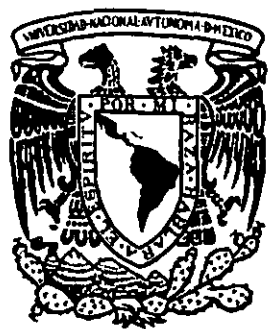


03072

1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

CARACTERIZACIÓN DE DOS SUELOS
CONTAMINADOS CON GASOLINA Y
EVALUACIÓN DE SU CAPACIDAD
DEGRADADORA DE HIDROCARBUROS
MONOAROMÁTICOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A

BIÓL. ANA LAURA DEYTA TECO



FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DIRECTOR: DRA. SUSANA SAVAL B.

0273124

MÉXICO, D. F.

1999





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A la Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades. UNAM, por haberme dado la oportunidad de obtener el conocimiento y experiencia que otorga el cursar un Posgrado dentro de la Universidad.

Al Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México, por brindar el apoyo y la oportunidad de realizar el presente trabajo en sus instalaciones.

A la Doctora Susana Saval, por su apoyo en la dirección del presente trabajo y por la oportunidad de aprender algo más en esta vida.

Al Maestro en Ciencias Sergio Palacios, por sus consejos y apoyo así como su participación como miembro del comité tutorial.

A Kumiko Shimada M, Silvia Sánchez B. y Leticia García Montes de Oca, por sus consejos, cooperación y asesoría técnica.

Al Maestro en Ciencias Jorge Romero, por su apoyo, interés y asesoría técnica en el trabajo.

Un gran agradecimiento al Doctor Rafael Vásquez, por sus consejos y apoyo incondicional, así como su participación como miembro del comité tutorial y de jurado.

A los Doctores Agustín López-Munguía, Víctor Manuel Luna, Oscar Monroy y a la Doctora María del Carmen Wachter, por su atención en la revisión de este documento y sus comentarios, así como su participación como miembros de jurado.

A mis compañeros y amigos que me alentaron a seguir adelante en esta etapa de mi vida, especialmente a Santiago, Sara, Alma, Alfonso, Josefina, Marielena, Jasminka, Ariel, Marcelo, Isabel, Alberto, German, Arodí, Arturo, Adrián, Esperanza, y Aurora, por vivir momentos inolvidables.

A todas las personas que colaboraron para la realización y termino de este trabajo.

DEDICATORIA

Con cariño:

A mis padres Sara y Jorge

Pues gracias a su apoyo y amor incondicional he logrado muchas cosas en la vida.
Ahora una meta más y una satisfacción que es compartida.

A mis hermanos Norma y Jorge

Por su apoyo, comprensión y ejemplo de lucha y superación para seguir adelante.
Gracias por esas palabras de aliento

A mi cuñada Karina

Quien ya es parte de la familia y comparte con nosotros los momentos buenos y malos
Gracias por tu apoyo y cariño

A toda la familia y amigos

Por estar pendiente y brindarme su respaldo

CONTENIDO

	Pag.
CONTENIDO	i
ABREVIATURAS	iii
LISTA DE TABLAS	-iv
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	2
1.2 Objetivos particulares	2
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 El suelo como recurso natural	3
2.1.1 Definición	3
2.1.2 Formación	4
2.1.3 Propiedades físicas y químicas	5
2.1.4 Microbiología del suelo	12
2.1.4.1 Movimiento microbiano	14
2.1.4.2 Fisiología microbiana	15
2.1.4.3 Conteo de microorganismos	16
2.2 Contaminación del suelo	18
2.2.1 Contaminantes orgánicos	18
2.2.1.1 Hidrocarburos monoaromáticos volátiles	19
2.2.2 Procesos de transporte	20
2.2.2.1 Transporte en zona no saturada	21
2.2.3 Contaminación y tipos de suelo en México	22
2.3 Biodegradación	24
2.3.1 Factores ambientales	25
2.3.2 Adaptación y potencial de los microorganismos en la limpieza de suelos	26
2.3.3 Biodegradación de BTX	27
3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	29
3.1 Técnicas para el análisis de los suelos	29
3.2 Descripción de los sitios	33
3.2.1 Sitio 1	33
3.2.2 Sitio 2	33
3.3 Obtención de las muestras	34
3.4 Procesamiento de las muestras	35
3.4.1 Caracterización física y química	36
3.4.2 Caracterización microbiológica	38

3.4.3 Caracterización de la actividad microbiana	38
3.5 Experimentos de biodegradación	39
3.5.1 Establecimiento de las condiciones para los experimentos de biodegradación	39
3.5.2. Aclimatación de cultivos	40
3.5.3 Experimentos de biodegradación	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
4.1 Caracterización de los suelos	44
4.1.1 Caracterización física	44
4.1.2 Caracterización química	49
4.1.3 Caracterización microbiológica	52
4.2 Caracterización de los perfiles de suelos	53
4.2.1 Descripción	53
4.2.2 Perfiles físicos, químicos y microbiológicos	56
4.3 Establecimiento de las condiciones para los experimentos de biodegradación	65
4.3.1 Selección de la unidad experimental	65
4.3.2 Definición de la temperatura de volatilización para la cuantificación de BTEX	67
4.3.3 Definición del tiempo de volatilización para la cuantificación de BTEX	68
4.4 Aclimatación de los cultivos	68
4.5 Biodegradación de tolueno en medio líquido	71
4.6 Biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos volátiles en suelo	72
4.6.1 Biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 1	72
4.6.2 Biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 2	82
4.6.3 Cuantificación de bacterias	87
4.7 Evaluación del proceso y perspectivas de seguimiento	89
5. CONCLUSIONES	91
5.1 Recomendaciones	93
6. BIBLIOGRAFÍA	94
ANEXOS	vii

ABREVIATURAS

BTEX	Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos (isómeros <i>orto</i> , <i>meta</i> y <i>para</i>)
B	Benceno
T	Tolueno
E	Etilbenceno
m-X	meta Xileno
p-X	para Xileno
o-X	orto Xileno
NAPL	Non-Aqueous Phase Liquids (Fase líquida no acuosa)
LNAPLs	Light Non-Aqueous Phase Liquids (Fase líquida no acuosa ligera)
DNAPLs	Dense Non-Aqueous Phase Liquids (Fase líquida no acuosa densa)
CS1	Control del Sitio 1
S1a y S1b	Muestra a y b del Sitio 1
CS2a y S2a	Control a y muestra a del Sitio 2
CS2b y S2b	Control b y muestra b del Sitio 2
mo	Materia Orgánica
co	Carbono Orgánico
ufc/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo
ST	Sólidos Totales
SV	Sólidos Volátiles
SF	Sólidos Fijos
D10	Tamaño o diámetro aparente
D30	Diámetro de partículas al 30 %
D60	Diámetro de partículas al 60 %
C _u	Coefficiente de uniformidad
C _c	Coefficiente de curvatura
SUCS	Sistema Unificado de Clasificación de Suelos
N _T	Nitrógeno total
ρ _m	Densidad aparente o de masa
ρ _p	Densidad real o de partícula
ATCC	American Type Culture Collection
NRRL	Northern Regional Research Laboratory
FID	Flame ionization detector (Detector de ionización de flama)

LISTA DE TABLAS

	Pag.
2.1 Composición porcentual media de un suelo húmedo -----	5
2.2 Algunas características de los separados de un suelo -----	8
2.3 Intervalos de porosidades para materiales sedimentarios -----	10
2.4 Propiedades y características de BTX -----	19
2.5 Distribución de fases de un derrame de 30 000 galones de gasolina -----	20
3.1 Técnicas desarrolladas para la caracterización de los suelos -----	30
3.2 Condiciones para los experimentos de biodegradación de tolueno con el suelo del Sitio 1 -----	42
3.3 Condiciones para los experimentos de biodegradación de BTX y seguimiento del consumo de O ₂ y producción de CO ₂ -----	43
4.1 Color de las muestras de suelo -----	45
4.2 Texturas y tipo de material presente en las muestras de suelo -----	46
4.3 Porcentaje de humedad y capacidad de retención de agua en las muestras de suelo -----	47
4.4 Contenido de sólidos y densidad de las muestras de suelo -----	48
4.5 Caracterización química de las muestras de suelo -----	50
4.6 Caracterización microbiológica de las muestras de suelo -----	52
4.7 Análisis granulométrico de los perfiles S1a y S1b del Sitio 1 -----	57
4.8 Análisis granulométrico de los perfiles S2a y S2b del Sitio 2 -----	58
4.9 Microorganismos degradadores de BTEX utilizados como referencia -----	69
4.10 Relación de experimentos relacionados con las pruebas de biodegradación de BTX -----	72
4.11 Velocidades de biodegradación de tolueno obtenidas con el suelo del Sitio 1 -----	74
4.12 Velocidades de biodegradación de BTX obtenidas con el suelo del Sitio 1 -----	79
4.13 Velocidades de biodegradación de BTX obtenidas con el suelo del Sitio 2 -----	84
4.14 Cuantificación de bacterias en los experimentos de biodegradación con el suelo del Sitio 1 -----	88
4.15 Cuantificación de bacterias en los experimentos de biodegradación con el suelo del Sitio 2 -----	89

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
2.1 Procesos formadores del suelo -----	4
2.2 Componentes del ciclo hidrológico del agua -----	6
2.3 Relación de agua de adhesión y cohesión con respecto a las partículas del suelo -----	7
2.4 Los ocho elementos de la corteza terrestre que se presentan en porcentaje superior al 1 % en peso ---	12
2.5 Comportamiento de los LNAPLs y DNAPLs en el subsuelo -----	22
2.6 Tipos de suelo en México -----	23
2.7 Interacciones con la biodegradación -----	24
2.8 Estructura química de BTEX -----	27
3.1 Localización de los puntos de muestreo en el Sitio 1 -----	33
3.2 Diagrama de los puntos de muestreo del Sitio 2 -----	34
3.3 Corte de núcleos para las pruebas microbiológicas -----	35
3.4 Unidades experimentales probadas -----	39
4.1 Perfil de color correspondiente a los puntos de muestreo S1a y S1b del Sitio 1 -----	54
4.2 Perfil de color correspondiente a los puntos de muestreo S2a y S2b del Sitio 2 -----	55
4.3 Perfiles físicos, químicos y microbiológicos del suelo S1a (Sitio 1) -----	60
4.4 Perfiles físicos químicos y microbiológicos del suelo S1b (Sitio 1) -----	61
4.5 Perfiles físicos, químicos y microbiológicos del suelo S2a (Sitio 2) -----	63
4.6 Perfiles físicos, químicos y microbiológicos del suelo S2b (Sitio 2) -----	64
4.7 Evaluación de las unidades experimentales -----	66
4.8 Efecto de la temperatura sobre la volatilización de BTEX mediante la técnica de Head-space -----	67
4.9 Efecto del tiempo de calentamiento durante la volatilización de BTEX a una temperatura de 65°C ---	68
4.10 Evolución de la producción neta de CO ₂ a partir de las cepas de colección cultivadas en medio líquido en presencia de la mezcla de benceno-tolueno a diferentes concentraciones -----	70
4.11 Biodegradación de tolueno en medio mineral líquido por un cultivo aclimatado -----	71
4.12 Biodegradación de tolueno con el suelo del Sitio 1 (S1c) -----	73
4.13 Evolución del CO ₂ acumulado y del O ₂ consumido durante la biodegradación de tolueno con el suelo del Sitio 1 (S1c) -----	76
4.14 Seguimiento de pH en los experimentos de biodegradación de tolueno con el suelo del Sitio 1, adicionado de nutrimentos -----	77
4.15 Biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 1 (S1c) -----	78
4.16 Representación individual de la biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 1 (S1c) -----	80
4.17 Evolución de CO ₂ acumulado y de O ₂ consumido durante la biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 1 (S1c) -----	81
4.18 Biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 2 (S2a) -----	83
4.19 Representación individual de la biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 2 (S2a) -----	85
4.20 Evolución de CO ₂ acumulado y de O ₂ consumido durante la biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 2 -----	86

RESUMEN

La contaminación del suelo está dada principalmente por la liberación incontrolada de combustibles, los cuales pueden ser transportados desde la superficie a través de la zona no saturada hacia los mantos acuíferos, situación que representa un riesgo para la salud. El suelo desempeña un papel amortiguador, ya que los contaminantes pueden ser retenidos e incluso degradados por acción de la flora nativa. En este trabajo se estudió la biodegradación de benceno, tolueno y xileno (BTX), en el suelo de dos sitios donde se registraron derrames de gasolina varios años atrás.

Las muestras de suelo fueron obtenidas de una terminal de almacenamiento de combustible (Sitio 1) y de un sitio cercano a la fuga de un poliducto (Sitio 2). Las muestras para los análisis físicos y químicos se almacenaron en frascos de vidrio, aquellas que se utilizaron para los análisis microbiológicos se mantuvieron en los mismos cartuchos de acetato obtenidos con un nucleador manual. Todas las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su procesamiento.

