México. *Gaceta ecológica INE*, **66**: 54-63.
- Sellers, K. 1999. Fundamentals of hazardous waste site remediation. CRC Press, Lewis Publishers. Boca Ratón, Florida, USA. 326 pp.
- SEMARNAT, 2006. Relación de empresas autorizadas para restaurar suelos contaminados, versión actualizada al 31 de mayo del 2006. Disponible en: <<http://www.semarnat.gob.mx/dgmic/suelos/registro-federal.pdf>>. Última actualización: 8 de septiembre de 2006, fecha de consulta: 10 de septiembre de 2006.
- SENER, 2005. Secretaría de energía. Disponible en: <[http://www.energia.gob.mx/wb2/Sener/Sene\\_1495\\_petroleo](http://www.energia.gob.mx/wb2/Sener/Sene_1495_petroleo)>. Última actualización: 18 de noviembre de 2005, fecha de consulta: 28 de julio de 2006.
- Sigala C. E. F., 2004. Evaluación y refinación del método ECOTEC-SPB para el tratamiento de recortes de perforación y remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de licenciatura (Ecología). UJAT. Villahermosa, Tabasco, 49.

- Simpkin T., Sale T., Kueper B., Pitts M. y Wyatt K., 1999. Surfactants and cosolvents for NAPL remediation: a technology practices manual. En: Lowe D. F., Oubre C. L. y Ward C. H. (Eds.). CRC Press, Lewis Publishers. Boca Ratón, Florida, USA.
- Smith V. H., Graham. D. W. y Cleland D. D., 1998. Application of resource-ratio theory to hydrocarbon biodegradation. *Environmental Science and Technology*, **32**: 3386-3395.
- Sobisch T., Heß H., Niebelschütz H. y Schmidt U., 2000. Effect of additives on biodegradation of PAH in soils. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **162**: 1-14.
- Stoops G. y Eswaran H., 1985. Micromorphology in wetland soil. Wetland soil, characterization, classification and utilization. International Rice Research Institute. Los Danos. Laguna. Philippines.
- Strbak L., 2000. *In situ* flushing with surfactants and cosolvents. National Network of Environmental Management Studies Fellow. US-EPA. Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office, Washington DC, 31 p.
- Torres L. G., Orantes J. L. e Iturbe R., 2003. Critical micellar concentrations for three surfactants and their diesel-removal efficiencies in petroleum-contaminated soils. *Environmental Geosciences*, **10**(1): 28-36.
- Torres L. G., Aguirre A. L., Verdejo A. e Iturbe R., 2005a. Enhanced soil-washing treatment for soils which are highly contaminated with crude oil. En: Tiezzi E., Brebbia C. A., Jorgensen S. y Almorza G. D. (Eds.). *Ecosystems and Sustainable Development V*, pp. 541-552. Witpress, Great Britain, 776 p.
- Torres L. G., Rojas N., Bautista G. e Iturbe R., 2005b. Effect of temperature, and surfactant's HLB and dose over the THP-diesel biodegradation process in aged soils. *Process Biochemistry*, **40**: 3296-3302.
- Torres L. G., Lemus X., Urquiza G., Verdejo A. e Iturbe R., 2005c. Surfactant enhanced washing of drilling fluids, a promising remediation technique. *Tenside Surfactants Detergents*, **42**: 1-9.

- Troy M. A., Baker K. H. y Herson D. S., 1995. Evaluating natural attenuation of petroleum hydrocarbon spills. En: Hinche R. E., Wilson J. J. y Downey D. (Eds.). *Intrinsic bioremediation*. pp. 85-90. Battelle Press, USA, 266 p.
- Valdéz M. y Medina J. N., 2005. *Ecología microbiana del suelo. Compendio práctico*. IPN, México, 130 p.
- Van Cauwenberghe L. y Roote D. S., 1998. *In situ* bioremediation. Technology Evaluation Report O Series: TO-98-01. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center (GWRTAC). Pittsburgh PA, 20 p.
- Van Deuren J., Lloyd T., Chhetry S. Liou R y Peck J., 2002. Remediation Technologies screening matrix and reference guide, 4<sup>th</sup> edition. Disponible en: [http://www.frtr.gov/matrix2/top\\_page.html](http://www.frtr.gov/matrix2/top_page.html). Fecha de consulta: junio 2006.
- Van Reeuwijk L. P. 1992. Procedures for soil analysis: 14-1 phosphorus soluble in dilute acid-fluoride (extraction according to Bray & Kurtz No. 1). International Soil Reference and Information Centre, Wageningen, the Netherlands.
- Volke S. T. y Velasco T. J. A., 2002. *Tecnologías de remediación de suelos contaminados*. México, INE-SEMARNAT, 64 p.
- Volke S. T. L. y Velasco T. J. A., 2003. *Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo*. CENICA, INE-SEMARNAT, 33 p.
- USEPA, 1996a. *Guía del ciudadano: medidas biocorrectivas*. Ficha tecnológica. EPA-542-F-96-023.
- USEPA, 1996b. *Guía del ciudadano: atenuación natural*. Ficha tecnológica. EPA-542-F-96-026.
- USEPA, 1996c. *Guía del ciudadano: el enjuague del suelo in situ*. Ficha tecnológica. EPA-542-F-96-022.
- USEPA, 1996d. *Guía del ciudadano: el lavado del suelo*. Ficha tecnológica. EPA-542-F-96-018.



- USEPA, 1997. Use of monitored natural attenuation at superfund, RCRA Corrective action, and underground storage tank sites. Directive Number: 9200.4-17. Office of Solid Waste and Emergency Response. Washington DC, USA, 25 p.
- USEPA, 2001. Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report. 10<sup>th</sup> Edition. Office of Solid Waste and Emergency Response. EPA-542-R-01-004.
- USEPA, 2002. Bioremediation in the Field Search System (BFSS). Disponible en: <<http://www.epa.gov/ORD/dbases/bfss.html>>. Última actualización: 29 de diciembre de 2002, fecha de consulta: 14 de diciembre de 2005.
- Wang Z. y Fingas M., 1997. Developments in the analysis of petroleum hydrocarbons in oils, petroleum products and oil-spill-related environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography*, **774**: 51-78.
- Zegarra M. H. G., 2000. Optimización de la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta. Tesis de Maestría (Ingeniería Ambiental), DEPMI, UNAM, México, 146 p.
- Zheng Z. y Obbard J. P., 2002. Evaluation of an elevated non-ionic surfactant critical micelle concentration in a soil/aqueous system. *Water Research*, **36**: 2667-2672.