Durante la caracterización física de los suelos, el color de los suelos, resultó estar determinado por su fracción inorgánica, ya que el contenido de materia orgánica fue bajo, por lo que los nutrientes (nitrógeno en sus diferentes formas y fosfatos) se vieron también disminuidos. La clase textural del suelo del Sitio 1 fue franco arenosa y arena para el suelo del Sitio 2, esto hace que sean permeables y limitados en la capacidad de retención de agua y nutrientes. El pH en ambos sitios tendió hacia la alcalinidad y la baja conductividad

eléctrica registrada no reflejó problemas de salinidad en los dos suelos, sus características resultaron ser típicas de zonas semiáridas. Para ambos suelos, el conteo de bacterias totales y heterótrofas fue del orden de 10^9 - 10^{11} bacterias/g y 10^2 - 10^6 ufc/g, respectivamente. En cuanto a las bacterias degradadoras de tolueno, su presencia se detectó a lo largo de todo el perfil en los dos sitios. Sin embargo, las condiciones más favorables se encontraron a una profundidad entre los 40-60 cm de profundidad para el Sitio 1 y entre 10-15 cm para el Sitio 2.

La capacidad degradadora se evaluó en microcosmos con y sin la adición de nutrimentos y de bacterias previamente aclimatadas. Los substratos residuales se cuantificaron en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama. Como parte del seguimiento de la actividad microbiana se evaluó el consumo de oxígeno y producción de bióxido de carbono.

Las velocidades iniciales de biodegradación de BTX no se reflejaron en los máximos porcentajes de biodegradación alcanzados en ambos suelos. El efecto de la adición de nutrimentos y de bacterias aclimatadas, se reflejó principalmente en la disminución del tiempo en el cual se alcanzan los máximos porcentajes. La producción de bióxido de carbono y el consumo de oxígeno coincidieron con la disminución en la concentración de los contaminantes, que fueron utilizados como substratos.

1. INTRODUCCIÓN

El deterioro del medio ambiente ha causado una gran preocupación mundial. En este ámbito, se ha resaltado la necesidad de abarcar la contaminación de los suelos en razón de la liberación incontrolada de contaminantes, de los cuales sobresalen los hidrocarburos y los combustibles, y en la que se ven involucrados en gran parte los errores humanos al igual que los accidentes. Situación que está presente en gran parte del país.

La presencia de tales contaminantes en el suelo tiene repercusiones directas sobre la salud humana por efectos del contacto directo, inhalación o ingestión de los mismos. Por otra parte, su transporte a través del suelo, puede originar la contaminación de los mantos freáticos, deteriorando la calidad del agua ahí presente, la cual en la mayoría de los casos es fuente de abastecimiento para las poblaciones aledañas. Asimismo, se pueden ver afectadas la estructura y productividad de los suelos.

La necesidad de eliminar contaminantes de los suelos y acuíferos ha favorecido el desarrollo de tecnologías de limpieza y recuperación de los mismos. El proceso de biodegradación, que se basa en el uso de los propios microorganismos del suelo para transformar o degradar los compuestos orgánicos, es uno de los más aplicados en el desarrollo de dichas tecnologías. De ahí que surja la necesidad de desarrollar metodologías que permitan evaluar la capacidad biodegradadora de los microorganismos presentes en el suelo, con el fin de establecer posibles soluciones a los problemas de contaminación de los mismos, con especial atención a los

que se presentan en México, ya que existen pocos reportes tanto de evaluación del proceso de biodegradación en suelo como de tipo resolutivos.

En el presente trabajo evaluó la importancia de la relación existente entre las características físicas, químicas y microbiológicas de dos suelos contaminados con gasolina varios años atrás y las condiciones bajo las cuales pudiera darse el proceso de biodegradación de los hidrocarburos monoaromáticos volátiles BTX, que son considerados como indicadores de la presencia de gasolinas.

1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad degradadora de dos suelos contaminados con gasolina, sobre los hidrocarburos monoaromáticos volátiles benceno, tolueno y xilenos conocidos en conjunto como BTX, con base a las características intrínsecas de los mismos suelos.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Realizar la caracterización física, química y microbiológica de ambos suelos
- Determinar si las comunidades microbianas nativas de ambos suelos, tienen el potencial de biodegradar BTX.
- Especificar si la adición de bacterias aclimatadas provenientes de los mismos sitios favorecen el proceso de biodegradación.
- Establecer que parámetros de la caracterización de cada suelo, están relacionados con la biodegradación de BTX.
- Desarrollar técnicas específicas para el seguimiento de la actividad biodegradadora de BTX en muestras de suelo a nivel microcosmos.
- Determinar la factibilidad de desarrollar el proceso de biodegradación de BTX en ambos suelos, como parte de la tecnología de biorremediación.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 EL SUELO COMO RECURSO NATURAL

2.1.1 Definición

La palabra suelo deriva del latín *solum* que significa piso o superficie de la tierra, distinguiéndola de la roca sólida. Sin embargo, al igual que una gran cantidad de palabras que empleamos cotidianamente tiene diferentes significados, los cuales pueden ser utilizados en diversas formas.

Algunas de las definiciones bajo las cuales se conceptualiza al término suelo, se basan en conceptos simples como, la tierra que pisamos, la interfase entre la atmósfera y la litosfera, la base de la agricultura, la mezcla de materiales o como parte del patrimonio nacional (FitzPatrick, 1980; Foth, 1985; Millar *et al.*, 1972). Algunos otros tocan conceptos más complejos como, material intemperizado o regolita, material mineral no consolidado y como cuerpo tridimensional no organizado que forma un hábitat (Aguilera, 1989; Foth, 1985, Palacios, 1996). Sin embargo, para tener una definición más apegada a fines ambientales, es necesario considerar al suelo como un cuerpo tridimensional que conforma el hábitat de miles de especies microbianas y plantas superiores, y que por lo tanto, desempeña un papel trascendental en los ciclos biogeoquímicos, hidrológico y de la cadena alimenticia, así como de su constitución como medio filtrante en el proceso de la recarga de los acuíferos que constituyen la fuente de abastecimiento de agua.

2.1.2 Formación

El principal proceso formador del suelo lo constituye la intemperización, y la diversidad de los mismos queda marcada por el tipo de roca sobre la que actúa, junto con otros factores físicos, químicos y biológicos. Dokuchaev (FitzPatrick, 1980) estableció que los suelos se desarrollan como resultado de la interacción de cinco factores, con los cuales se elaboró la siguiente ecuación:

$$S = f(\text{roca basal, clima, organismos, topografía, tiempo})$$

1. La roca madre es sobre la cual se desarrolla el suelo.
2. La exposición del material parental conduce al establecimiento de plantas y comunidades biológicas.
3. El clima actúa como fuerza directriz al promover los cambios tanto en suelos como en ecosistemas.
4. La edad de la región se toma a partir de la edad de la roca o material de origen.
5. El relieve o topografía determina la distribución de la humedad y los patrones de erosión y eluviación.

De los 5 factores, solo el tiempo puede considerarse como una variable independiente, los otros cuatro dependen en mayor grado uno de otro o de algún otro factor como la adición de suelo, la pérdida de materiales, la transferencia y las transformaciones, para crear cierto número de procesos específicos que conducen a la diferenciación de horizontes y a la formación del suelo Fig. 2.1 (FitzPatrick, 1980; Gorshkov *et al.*, 1970; Palacios, 1996).

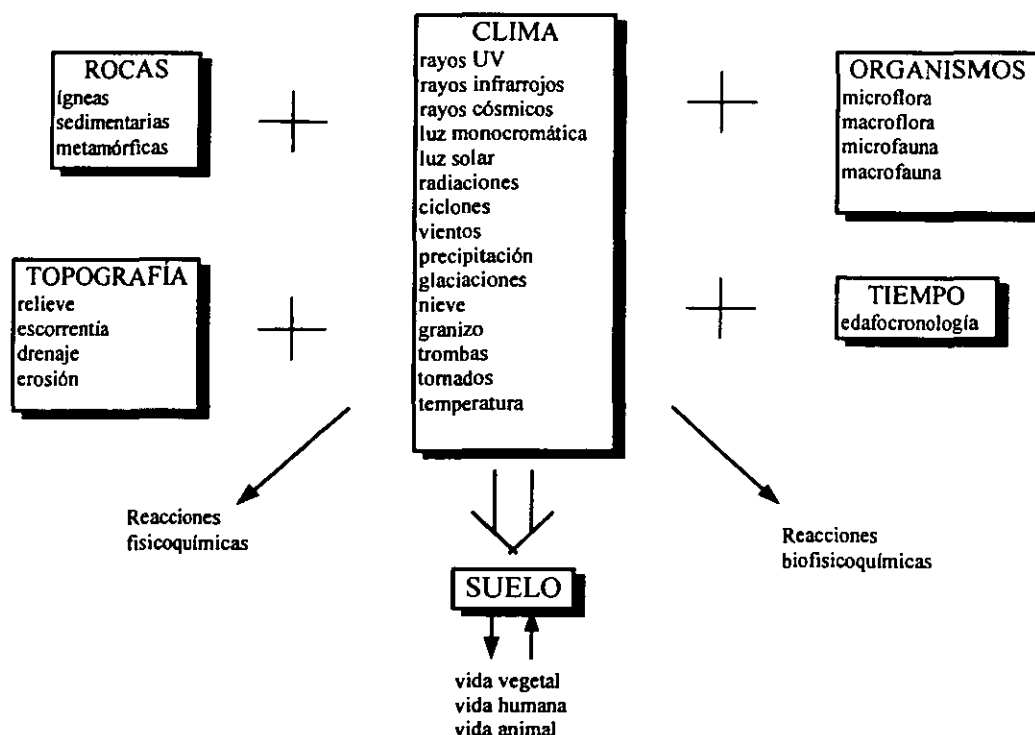


Fig.2.1 Procesos formadores del suelo (Aguilera, 1989)

Para que se forme 1 cm de suelo deben transcurrir más de 100 años bajo condiciones ideales y sólo se podría recuperar un suelo de 20 cm con los elementos que el hombre pudiera tener (Palacios, 1996). Bajo esta perspectiva el suelo en teoría es renovable, pero en la práctica no lo es; de ahí la importancia que tiene su cuidado como sistema y recurso natural.

El suelo en si, constituye un estrato de rocas de determinada granulometría, mezclado con sustancias de origen orgánico. La disposición recíproca de las distintas fracciones no es desordenada, por lo menos en suelos que ya no son jóvenes, sino que tales componentes se disponen en una determinada estructura (Parisi, 1979).

Un concepto fundamental, es que en el suelo existen niveles estructurales y que tradicionalmente se compone de tres fases: sólida, acuosa y gaseosa (Tabla 2.1). La fase sólida constituye aproximadamente el 50 % del volumen de la mayor parte de los suelos superficiales y consta de una mezcla de partículas orgánicas e inorgánicas cuyo tamaño y forma varía considerablemente.

Tabla 2.1 Composición porcentual media de un suelo húmedo (Parisi, 1979)

Componente	%
Fracción mineral	45
Substancias orgánicas	5
Agua	25
Aire	25

2.1.3 Propiedades físicas y químicas

Cada suelo presenta un conjunto de propiedades físicas y químicas, que dependen de la naturaleza de sus componentes. El clima del suelo presenta los mismos componentes que el clima atmosférico: temperatura y humedad.

Temperatura. Las variaciones de temperatura del suelo son las manifestaciones de la energía solar, de la cual parte es absorbida y convertida a calor, mientras que el resto es reflejada a la atmósfera. El efecto principal de la temperatura es influir en la tasa de las reacciones, pero también se ven afectados el volumen, la presión, los potenciales de óxido-reducción, la difusión, la viscosidad, la tensión superficial y la estructura del agua entre otros.

El contenido de humedad puede tener influenciar la temperatura, ya que la cantidad de calor que se necesita para elevar en 1°C la temperatura de un gramo de suelo es alrededor de la quinta parte de la necesaria para

calentar 1 g de agua. Lo cual indica que los suelos con alta humedad se calientan con mayor lentitud debido a la cantidad considerablemente mayor de calor requerida para elevar la temperatura (Foth, 1985; FitzPatrick, 1980).

La transferencia de calor depende de varios factores de los cuales las variables más importantes son la porosidad y la humedad. Cuando el suelo está seco la conducción de calor es muy lenta, debido a que la conductividad en el aire del espacio poroso es lenta. Por lo tanto, entre mayor sea la porosidad menor es la conductividad y en consecuencia una porción elevada de materiales finos tiende a calentarse con lentitud (FitzPatrick, 1980).

Humedad. La humedad del suelo comprende todas las formas de agua que entran al sistema del suelo (Fig. 2.2). El agua de la superficie migra hacia abajo por la fuerza de gravedad y los espacios porosos pueden llenarse con la solución del suelo o aire, de acuerdo con la cantidad de humedad.

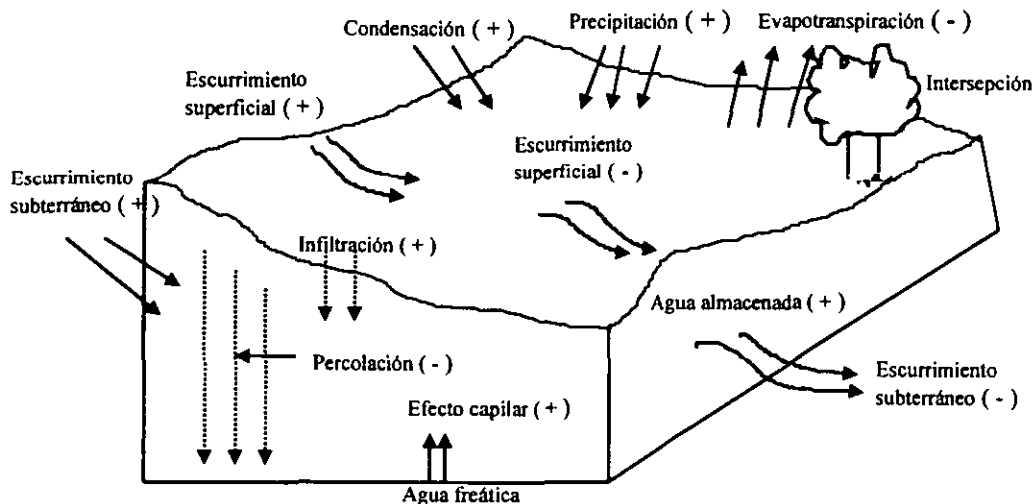


Fig. 2.2 Componentes del ciclo hidrológico del agua (Gavande, 1972)

Algunas capas de agua se absorben fuertemente a las partículas del suelo debido a las fuerzas adhesivas, y conforman el agua de adhesión, la cual se mueve muy poco. Más allá de la fuerte atracción de las partículas del suelo, las moléculas de agua también se mantienen como una película de agua de cohesión. Las moléculas del agua de cohesión comparadas con las de adhesión, están en mayor movimiento, tienen un mayor nivel energético y se mueven más fácilmente (Fig. 2.3). El movimiento del agua ocurre cuando hay diferencias de potencial entre diferentes puntos del sistema. El agua tiende a moverse de alto a bajo potencial (Millar *et al.*, 1972; Gavande, 1972).

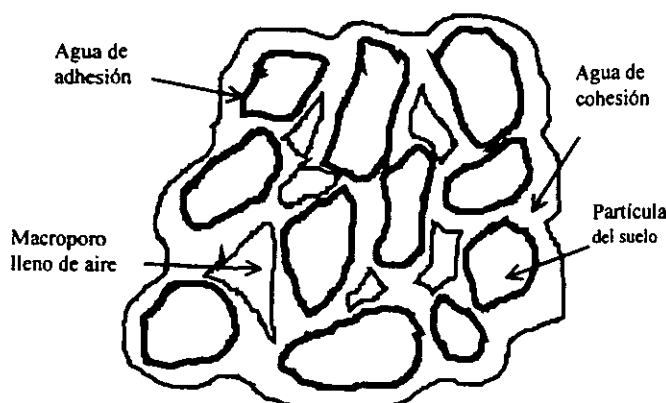


Fig. 2.3 Relación de agua de adhesión y cohesión con respecto a las partículas del suelo y macroporos llenos de aire (Millar, 1972)

Color. El color del suelo está influido por la cantidad y tipo de materia orgánica, la condición de drenaje y la aireación.

El color oscuro, por lo general se debe a que contiene materia orgánica en estado avanzado de descomposición. La materia orgánica imparte a los suelos un color gris, gris oscuro o pardo oscuro, a menos que algún otro constituyente, como el óxido de hierro o una acumulación de sales modifique el color. Los colores gris claro y blanco se originan por la falta de alteración de materiales maternos de color gris o blanco, depósitos de carbonato de calcio, presencia de sales, o como resultado de la remoción de hierro, dejando cantidades significativas de minerales claros (Foth, 1985; Aguilera, 1989 FitzPatrick, 1980).

Si los suelos están mal drenados, hay una mayor acumulación de materia orgánica en las capas superficiales dándoles a estos una coloración muy oscura. Cuando las capas inferiores contienen poca materia orgánica, son gris claro, indicando una condición de drenaje deficiente. Si el drenaje es intermedio el color gris del subsuelo es interrumpido por moteados amarillos, pero cuando permite la aireación y las condiciones de humedad son favorables para la actividad química, el hierro de los minerales del suelo se oxida e hidrata formando compuestos amarillos y rojos (Aguilera, 1989; Foth, 1985).

Muchos horizontes del suelo tienen un color dominante. Los horizontes que están secos una parte del año y otra húmedos, tienden a presentar una mezcla de dos o más colores. Cuando algunos colores estén presentes en un diseño manchado o jaspeado, se usa la palabra moteado para describir esta condición. El moteado origina vetas, motas que están relacionadas con el tamaño de la superficie de los colores mediante el contraste (débil, distinto, prominente), la abundancia (pocas, comunes, muchas) y el tamaño (finas, medias, grandes) (Aguilera, 1989).

Textura. La textura expresa el tamaño relativo de las partículas del suelo, como una proporción relativa de arena, limo y arcilla. La Textura influye en la magnitud de la mayoría de las reacciones físicas y químicas, ya que ésta determina el tamaño de la superficie sobre la cual ocurren dichas reacciones.

Los grupos de partículas que conforman al suelo se denominan separados y son divididos con base al tamaño sin tomar en cuenta su composición química, color, peso y otras propiedades (Tabla 2.2). El término esquelética (no mostrado en la Tabla) corresponde a las rocas, guijarros y grava, cuyos tamaños pueden rebasar el centímetro (Aguilera, 1989; Foth, 1985).

Tabla 2.2 Algunas características de los separados de un suelo (Foth, 1985)

Separado	Diámetro mm ^a	Diámetro mm ^b	Número de partículas por gramo	Área superficial en 1 g/cm ²
Arena muy gruesa	2.00-1.00	-	90	11
Arena gruesa	1.00-0.50	2.00-0.20	720	23
Arena mediana	0.50-0.25	-	5700	45
Arena fina	0.25-0.10	0.20-0.02	46000	91
Arena muy fina	0.10-0.05	-	722000	227
Limo	0.05-0.002	0.02-0.002	5776000	454
Arcilla	Menor de 0.002	Menor de 0.002	90260853000	8000000 ^c

a Sistema United States Department of Agriculture.

b Sistema Internacional Soil Science Society.

c Área superficial de partículas de arcilla montmorillonita con forma de placas, determinada con el método de retención de glicol por Sor y Kemper. (véase SSSAP, vol.23, Pag. 106, 1959). Otros supuestos en base a esferas y cálculos basados en el mayor tamaño permisible.

Las partículas de arena son de tamaño relativamente grande y en consecuencia exponen poca superficie en comparación con aquellas que exponen un peso igual de partículas de limo o de arcilla. Debido a esto, los separados de arena desempeñan un papel pequeño en las actividades físicas y químicas del suelo. Cuando están presentes en una proporción no reducida, las arenas aumentan el tamaño de los espacios entre las partículas, facilitando con ello el movimiento del aire y del agua (Foth, 1985).

El limo tiene un área superficial mayor, una velocidad de intemperización más rápida y una liberación de nutrimentos solubles más rápido que las arenas, y tienen poca tendencia a reunirse o adherirse a otras partículas (Millar *et al.*, 1972).

La arcilla es el separado más potente capaz de impartir sus propiedades a una mezcla de separados, debido a que presenta un área superficial por gramo, mil veces mayor que el limo y casi un millón de veces mayor que la arena muy gruesa. Dado que una gran cantidad de agua es retenida como una película en la superficie de

las partículas de arcilla, la cantidad de ésta en el suelo influye grandemente en su capacidad total de retención de agua y de algunos nutrimentos disponibles, actuando como un almacén (Aguilera, 1989).

Los suelos de textura gruesa con 20 % o más de materia orgánica y suelos de textura fina con 30 % o más de materia orgánica en peso tienen propiedades dominadas por la fracción orgánica en vez de la fracción mineral. Si tales suelos tienen más de 30 cm de espesor se les denomina suelos orgánicos (Aguilera, 1989).

Densidad Aparente. La densidad aparente o de masa es la medida en peso del suelo por unidad de volumen. Esta relacionada con el peso específico de las partículas minerales y las partículas orgánicas así como por la porosidad, por lo que puede variar con la condición estructural del suelo, y depende en gran parte de su contenido de agua al contraerse e hincharse conforme se seca o se moja (Aguilera, 1989; Blake *et al.*, 1986; Gavande, 1972).

La densidad aparente es importante para estudios cuantitativos de suelos, para calcular los movimientos de humedad, los grados de formación de la arcilla y la acumulación de los carbonatos en los perfiles de suelos. Dentro de estudios de fertilidad sobresale debido a que las labores continuas con implementos pesados inducen compactación, reduciendo la infiltración y la penetración de las raíces (Aguilera, 1989; FitzPatrick, 1980).

Casi todos los suelos minerales tienen una densidad aparente que varía de 0.4 a 2.0 g/cm³; la de los suelos arcillosos granulados superficiales por lo común está en el intervalo de 1.0 a 1.3 g/cm³; para los suelos superficiales de textura gruesa es de ordinario entre 1.3 a 1.8 g/cm³. En los suelos superficiales de textura fina, el mayor desarrollo de su estructura explica que tengan una menor densidad aparente con relación a suelos más arenosos. La de los suelos orgánicos es muy baja con relación a la de los suelos minerales. Existe una variación considerable en esa densidad, dependiendo de la materia orgánica y del contenido de humedad en el momento de muestreo. Son comunes valores en el intervalo de 0.1 a 0.6 g/cm³ (Aguilera, 1989; Foth, 1985; Blake *et al.*, 1986).

Densidad de partícula. La densidad de partícula o real, sólo considera a las partículas sólidas y se toma como una función aditiva de las densidades de los constituyentes del suelo. En consecuencia, la densidad de las partículas es constante y no varía con la cantidad de espacio que haya entre las partículas. Por tanto, un suelo suelto poroso tendrá una densidad aparente menor que un suelo compacto, aunque la densidad absoluta de las partículas individuales de los dos suelos pudiera ser la misma (Foth, 1985; FitzPatrick, 1980; Gilbert, 1967).

Para muchos suelos minerales, la densidad media de las partículas es de 2.6 g/cm^3 . No presenta gran variación en diferentes suelos, a menos que haya diferencias notables en el contenido de materia orgánica o en la composición mineralógica; ya que aparte de ciertos minerales pesados como la magnetita, que rara vez aparece en cantidades apreciables, la densidad de los componentes inorgánicos, esta comprendida dentro de una serie bastante reducida (Foth, 1985; Gilbert, 1967).

Porosidad. La porosidad está formada por la suma de los porcentajes de poros de diferente tamaño, que actúan de la siguiente manera: los poros grandes sirven para la aireación e infiltración, los poros medianos para la conducción del agua y los poros pequeños para el almacenamiento de agua disponible. El tamaño de los espacios porosos es tan importante como la cantidad total de poros y tanto el peso como el espacio poroso varían de horizonte a horizonte y ambos se ven afectados por la textura y la estructura del mismo. Los intervalos de porosidad varían entre 0 y 60 % para los depósitos sedimentarios (Tabla 2.3) (Aguilera, 1989).

El espacio poroso aumenta con la adición de materia orgánica y generalmente disminuye desde la superficie hacia la profundidad, especialmente si existen zonas de compactación.

Tabla 2.3 Intervalos de porosidades para materiales sedimentarios (Iturbe *et al.*, 1992)

Materiales	Porosidades (%)
Arcillas	45 - 55
Limo	40 - 50
Arena media	35 - 40
Arena uniforme	30 - 40
Arena fina media	30 - 35
Grava	30 - 40
Grava y arena	20 - 35
Arenisca	10 - 20
Pizarra	1 - 10
Caliza	1 - 10

pH. El pH del suelo es producido por un grupo de condiciones químicas específicas, bajo las cuales se puede registrar la acidez, neutralidad o alcalinidad. El valor promedio registrado se encuentra en el intervalo de 3 a 9, pero se pueden registrar valores fuera de estos límites.

La acidez del suelo es común en las regiones en donde la precipitación es alta, lo suficiente para lixiviar apreciables cantidades de bases intercambiables de los niveles superficiales de los suelos. La alcalinidad se

presenta cuando existe un alto grado de saturación de bases. La presencia de sales, especialmente de calcio, magnesio y sodio en forma de carbonatos favorece la presencia de los iones oxhidrilos (OH⁻) sobre los iones hidrógeno (H⁺) en la solución del suelo. Los suelos alcalinos son característicos de las regiones áridas y semiáridas (Aguilera, 1989).

Los factores principales que controlan el pH son la materia orgánica y el tipo y cantidad de cationes. Así, cantidades grandes de materia orgánica inducen acidez, excepto cuando está balanceada por una concentración elevada de cationes básicos. Por otra parte tiende a estar correlacionado con la precipitación pluvial y sus efectos principales son biológicos (FitzPatrick, 1980 Millar *et al.*, 1972).

Conductividad eléctrica. La conductividad es una expresión numérica de la capacidad de una solución acuosa para transmitir una corriente eléctrica. Esta habilidad depende de la presencia de iones, su concentración total, movilidad, valencia y concentración relativa, esto último concierne al efecto que tiene la relación agua suelo, para extraer la solución. (APHA, 1990; Jackson, 1982).

La medida de la conductividad eléctrica de los extractos obtenidos de los suelos, permite establecer una estimación cuantitativa de la cantidad de sales que contiene, ya que a medida que la concentración iónica disminuye, la conductividad eléctrica es menor. Los cationes más importantes en el extracto de suelo son Ca²⁺, Mg²⁺, K⁺ y Na⁺ y los aniones primarios normalmente presentes son sulfatos, cloruros, nitratos y carbonatos o bicarbonatos (Jackson, 1982; Hendershot *et al.*, 1993).

Materia orgánica. La materia orgánica de los suelos se forma y acumula en ellos por incorporaciones de residuos vegetales a nivel rizósfera, y por la caída de las hojas, frutos, corteza de los fustes y por los cadáveres microbianos y productos de descomposición tanto de macro como de microfauna.

La materia orgánica se fermenta por acción de los microorganismos, formándose quelatos, ácidos. fulvicos, huminas, aminoácidos, bases púricas y pirimídicas, proteínas, azúcares, grasas y ceras. Aporta al suelo macronutrientes como N³⁺, P³⁺, S⁶⁺, Ca²⁺, Na⁺, K⁺, y Mg²⁺; así como micronutrientes Fe²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, B³⁺ y Mn²⁺ e incrementa la capacidad de intercambio catiónico total (Aguilera, 1989).

Las zonas frías y templadas presentan mayor cantidad de materia orgánica en comparación con las regiones tropicales, mientras que en las zonas áridas y semiáridas el contenido es muy bajo. Los suelos orgánicos se caracterizan por presentar un 30 % de materia orgánica y las turberas hasta 90 %. Las relaciones C:N son valiosas para detectar la fertilidad de los suelos y los balances de oxidación y nitrificación. Las relaciones C:N normales son de 9, 10 y 11.

Composición química. En la corteza terrestre se encuentran alrededor de 92 elementos químicos. Aproximadamente el 98 % de la corteza terrestre está formado por ocho elementos químicos (Fig. 2.4). Sin embargo a esta lista deben agregarse otros elementos que tienen gran importancia en la evolución de los suelos y en la composición de las plantas (Hidrógeno 0.87 %, Cloro 0.19 %, Fósforo 0.11 %, Manganeso 0.09 %, Carbono 0.08 %, Azufre 0.06 % y Nitrógeno 0.03 %). El silicio y el oxígeno constituyen el 75 % de la misma. Muchos de los elementos importantes para el crecimiento de las plantas y de los animales se presentan en cantidades muy pequeñas (Foth, 1985; Vivó, 1945).

Los nutrimentos se vuelven disponibles a través de la intemperización de los minerales y la descomposición de la materia orgánica, con excepción del nitrógeno que se incorpora al suelo por medio de la acción microbiana de bacterias correspondientes al ciclo del nitrógeno, por medio de bacterias simbióticas y por la acumulación de materia orgánica de origen vegetal y animal. Los nutrimentos son absorbidos de la solución del suelo o de las superficies de los coloides como cationes y aniones (Aguilera, 1989).

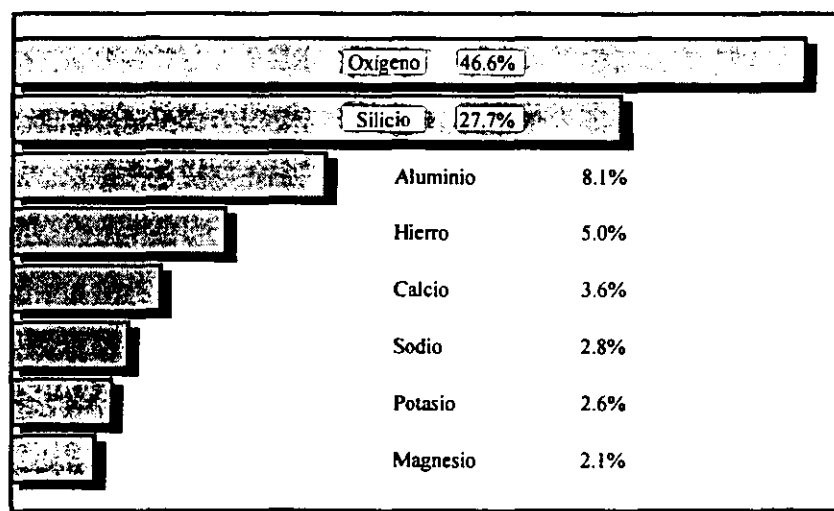


Fig. 2.4. Los ocho elementos de la corteza terrestre que se presentan en porcentaje superior al 1% en peso. El resto de los elementos constituye el 1.5% en peso (Millar, 1972)

2.1.4 Microbiología del suelo

El poblamiento edáfico del suelo presenta una gran variedad de poblaciones, pero la más numerosa y variable es la población bacteriana (se estiman poblaciones viables desde un millón o menos, hasta varios miles de millones por gramo de suelo). En los suelos aireados adecuadamente predominan bacterias y hongos, mientras que en los que contienen poco oxígeno, las bacterias son las principales responsables de los cambios químicos y biológicos.

Las bacterias del suelo pueden ser nativas (autóctonas) y alóctonas. Las nativas pueden presentarse en estados resistentes y perduran por largos periodos sin tener actividad metabólica, pero en determinado momento proliferan y participan en las funciones bioquímicas de la comunidad. Las alóctonas por el contrario, no participan de manera significativa en las actividades de la comunidad, entran con la precipitación, en tejidos enfermos, estiércol o aguas negras; y pueden permanecer por algún tiempo como formas inactivas e incluso crecen por periodos cortos, pero sin contribuir en las transformaciones o interacciones ecológicas (Alexander, 1980).

Los microorganismos del suelo habitan en los poros y se desarrollan sobre las superficies, ya que casi no se encuentran formas libres en la solución del suelo. Sin embargo, cuando el tamaño de poro es más pequeño a 1 μm de diámetro, la superficie de los poros permanece desocupada al resultar inaccesibles (Wild, 1992).

Las fuerzas que desempeñan alguna función en la dinámica de las poblaciones, así como el efecto de estas poblaciones sobre su medio ambiente, están determinadas en gran medida por las características físicas y químicas del suelo. Por lo que, el cuestionamiento clásico de los factores que limitan a la actividad bacteriana, no tiene una respuesta rápida y fácil, pues están implicadas innumerables interacciones de los factores ambientales muy estrechas, que la variación de uno de los factores afecta frecuentemente y de distinta manera a diferentes bacterias (Alexander, 1980; Clark, 1971; Rose, 1977).

El factor principal que limita el crecimiento bacteriano en el suelo es la escasez de alimento, o la carencia de una fuente de energía apropiada y disponible. La naturaleza de un material energético añadido influye tanto en la rapidez como en la duración de la elevación de la actividad, e igualmente en la especificidad de la flora que responde. Los suelos con elevado contenido de materia orgánica tienden a contener organismos con mayores exigencias mientras que la fracción del suelo asociada a las raíces de las plantas posee un nivel más elevado de organismos con menores exigencias (Wild, 1992; Clark, 1971).

El contenido de humedad influye en la actividad microbiana en diferentes formas. Representa un papel importante en la velocidad de desplazamiento de los organismos móviles y en la eliminación de excreciones tóxicas o inhibitorias del crecimiento de otros organismos. Esto puede proporcionar una explicación adicional al descenso de la actividad metabólica cuando el contenido de humedad disminuye, incluso antes de que se alcancen condiciones extremas. Incluso las variaciones periódicas del tamaño de la comunidad, están directamente relacionadas con las variaciones de la humedad. Cuando la humedad es excesiva, la proliferación microbiana se detiene principalmente porque dicho exceso limita el intercambio gaseoso y disminuye el suministro de oxígeno disponible, creando así un ambiente anaerobio, ya que el oxígeno se

difunde a través el agua unas diez mil veces más lentamente que en el aire (Wild, 1992; Clark, 1971; Alexander, 1980).

La temperatura es un factor de interés ya que rige todos los procesos biológicos. Cada grupo de microorganismos presenta su máxima actividad a una temperatura dada y se ha demostrado una asociación entre el tamaño y tipo de comunidad con la temperatura, De ésta relación se reconocen tres grupos: los mesófilos, que soportan temperaturas que van de los 25 a los 30°C, los psicrófilos que se desarrollan por abajo de los 20°C y los termófilos que soportan arriba de los 45°C.

El pH afecta la habilidad de los microorganismos para conducir las funciones celulares, el transporte de la membrana celular y el equilibrio de las reacciones catalizadas, teniendo un impacto en las tres conformaciones dimensionales de las enzimas y de las proteínas transportadoras de las células. También afecta las fuerzas responsables de la producción de energía dentro de la célula (Suthersan, 1997).

La escala de pH que toleran las bacterias del suelo se encuentra entre un pH 4 y un pH 10. El óptimo dentro de estos márgenes se encuentra muy cercano al punto neutro hacia el lado alcalino. Las condiciones altamente ácidas o alcalinas tienden a inhibir muchas bacterias comunes, sin embargo, a pH 3 aún se encuentra una gran cantidad de microorganismos.

En cuanto a la variabilidad en el número de bacterias edáficas, se sabe que no están uniformemente distribuidas a lo largo del perfil ó largo de un solo horizonte. Cuando se hacen exámenes cada 24 horas e incluso cuando se realizan cada 2 horas, el número de bacterias que se detectan cambia drásticamente. Se ha intentado relacionar estos cambios con los diferentes factores ambientales, pero se ha comprobado que pueden producirse, incluso, cuando estos permanecen constantes. Únicamente se ha visto que con muy pocas excepciones, su distribución en el suelo simula la distribución de la materia orgánica, y en los casos en que la distribución típica del perfil está desordenada, es decir en donde el máximo bacteriano no se da a la misma profundidad del perfil que el máximo valor para la materia orgánica, la disconformidad puede deberse a condiciones de aridez en la superficie del suelo, o ser demasiado ácido para permitir un desarrollo bacteriano abundante (Wild, 1992; Clark, 1971).

2.1.4.1 Movimiento bacteriano

La presencia de bacterias en el subsuelo, regolitas y mantos acuíferos, en números considerados como típicos de suelos superficiales, es el indicio de que hay movimiento bacteriano a partir de la superficie del suelo o de

que fueron depositadas junto con el material sedimentado. El movimiento de las bacterias se clasifica en dos categorías, movimiento activo y movimiento pasivo.

Movimiento activo. Aunque algunas bacterias del suelo muestran tener una gran motilidad *in vitro*, no se puede asumir que lo sean *in situ*, ya que tienen que vencer la alta viscosidad y la tensión superficial del agua en los suelos no saturados que resultan de la atracción del agua por las superficies minerales (Murphy *et al.*, 1996).

Se ha puntualizado que el movimiento activo bacteriano en el suelo, requiere continuamente de vías de agua, las cuales pueden depender tanto del contenido de agua como de la distribución del tamaño de poro. Sin embargo dicho movimiento se ve restringido y en particular por la adsorción que hay entre las partículas del suelo y las bacterias (Murphy *et al.* 1996).

Movimiento pasivo. La motilidad celular contribuye a la migración, pero la escala de movimiento se reduce a unos cuantos milímetros, por lo que el movimiento en una escala de metros, es principalmente de tipo pasivo. Las diferentes comunidades del suelo (larvas, nematodos, insectos, etc.) contribuyen al movimiento de las bacterias, como resultado de su alimentación y en mayor grado de los biocanales creados por ellas mismas, permitiendo la percolación a través de ellos. Asimismo, las raíces de las plantas pueden llevar bacterias de la superficie a través del perfil de expansión de su sistema radical. No obstante el movimiento del agua parece ser el vector pasivo más importante en términos de distancia y número de bacterias transportadas

En cuanto a las propiedades del suelo, si bien el agua es el mediador primario del movimiento, la textura del suelo es determinante, ya que afecta el grado de adsorción (presumiblemente por el contenido de arcilla) y filtración (como resultado de diferencias en la distribución del tamaño del poro). Las propiedades químicas como el pH deben ser también consideradas, ya que tienen que ver con aspectos físicos y químicos de las interacciones bacterias-minerales del suelo (Murphy *et al.*, 1996).

2.1.4.2 Fisiología microbiana

La capacidad de los organismos para utilizar los nutrimentos de sus alrededores, les confiere la habilidad para en un hábitat. Los nutrimentos tienen tres funciones: proveer los materiales que se requieren para la síntesis protoplasmática (anabolismo); abastecer de la energía necesaria para el crecimiento celular (catabolismo) y servir como aceptores de electrones liberados en la reacción que proporciona energía a los microorganismos. Las diferencias en nutrición no están relacionadas con las sustancias minerales esenciales, sino con las moléculas que contienen carbono y nitrógeno.

El hecho de que un compuesto pueda o no ser utilizado como nutrimento, está determinado por dos factores principales. El primero es la capacidad del compuesto de ingresar al interior del microorganismo, lo que suele significar la capacidad de atravesar la membrana plasmática. El segundo, es si el organismo es capaz de sintetizar las enzimas que se necesitan para su metabolismo (Rose, 1977).

El número y la actividad de los microorganismos están controlados parcialmente por la cantidad de energía que pueda liberarse en la descomposición de la materia orgánica. Aunque la generación de energía es un proceso vital básico, los organismos edáficos presentan una amplia capacidad de adaptación que refleja distintas condiciones ecológicas que pueden presentarse en un suelo. Se utilizan tres mecanismos básicos para la liberación de la energía contenida en los substratos orgánicos, pudiendo algunos organismos tener acceso a más de uno en función de las condiciones en que se desarrollan (Alexander, 1980; Wild, 1992).

Respiración aerobia. Proceso utilizado por microorganismos aerobios estrictos y anaerobios facultativos en presencia de oxígeno, comprende una serie de reacciones de oxidación, en las que los electrones son conducidos por una cadena de transportadores, los citocromos, hasta llegar al oxígeno como aceptor terminal de los electrones. Este proceso da como resultado la formación de enlaces fosfatados ricos en energía, como el adenosindifosfato (ADP) que se transforma a adenosintrifosfato (ATP), el cual se emplea en varios procesos metabólicos.

Respiración anaerobia. Aunque el oxígeno es un eficaz aceptor de electrones, existen condiciones en que éste no está disponible y algunos organismos son capaces de utilizar otros aceptores inorgánicos (nitratos, sulfuros, etc.), los cuales se reducen. Las etapas iniciales de la respiración aerobia y anaerobia son iguales, y sólo se diferencian en el aceptor de electrones terminal. La cantidad de ATP generado depende de la diferencia entre el potencial redox del substrato orgánico que se oxida y el del aceptor de electrones; por lo que la respiración anaerobia es menos eficaz en términos de producción de energía (Wild, 1992).

Fermentación. El proceso de fermentación lo emplean las bacterias anaerobias estrictas, las anaerobias facultativas y las levaduras. En este no se requiere de un aceptor de electrones terminal inorgánico sino que un substrato orgánico actúa en los dos sentidos: como donante y como aceptor.

2.1.4.3 Conteo de microorganismos

El estudio detallado de la microbiología del suelo debería proporcionar información completa acerca del número, localización, actividad e interacciones con otras formas biológicas, pero la naturaleza heterogénea

del suelo unida al tamaño de los microorganismos, la diversidad metabólica y las limitaciones técnicas dificulta estudiar simultáneamente más de dos de las características mencionadas.

Los métodos actualmente disponibles para contabilizar los organismos del suelo se agrupan en dos grandes categorías: los que realizan el conteo con ayuda del microscopio (directos) y los que se basan en el cultivo de los organismos (viables o indirectos).

Los métodos directos excluyen el periodo de incubación y se han empleado para examinar a los microorganismos en forma cualitativa y para apreciar su distribución espacial. La combinación del uso del microscopio y de fluorocromos que se mezclan con algunos constituyentes esenciales (fenilalanina azul, anaranjado de acridina, etc.), proporciona una estimación del número de microorganismos, información sobre la morfología y tamaño celular o mediciones alternativas.

Los métodos indirectos se basan en las técnicas de dilución del cultivo y toman en cuenta que todos los microorganismos de interés son capaces de crecer bajo las condiciones de prueba. El método de cuenta en placa es ampliamente usado, pero no distingue entre células vivas y latentes, ni revela la existencia de células viables pero no cultivables, y esta influenciada por la adsorción de los microorganismos a las partículas del suelo, por lo que hay que optimizar los procesos de extracción y réplicas. La técnica del número más probable (NMP), es otra de las pruebas más empleadas y tiene una mejor sensibilidad metabólica, pero es muy larga.

Las técnicas moleculares también han sido empleadas con fines de obtener una cuantificación más precisa de los microorganismos presentes en el suelo, sin embargo, se enfrentan a los problemas que presenta la matriz del suelo. Algunas de estas técnicas, se basan en la resistencia a antibióticos, cuantificación de constituyentes celulares (ATP, fosfolípidos), presencia de anticuerpos monoclonales o policlonales en conjunción con técnicas fluorescentes, enriquecimiento de la fracción microbiana para la extracción de los ácidos nucleicos, no obstante que en algunos de ellos se presentan problemas de sobrestimar la población viable, degradación y contaminación de los ácidos nucleicos.

Es importante acentuar que la mayoría de los métodos empleados actualmente para estudiar el número y biomasa de la microbiología no dependen de un solo método. Dentro de las combinaciones más empleadas, están: la cuenta en placa y microscopía con fluorocromos (Brockman *et al.*, 1992; Colwell, 1989; Kieft *et al.*, 1993). En adición a la combinación anterior, algunos investigadores emplean NMP, microradiografías (Pedersen *et al.*, 1990), PCR (Polymerase Chain Reaction) (Lee *et al.*, 1996), fosfolípidos (Findlay *et al.*,

1989). Por otro lado, se han desarrollado técnicas para la cuantificación de microorganismos específicos, como lo son los degradadores de contaminantes orgánicos (Hanson *et al.*, 1993; Somerville *et al.*, 1985).

2.2 CONTAMINACIÓN DEL SUELO

El término de contaminación del suelo, puede definirse como el incremento de la concentración de un agente (biótico o abiótico) introducido o natural, que dificulta o anula la capacidad del suelo para degradarlo, e incorporarlo a la vía de los ciclos biogeoquímicos.

Es importante tener en cuenta que actualmente se tiene más conciencia en materia de la contaminación del suelo, pero los problemas de contaminación del mismo se remontan al pasado, y muchos de ellos continúan repercutiendo los ecosistemas, por lo que no pueden ser ignorados.

2.2.1 Contaminantes orgánicos

Más de 1600 compuestos orgánicos se han identificado tanto en forma natural como de contaminantes, siendo de interés aquellos que contaminan el subsuelo y que se asocian a menudo con combustibles fósiles. Los productos refinados del petróleo son generalmente mezclas complejas, con una variedad de compuestos orgánicos con fracciones minoritarias de aditivos orgánicos que se encuentran dentro de diferentes clases químicas. Por ejemplo, la gasolina, el keroseno, el diesel y los aceites de desecho que tienen diferentes características físicas y químicas y por lo tanto se comportan de diferente forma en el medio ambiente (Suthersan, 1997).

Los hidrocarburos son compuestos que se conforman de hidrógeno y carbono. Con base a su estructura se pueden dividir en dos clases primarias: alifáticos y aromáticos. Los primeros se dividen en alcanos, alquenos, alquinos y otros análogos cíclicos. Los compuestos aromáticos tienen una configuración en formas de anillo y tienden a sufrir una sustitución heterocíclica.

De los combustibles derivados del petróleo, la gasolina es el más utilizado y con el que se han observado los mayores problemas de contaminación. Su composición se basa esencialmente en una mezcla compleja de hidrocarburos naturales y manufacturados hidrofóbicos, relativamente volátiles que varían en proporción dependiendo de su uso final. Cada compuesto que le comprende tiene sus propias características fisicoquímicas que determinan su comportamiento en el ambiente. Los hidrocarburos de la gasolina incluyen alifáticos, aromáticos y aditivos denominados por compuestos con 4 ó 12 átomos de carbono, con puntos de ebullición entre los 30°C a 200°C.

2.2.1.1 Hidrocarburos monoaromáticos volátiles

Los hidrocarburos aromáticos constituyen del 2 al 8 % de la composición de la gasolina. Los hidrocarburos aromáticos, se conforman únicamente de átomos de carbono e hidrógeno unidos en forma de anillos que se estabilizan por resonancia. De los compuestos aromáticos sobresalen en particular el benceno, el tolueno, el etilbenceno y los xilenos (*meta*, *para* y *orto*-xileno), conocidos en conjunto como BTEX, los cuales son considerados como indicadores de la presencia de gasolinas y además se encuentran en las listas de la EPA que se refieren a materiales peligrosos (Zhou, 1995). Esto en razón de su relativa solubilidad, que puede afectar no sólo al suelo, sino que sería una fuente potencial de contaminación del agua subterránea. En la Tabla 2.8 Se presentan algunas de sus características.

Tabla 2.4 Propiedades y características de BTEX

	BENCENO	TOLUENO	<i>m</i> -, <i>p</i> -, y <i>o</i> -XILENO
Fórmula molecular	C ₆ H ₆	C ₆ H ₅ CH ₃	C ₆ H ₄ (CH ₃) ₂
Peso molecular	78.11	92.14	106.2
Densidad 20°C (g/cm ³)	0.8765	0.8669	0.8842
Punto de ebullición (°C)	80.1	110.6	139.3
Solubilidad en agua (mg/l a 25°C)	1740	500	134
Soluble en:	Alcohol, éter y acetona	Etanol, metanol y éter	Alcohol y éter
Color	Amarillo claro / Incoloro	Incoloro	Claro
Riesgos	Inflamable, tóxico y cancerígeno	Inflamable y tóxico	Inflamable y tóxico
Uso:	Solvente Componente de las gasolinas Fabricación de derivados aromáticos	Solvente Componente de las gasolinas	Solvente Componente de las gasolinas Síntesis de compuestos orgánicos
Concentración máxima permitida en agua potable (mg/l)	10	14,300	No reportado
Vida media en días:			
Agua subterránea	10 - 720	7 - 28	14 - 360
Suelo	5 - 16	4 - 22	7 - 28

*Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua CE/CCA-001/89. Perry, 1963

De los BTEX, el tolueno y los xilenos son los que se emplean con mayor frecuencia como solventes en la industria de pinturas, lacas, gomas y resinas (Yelian *et al.*, 1992). Clínicamente estos compuestos han llamado mucho la atención, ya que a partir de estudios toxicológicos en animales se ha demostrado que son tóxicos y

carcinógenos para los organismos superiores. Molnar *et al.*, (1986) demostraron que por inhalación de BTEX se afecta la coordinación motora de las ratas al grado de producir un estado tembloroso, así mismo se ha definido un incremento en su mortalidad y degeneración embrionaria al mismo tiempo que se afecta la motilidad del espermatozoides y la fertilización (Yelian *et al.*, 1992; Brown-Woodman 1991). Con respecto a la exposición del hombre a estos compuestos, Andrzejak *et al.*, (1992) realizaron un estudio en personas expuestas por 20 años en promedio a toluato y benzoato, por razones de trabajo, y observaron la presencia de trombocitopenia, bajos niveles de hemoglobina, efectos narcóticos y neurotóxicos.

2.2.2 Procesos de transporte

En un principio, se le consideraba al suelo como un sistema purificante de cantidades ilimitadas de contaminantes químicos. Se pensaba que los desechos depositados dentro del suelo, de algún modo se limpiaban. Pero con el tiempo se entendió que la contaminación, la cual se puede iniciar en la superficie o en el subsuelo por derrames, fugas de tanques de almacenamiento o ruptura de conductos desgastados así como por accidentes en los sistemas de transporte; puede migrar hasta los mantos acuíferos o cuerpos receptores destinados al consumo humano y de fines recreativos; gracias a los mecanismos de transporte, que se presentan como una combinación de procesos físicos, químicos y biológicos.

Las categorías generales de los procesos que afectan el comportamiento y partición de los contaminantes en el suelo, son los procesos hidrodinámicos, los abióticos y los bióticos. Los primeros afectan el transporte por el impacto del flujo del agua en el suelo (advección, dispersión y flujo preferencial). Los procesos abióticos afectan el transporte al causar interacciones entre el contaminante y el material de suelo estacionario (adsorción, volatilización e intercambio iónico) o por afección a la forma del contaminante (hidrólisis, reacciones redox). Los procesos bióticos pueden afectar el transporte por degradación del contaminante (orgánicos) o por inmovilización del contaminante disuelto (disolución de metales pesados), o en la utilización del contaminante en los procesos metabólicos (nutrimentos). Ejemplos de los procesos bióticos son: la biodegradación aerobia y anaerobia (Suthersan, 1997).

Tabla 2.5 Distribución de fases de un derrame de 30 000 galones de gasolina (Suthersan, 1997).

Fase	Volumen espacial contaminado	Porcentaje del total	Volumen de gasolina	Porcentaje del total
Producto libre	7 100	1.0	18 500	62
Adsorbido al suelo	250 000	20.0	10 000	33
Disuelto en el agua	960 000	79.0	333	1 - 5
Vapor	No cuantificado	-	-	<1

Los contaminantes orgánicos, pueden estar en interacción con el suelo en cuatro fases distintas: 1) como producto libre movable o NAPLs (Non-Aqueous Phase Liquids), 2) como fase adsorbida, 3) como fase disuelta y 4) como fase vapor. La distribución del contaminante dentro de las diferentes fases, como resultado de la dinámica de transporte, es finalmente una función de sus propiedades físicas y químicas y las características hidrológicas y geoquímicas de la formación del subsuelo. Como ejemplo se muestra en la Tabla 2.7 la distribución de un derrame de gasolina (Suthersan, 1997).

2.2.2.1 Transporte en zona no saturada

Los NAPLs son inmiscibles o escasamente solubles con el agua. Cuando se derraman, inician su migración a través de la zona no saturada (vadosa) como una fase separada (aire, agua y NAPLs). Si no hay una unidad edáfica impermeable que detenga su transporte, pueden continuar su migración desplazando aire bajo la influencia de las fuerzas de gravedad y capilaridad. En su trayectoria, los NAPLs cubren la matriz sólida, algunos se disuelven en la humedad del suelo, algunos se volatilizan y algunos comienzan a ser atrapados en los espacios porosos, en respuesta a las fuerzas de capilaridad. Estos procesos influyen por tanto, en la velocidad de desplazamiento de los compuestos, originando el fenómeno de retardación.

Por otra parte, cuando el volumen del derrame excede la capacidad de retención de la zona no saturada los NAPLs alcanzarán la franja capilar, quedando dos fases inmiscibles. En ésta zona los NAPLs deben desplazar el agua de los poros para continuar su migración. En este punto, la densidad de los NAPLs juega un papel importante en su movimiento subsecuente. En la Fig. 2.9 se esquematiza el comportamiento tanto de los LNAPLs (Light Non-Aqueous Phase Liquids) que presentan una densidad menor a la del agua y se quedan en la interfase, como de los DNAPL (Dense Non-Aqueous Phase Liquids) con densidades mayores a las del agua y que por lo tanto continúan su migración a través de la zona saturada.

La fase de vapor se desarrolla en la zona no saturada, seguida de la liberación del contaminante a altas presiones de vapor. La formación de la fase de vapor es una función de la volatilización de los NAPLs, del suelo cubierto, y de la fase disuelta en los compartimentos del agua subterránea. El comportamiento de la fase de vapor, es el resultado de las interacciones con y entre estos compartimentos (Suthersan, 1997).

Los mecanismos primarios del transporte de vapor en el subsuelo son difusión gaseosa y advección isotérmica. Por lo que esta migración es independiente del gradiente hidráulico del agua subterránea y ocurre en todas direcciones en la ausencia de una matriz del suelo heterogénea y gradientes térmicos. La migración continúa indefinidamente dentro de la atmósfera del suelo y sale a la atmósfera si existe comunicación. Hasta que el gradiente de concentración es satisfecho o se establece el equilibrio (Suthersan, 1997).

Los contaminantes de la zona no saturada reaccionan con la atmósfera del suelo y con el agua de las precipitaciones, para después ser transportados a los acuíferos. Por lo que la zona vadosa continúa siendo una fuente de contaminación sin no se ataca el problema en esta zona.

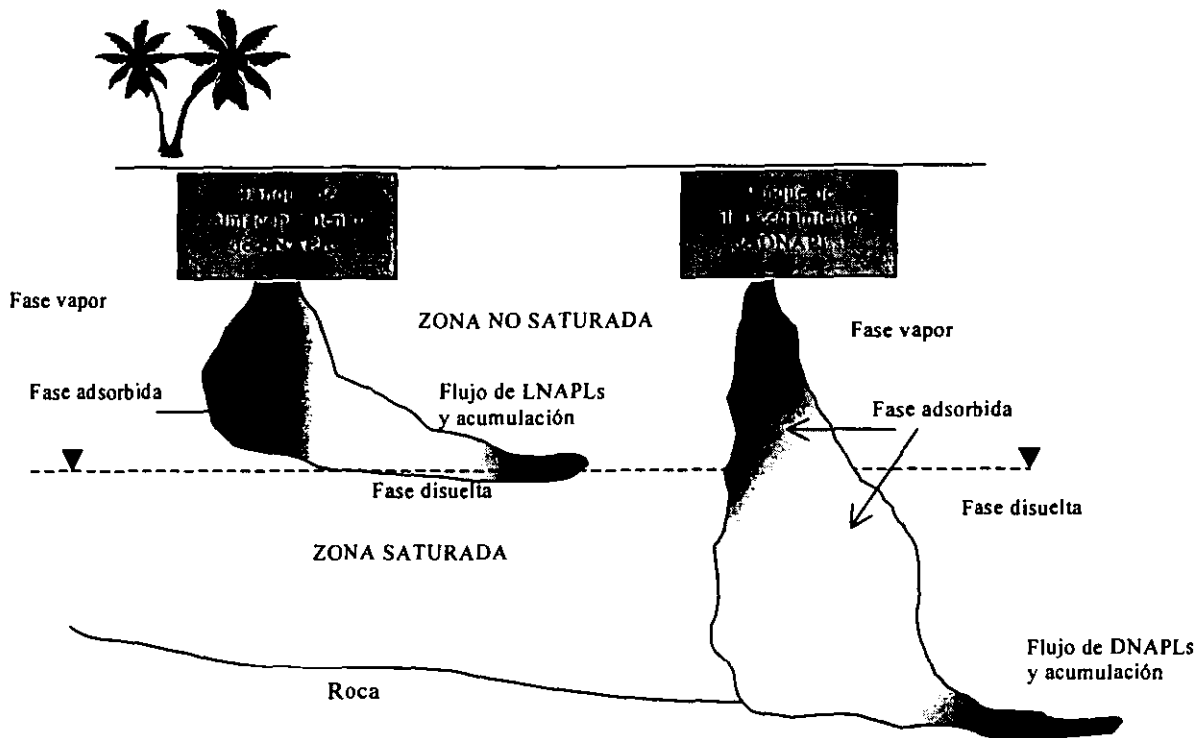


Fig. 2.5 Comportamiento de los LNAPLs y DNAPLs en el subsuelo (Suthersan, 1997)

2.2.3 Contaminación y tipos de suelo en México

Como se vio anteriormente, el suelo presenta una estructura y características precisas en cada ecosistema. México se caracteriza por presentar una de las más grandes variedades de ecosistemas y por lo tanto su diversidad en suelos es abundante (Fig. 2.5).

Tomando en cuenta que el incremento de las necesidades energéticas e industriales en todo el país, conlleva al desarrollo de actividades en las que de alguna forma se ve involucrado el empleo y almacenamiento de combustibles, los problemas de contaminación sobre los recursos naturales (agua, aire, suelo, flora y fauna) se ven incrementados, representando así mismo, un riesgo para la salud pública.

Las redes de ductos de distribución están siempre sujetas a riesgos de accidentes de diversa índole como derrames, explosiones incendios y fugas de gases. Las tuberías, ductos y tanques de almacenamiento de combustibles generalmente no se revisan con la frecuencia requerida. Otros derrames de hidrocarburos que

Con esto, se puede apreciar la gran cantidad de trabajo e investigación que hay que realizar en los suelos del país, ya que no se han desarrollado muchos estudios con fines de poder recuperarlos, ya sea para fines recreativos, de construcción tanto habitaciones como industrial o para el desarrollo de la agricultura.

2.3 BIODEGRADACIÓN

Dados los altos riesgos a la salud que implica la presencia de compuestos tóxicos en el ambiente, es necesario encontrar procedimientos efectivos para su eliminación. La biodegradación, es uno de los procesos que ha tomado importancia, debido al papel trascendental que juegan los microorganismos en la reducción de la complejidad de los compuestos químicos y que tienen lugar en la naturaleza; por lo que se presenta como una opción muy viable para el tratamiento de suelos contaminados con químicos orgánicos.

En la Fig. 2.10 se presentan las interacciones más cercanas que se presentan con el proceso de biodegradación. Sin embargo, se debe tener en cuenta que para que la biodegradación se cumpla como un proceso completo dentro de la naturaleza, es necesario tener en cuenta estudios relacionados con la ciencia del suelo, como es el caso de la limnología, edafología y química e ingeniería del suelo.

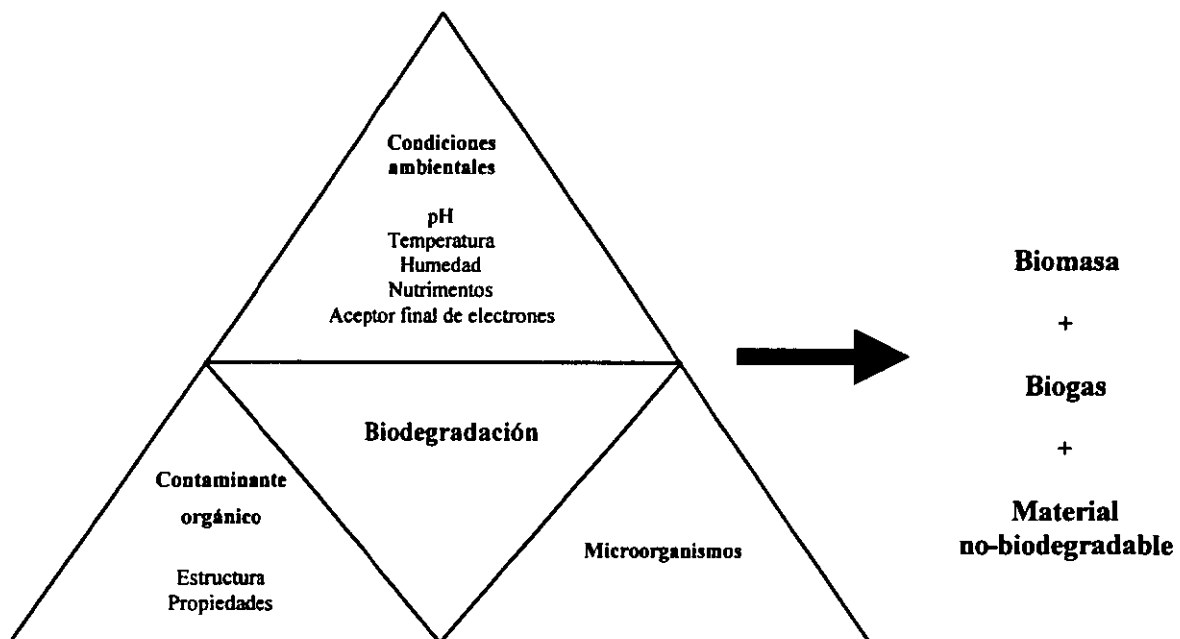


Fig. 2.7 Interacciones con la biodegradación (Suthersan, 1997)

La biodegradación natural sobre los compuestos orgánicos tanto en sistemas acuáticos como terrestres, tiene gran importancia en el funcionamiento de la biosfera, por medio de la participación de los microorganismos en los ciclos biogeoquímicos. Por lo que las comunidades de microorganismos naturales (nativos o autóctonos) presentes en el subsuelo con su gran versatilidad fisiológica, resultan ser los mejores agentes que

causan las transformaciones biológicas y que pueden llevar a cabo la biodegradación en diferentes hábitats y ambientes, tanto en condiciones aerobias como anaerobias.

2.3.1 Factores ambientales

La persistencia de algunos contaminantes en el medio, está supeditada a dos factores posibles; uno es que el compuesto sea realmente recalcitrante y otro porque las condiciones ambientales no son apropiadas para la actividad microbiana. La optimización de las condiciones ambientales debe ser alcanzada con el entendimiento de los principios bajo los cuales esos compuestos son degradados, y el efecto de las condiciones medioambientales tanto en los microorganismos responsables como en sus reacciones metabólicas.

Uno de los principales obstáculos que presenta el proceso de biodegradación, es la presencia de altas concentraciones del contaminante en el suelo, ya que puede haber efectos de toxicidad sobre la población. Una medición de la actividad y un registro del número de la población microbiana autóctona podría servir para evaluar tal efecto. Así, un conteo bajo puede indicar problemas de potencial tóxico o una población bajo estrés.

Otro de los problemas a tomar en cuenta, es la insuficiencia de nutrimentos en el suelo, sin embargo, la presencia de mínimas cantidades de nitrógeno y fósforo, permitirán la biodegradación en el subsuelo, aunque a velocidades muy bajas. Este fenómeno es debido al reciclamiento de los elementos, y bajo tales circunstancias la velocidad de degradación estará limitada por la velocidad a la cual los nutrimentos son reciclados (Suthersan, 1997).

Por otra parte, parámetros ambientales tales como la temperatura, pH y humedad determinarán la eficiencia de la biodegradación. La actividad metabólica de los microorganismos produce ácidos orgánicos a partir de la degradación de compuestos orgánicos, los cuales pueden acidificar al propio suelo si tiene deficiencias en su capacidad amortiguadora; teniendo que controlar el pH para que la biodegradación continúe. Por su parte, la humedad afecta la biodisponibilidad del contaminante, la transferencia de gases, el nivel de toxicidad efectivo de los contaminantes, el estado de movimiento y crecimiento de los microorganismos y la distribución de las especies.

2.3.2 Adaptación y potencial de los microorganismos en la limpieza de suelos

El suelo es un ambiente complejo, heterogéneo y cambiante, por los que todos los cambios en él, demandan una gran capacidad adaptativa de los microorganismos ahí presentes. Los microorganismos que pudieran ganar algún predominio, son aquellos que cuentan con la habilidad de adaptación a las condiciones dadas y a utilizar el sustrato mejor ajustado para su máximo índice de crecimiento. Estos procesos pueden o no estar asociados con una alteración del genotipo.

Por más de 50 años atrás, el hombre ha introducido al ambiente compuestos xenobióticos, a los cuales se han tenido que enfrentar los microorganismos. Algunos de esos compuestos fueron considerados como recalcitrantes, sin embargo, se ha visto que pueden ser ya biodegradables. Sobre esto se puede pensar que algunos microorganismos aprendieron a degradar ciertos compuestos específicos (Zehnder, 1995).

Dentro de los mecanismos de adaptación se resalta el papel que desempeñan las entidades extracromosomales de ADN, especialmente de los llamados plásmidos. Dichas unidades pueden cargar genes responsables para la síntesis de enzimas específicamente inactivadoras de nuevos antibióticos en microorganismos, cambios de resistencia de bacterias hacia ellas mismas, o para degradar sustancias xenobióticas. Estos factores de transferencia pueden dispersarse entre diferentes especies en comunidades mezcladas (Kunc *et al.*, 1998).

El control de la formación y actividad enzimática es sin duda uno de los principales medios de adaptación en microorganismos y especialmente en bacterias, representando una respuesta de los microorganismos a condiciones de medios multisubstratos como el suelo, el cual facilita el uso del sustrato más favorable para el mayor crecimiento y síntesis celular. Para sistemas naturales colonizados por una comunidad microbiológica heterogénea como el suelo, la composta, los lodos, etc., es característico que la fuente de carbono y energía controlen el crecimiento microbiano y que los sustratos disponibles puedan ser usados por una célula microbiana o por una comunidad, o simultáneamente. Por otra parte, es bien sabido que la descomposición de sustratos complejos, esta asociada a una sucesión de poblaciones microbianas y comunidades (Kunc *et al.*, 1998).

La información rescatada sobre la adaptación microbiana es necesaria para la formulación realista de la legislación ambiental, ya que se obtiene el conocimiento no solo de las perspectivas, sino también del límite de los microorganismos para degradar los contaminantes; por otra parte se obtiene el conocimiento de la susceptibilidad del sitio a la influencia antropogénica, como lo es el tratamiento físico, químico e incluso biológico (bioaumentación, fertilización) (Zehnder, 1995).

2.3.3 Biodegradación de BTX

La conformación que presentan los hidrocarburos monoaromáticos (Fig. 2.5) les confiere una estructura química muy estable, por lo que, los microorganismos que son capaces de utilizarlos como fuente de carbono y energía requieren de una gran demanda bioquímica. Por ejemplo, la utilización de hidrocarburos, se efectúa más frecuentemente entre los miembros de los géneros *Corynebacterium*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas*, mientras que la capacidad de utilizar compuestos aromáticos está más ampliamente extendida pero probablemente es más importante entre las *Pseudomonas* (Rose, 1977).

La presencia persistente de BTEX en un sitio contaminado puede deberse a una mínima actividad biológica por la falta de un aceptor final de electrones (O_2 , NO_3^- , Fe^{3+} , CO_2 , SO_4^{2-}), o bien por la ausencia de microorganismos con la capacidad metabólica requerida, ocasionada por una concentración insuficiente de BTEX que estimule las enzimas degradativas cuando la población ya está adaptada.

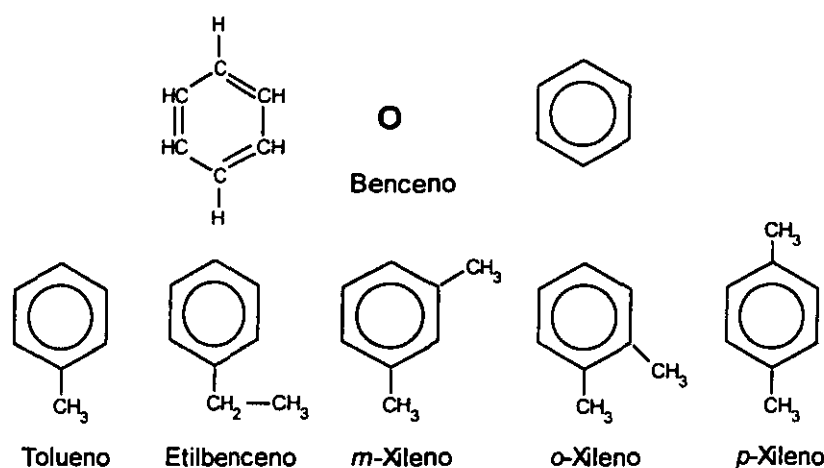


Fig. 2.8 Estructura química de los BTEX

Los microorganismos capaces de metabolizar aerobícamente hidrocarburos aromáticos de un anillo, están ubicados en la subsuperficie. La degradación se alcanza por dos tipos de oxidación alternativas. El primer método involucra, secuencialmente: (1) formación de dihidrodiol, (2) formación de alquil catecol, (3) fisión del anillo de estos intermediarios oxigenados, (4) formación de un aldehído o de un ácido y (5) eventual formación de CO_2 y H_2O . En principio la degradación sigue la ruta de la dioxigenasa, es decir, se lleva a cabo la inserción de dos grupos oxígeno. La molécula se transforma gradualmente a unidades de CO_2 . El segundo mecanismo para la degradación de compuestos aromáticos es la oxidación de cualquier sustituto alquil- en el anillo (Suthersan, 1997).

En la literatura se ha reportado que los BTEX pueden ser biodegradados tanto en condiciones anaerobias como aerobias. En el primer caso Berry-Spark *et al.*, (1990) evaluaron la adición de nitrato, para la biorremediación *in situ* de un acuífero contaminado con gasolinas. Los autores encontraron que la adición de nitrato es tan efectiva como la adición de oxígeno, siempre y cuando no estén presentes otros derivados orgánicos de las gasolinas. Se ha observado también, que mediante el uso de microorganismos desnitrificantes bajo condiciones anaerobias se obtiene una buena remoción de tolueno (Lemon *et al.*, 1989) y en cuanto a esto Zeyer *et al.*, (1986) sugieren que los hidrocarburos aromáticos presentes en ambientes anóxicos como sedimentos de lagos, digestores de lodos y zonas de infiltración, se pueden mineralizar en condiciones desnitrificantes, en ausencia de oxígeno molecular.

Por su parte Hutchins (1991), obtuvo una remoción del 70 al 80 % para BTEX bajo condiciones de desnitrificación anaerobia, observando que la degradación en el sitio de prueba se podía regular por el nitrato, ya que a altas concentraciones (500mg N-NO₃/l) se puede presentar inhibición. Así mismo mediante la utilización de microorganismos sulfatorreductores. Edwards *et al.*, (1992) consiguieron mineralizar completamente al tolueno y tres isómeros de xileno a CO₂, siendo el aceptor final de electrones el sulfato, sin embargo al parecer la acumulación de sulfito como resultado de la sulfatorreducción inhibió la degradación. Con relación a esto, se ha reportado que la adición de Fe(OH)₃ en un sistema de sulfatorreducción, facilita el inicio de la degradación o la acelera una vez ya iniciada.

Robinson *et al.*, (1990) evaluó la sorción y la disponibilidad del tolueno en suelo orgánico con bacterias aclimatadas, obteniendo una degradación por abajo de los niveles cuantificables, en tan sólo 2 días.

En lo que respecta a las condiciones aerobias, Anid *et al.*, (1993) estudiaron la capacidad de los microorganismos nativos para degradar BTEX en columnas, utilizando oxígeno como aceptor final de electrones, obteniendo una eficiencia de eliminación para el tolueno por arriba del 95 %. Esta eficiencia coincide con los porcentajes obtenidos al adicionar óxido de magnesio, el cual bajo ciertas condiciones libera oxígeno, estimulando así a los microorganismos aerobios para que se acelere el proceso de biodegradación (Bianchi-Mosquera *et al.*, 1994).

3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental para la realización del trabajo, se divide en; búsqueda y montaje de técnicas, reconocimiento de los sitios afectados, recolección de las muestras y la caracterización física, química y microbiológica de las mismas, así como el desarrollo de las pruebas de biodegradación.

3.1 TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS SUELOS

Los estudios de biodegradación en suelos, requieren del conocimiento de las características físicas, químicas y microbiológicas del suelo afectado. Las técnicas empleadas fueron seleccionadas y montadas en el laboratorio¹, con base a las pruebas básicas realizadas en estudios edafológicos. En la Tabla 3.1 se muestra el listado de las técnicas, incluyendo información sobre la descripción y el fundamento de cada una de ellas.

Cabe hacer notar que para la determinación de cada parámetro se cita en algunos casos más de una referencia, y esto es porque se encontraron pequeñas diferencias en cuanto a la metodología.

¹ Se agradece al M.C Palacios y su equipo de trabajo del Departamento de Edafología del Instituto de Geografía UNAM, su valiosa cooperación y asesoría.

Tabla 3.1 Técnicas empleadas para la caracterización de los suelos

PARÁMETRO	TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	FUNDAMENTO	REFERENCIA
pH	Potenciométrica	Indica la acidez o la alcalinidad de soluciones acuosas, y es el resultado de las propiedades de disociación de los solutos.	Se basa en la medición del logaritmo negativo de la concentración de iones H^+ presentes en la solución del suelo	Aguilera, 1989 Allison <i>et al.</i> , 1985 Hendershot <i>et al.</i> , 1993 Jackson, 1982
Materia orgánica (mo)	Walkley y Black (modificado)	Son los residuos orgánicos de vegetales, animales, microorganismos vivos y muertos, así como contaminantes orgánicos.	Se obtiene mediante la oxidación del carbono orgánico con dicromato ácido, y titulación del dicromato remanente.	Tiessen <i>et al.</i> , 1993 Pulido <i>et al.</i> , 1992
Carbono orgánico (co)	Por cálculo	Es el principal nutrimento que representa del 48 al 58 % del peso total de la materia orgánica.	Se obtiene al dividir el valor de la materia orgánica entre 1.72 que es un factor de conversión tomando en cuenta el porcentaje que representa.	Tiessen <i>et al.</i> , 1993 Pulido <i>et al.</i> , 1992
Nitrógeno de nitratos ($N-NO_3^-$)	Colorimétrica	Los nitratos constituyen una de las formas asimilables del nitrógeno.	El proceso depende de la nitratación de la posición 6 del ácido fenol disulfónico en presencia de H_2SO_4 fumante.	Jackson, 1982
Nitrógeno amoniacal ($N-NH_4^+$)	Destilación	El amoniaco constituye la forma más fácilmente asimilable del nitrógeno.	El proceso se basa en una extracción, destilación y titulación de amoniaco.	Jackson, 1982
Nitrógeno Total (N_T)	Kjeldahl	Nitrógeno en forma orgánica e inorgánica (nitratos, nitritos, amonio intercambiable y amonio fijo).	Incluye la digestión de la muestra para convertir el nitrógeno en amonio y la cuantificación por destilación.	Jackson, 1982 McGill <i>et al.</i> , 1993 NOM DGN-AA-24-1984
Fósforo como fosfatos ($P-PO_4^{3-}$)	Bray P-1	Se encuentra en forma orgánica en la materia orgánica e inorgánica como compuestos de hierro, aluminio, calcio y flúor.	El fósforo es captado al reducirse los heteropolicomplejos de grupos molibdato en presencia de un agente reductor.	Jackson, 1982
Consumo de oxígeno	Manométrica	Es la cantidad de oxígeno requerida por las bacterias para oxidar la materia orgánica bajo condiciones aerobias.	Cambio de presión dentro de un recipiente cerrado, detectado por el desplazamiento de una columna de mercurio.	Moeller <i>et al.</i> , 1991
	Por cromatografía de gases (CG)		En un sistema cerrado, se cuantifica el oxígeno en la fase gaseosa.	

Tabla 3.1 Técnicas empleadas para la caracterización de los suelos (continuación)

PARÁMETRO	TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	FUNDAMENTO	REFERENCIA
Producción de CO ₂	Por cromatografía de gases (CG)	El CO ₂ es el principal producto de la degradación aerobia de la materia orgánica.	En un sistema cerrado, se cuantifica el CO ₂ en la fase gaseosa.	Jackson and Neralla, 1995
Porcentaje de humedad (% H)	Gravimétrico	Se conceptualiza como la proporción de masa de agua presente en una muestra.	Involucra el peso de la muestra húmeda y el peso de la muestra que se seca a 110°C durante 12 hrs.	Allison, <i>et al.</i> , 1985 Toop, 1993 Gardner, 1986
Capacidad de retención de agua	A presión atmosférica	El proceso se basa en la capacidad del suelo para retener el agua a presión atmosférica.	Una muestra de suelo se pone en contacto con un volumen medido de agua. Se mide el volumen de agua que filtra libremente.	Allison, <i>et al.</i> , 1985 Klute, 1986
Densidad real (ρ_p)	Con picnómetro	Se define como la densidad de las partículas sólidas colectivamente y se expresa como la relación de la masa total de las partículas sólidas de su volumen total.	Se obtiene la masa determinada por el peso y el volumen determinado al calcular la masa y la densidad del agua desplazada por la muestra.	Culley, 1993 Blake <i>et al.</i> , 1986 Paul <i>et al.</i> , 1989
Densidad aparente (ρ_m)	Con núcleos	Se conceptualiza como la masa del suelo por unidad de volumen.	Consiste en secar y pesar una muestra de suelo, cuyo volumen es previamente conocido.	Allison <i>et al.</i> , 1985 Culley, 1993 Blake <i>et al.</i> , 1986
Porosidad	Por cálculo	Es el espacio vacío entre las partículas del suelo.	Se obtiene a partir de la relación ρ_m/ρ_p que es la fracción del volumen total ocupado por los poros menos uno, se expresa en porcentaje.	Allison <i>et al.</i> , 1985 Carter <i>et al.</i> , 1993 Danielson <i>et al.</i> , 1986
Conductividad	Conductimétrica	Es la medida de la capacidad de una solución para conducir corriente eléctrica.	Es la inversa de la resistencia expresada en ohmios.	Jackson, 1982 Tchobanogglus <i>et al.</i> , 1987
Sólidos totales (ST)	Gravimétrica	Corresponde al peso de la muestra seca.	La pérdida de peso se registra después de secar la muestra a 115°C por 12 hrs	APHA, 1992
Sólidos volátiles (SV)	Gravimétrica	Corresponden a la pérdida de peso de la muestra seca después de su ignición.	La diferencia de peso se toma después de estar 1 h a 550°C. Tomando como referencia a los sólidos totales.	APHA, 1992
Sólidos fijos (SF)	Gravimétrica	Corresponden al peso de aquellos residuos que quedan después de la ignición de la muestra seca.	Es el peso del material que queda después de la ignición durante 1 h a 550°C.	APHA, 1992

Tabla 3.1 Técnicas empleadas para la caracterización de los suelos (continuación)

PARÁMETRO	TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	FUNDAMENTO	REFERENCIA
Granulometría	Por tamices	El material seco se va separando de acuerdo al tamaño de grano.	Consiste en pasar una muestra de suelo a través de una serie de tamices y pesar el material retenido en cada uno.	Bowles, 1992 Gee <i>et al.</i> , 1986 Engineering, 1965
Textura	Con hidrómetro	Es la composición porcentual de los separados; arenas, limos y arcillas.	Consta de la dispersión del suelo a partir de un agente dispersante, y el fraccionamiento por sedimentación de los diferentes tipos de material.	Velázquez <i>et al.</i> , 1974
Color	Código Munsell	Comparación del suelo en seco y en húmedo con las tablas de color de Munsell.	Refracción de la luz en las partículas.	Munsell, 1992
Bacterias heterótrofas	Cuenta en medio sólido	Se establece el número de bacterias que crecen en un medio de cultivo complejo por unidad de masa de suelo.	Se emplea dilución serial y el plaqueo en un medio agar, se hace el conteo de colonias en las diluciones apropiadas. Se expresa como ufc/g suelo.	Germida, 1993 Cullimore, 1992
Bacterias dagraadoras	Cuenta en medio sólido	Se establece el número de bacterias capaces de crecer en un medio mineral con el contaminante orgánico como única fuente de carbono.	Se emplea la dilución serial y el plaqueo en un medio agar, se hace el conteo de colonias en las diluciones apropiadas. Se expresa como ufc/g suelo.	Desarrollada en este trabajo
Bacterias totales	Microscopía (epifluorescencia)	Número de bacterias viables y no viables por unidad de masa.	Se basa en la reacción fluorescente de color rojo-anaranjado con el ARN y color verde en asociación con el ADN.	APHA, 1992 Germida, 1993

3.2 DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS

Las muestras de suelo se obtuvieron de dos sitios que presentaban contaminación con gasolina. El Sitio 1 se encuentra en Tamaulipas y el Sitio 2 en Baja California Norte.

3.2.1 Sitio 1

En el Sitio 1, se detectó una fuga en los alrededores de una terminal de almacenamiento de combustibles. De este sitio se recolectaron dos muestras (S1a y S1b) y un control (CS1), el cual fue tomado fuera de la zona de contaminación (Fig. 3.1).

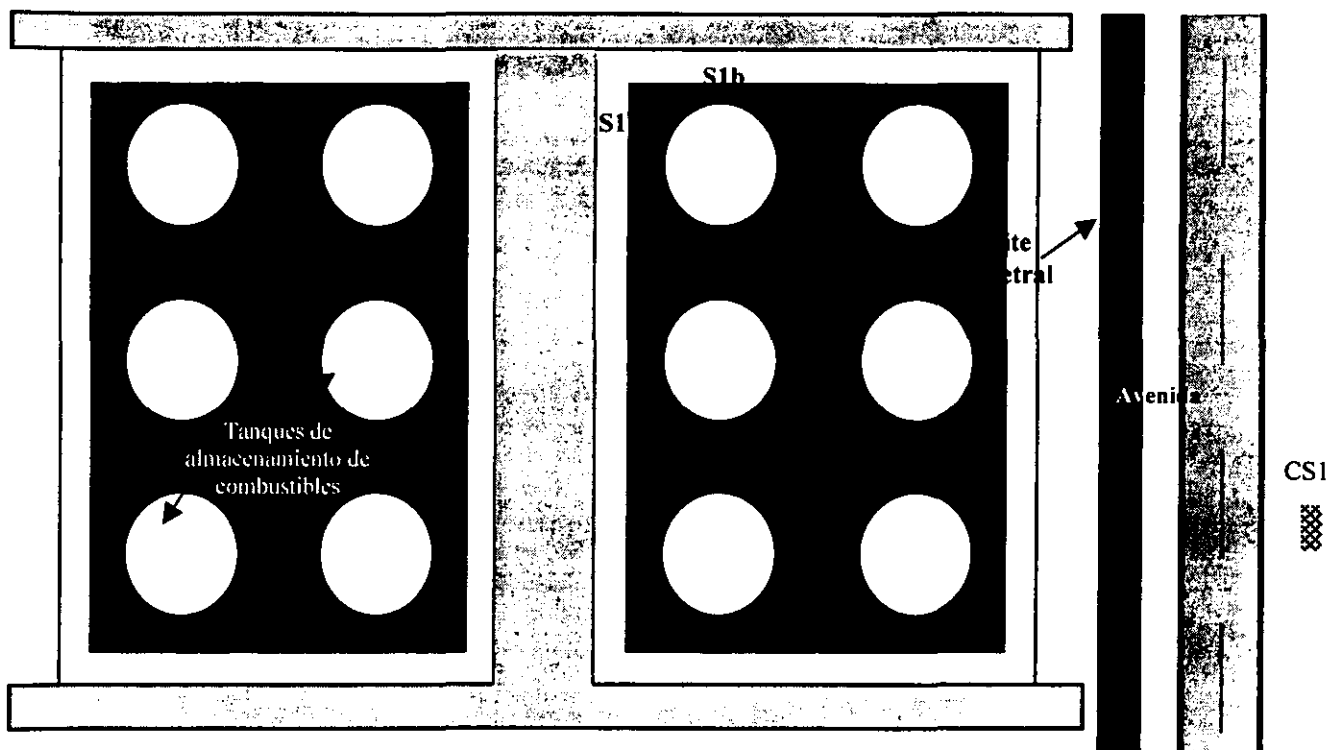


Fig. 3.1. Localización de los puntos de muestreo en el Sitio 1

3.2.2 Sitio 2

En este sitio, se detectó una fuga accidental en los alrededores de un poliducto de transporte de combustible. La fuga se localizó en la pendiente de una loma, por lo que el combustible tendió a migrar ladera abajo, abarcando una área aproximada de 400 m² (Fig. 3.2). Se eligieron dos puntos de muestreo (S2a y S2b). En virtud de que los dos sitios elegidos presentaron características muy diferentes, se decidió tomar una muestra control para cada sitio (CS2a y CS2b, respectivamente). El nivel freático se encontró a 56 cm de profundidad, con un pH de 6.8 y una temperatura de 27.5°C.

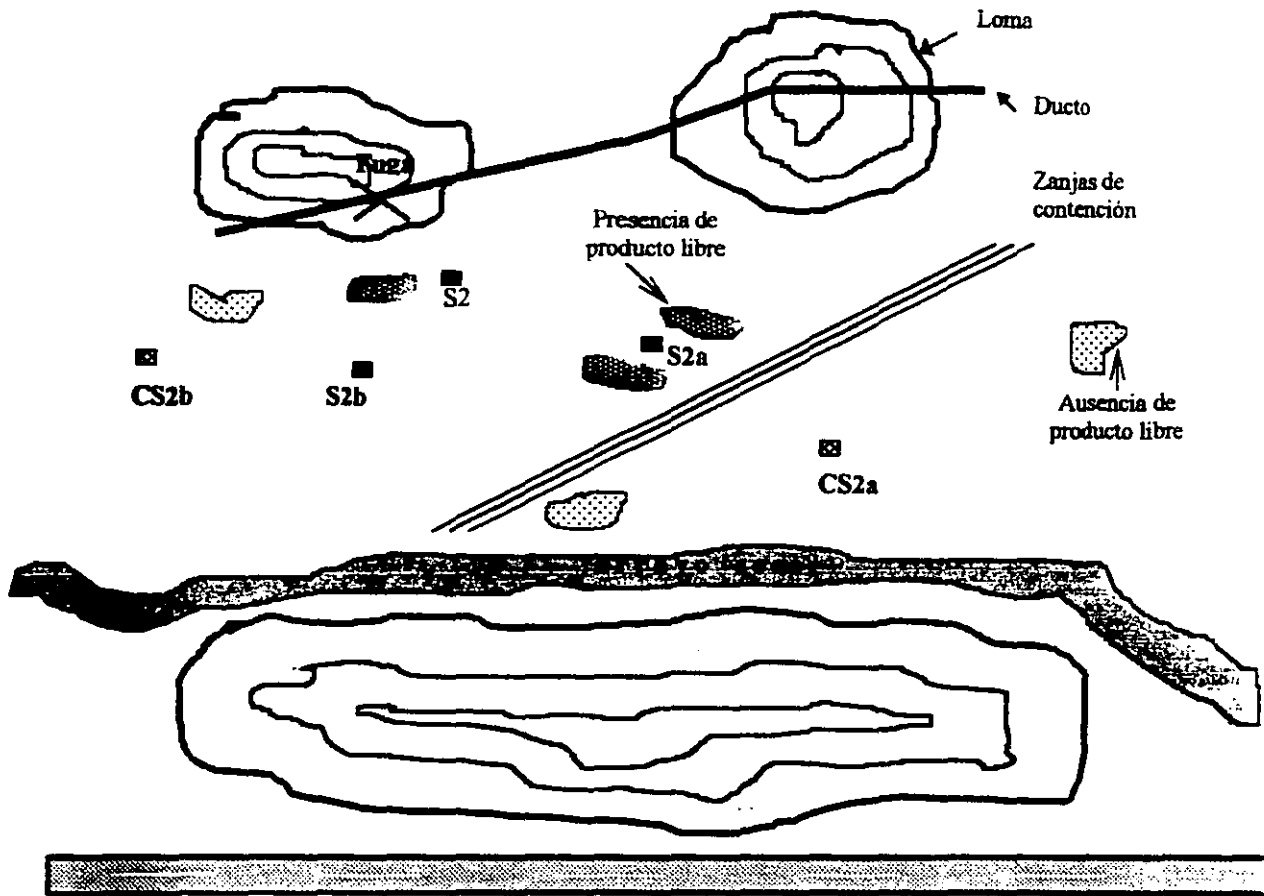


Fig. 3.2. Diagrama de los puntos de muestreo del Sitio 2

3.3 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras de suelo contaminado no alteradas (físicamente), se obtuvieron mediante un nucleador manual y cartuchos de acetato de 45.5 cm de largo y 2.2 cm de diámetro. Las muestras de suelo contaminado alteradas se obtuvieron a partir de la excavación de pozos mediante el uso de una pala plana, y se colocaron en frascos de vidrio de 500 g con sello hermético. Las muestras de suelo no contaminado se obtuvieron mediante excavación.

Todas las muestras fueron selladas y mantenidas en frío hasta su traslado al laboratorio en donde se almacenaron en un cuarto frío a 4°C por no más de 15 días para su procesamiento.

3.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Las muestras recolectadas de cada sitio fueron divididas para su análisis en tres partes, tomando como base el tipo de prueba al que sería sometida.

1. Para las determinaciones físicas y químicas, el suelo se secó a temperatura ambiente, no sin antes realizar el análisis de humedad correspondiente para hacer las correcciones pertinentes. Su almacenamiento fue en frascos de vidrio a temperatura ambiente. Para la determinación de la densidad aparente se utilizaron núcleos de tubería de PVC de 2 pulg de diámetro y 4 cm de largo con un extremo esmerilado; el volumen de estos núcleos fue de 100 cm^3 . Los núcleos fueron introducidos en los sitios de muestreo para extraer los núcleos del suelo, manteniendo los extremos bien sellados con papel aluminio.
2. Para las determinaciones microbiológicas, las muestras se obtuvieron a partir de los núcleos en forma aséptica (Fig. 3.3), y se almacenaron en viales de teflón a 4°C hasta su procesamiento. Cabe aclarar que de los núcleos también separaron submuestras para la caracterización física y química.
3. Para el desarrollo de las pruebas de biodegradación, las muestras se almacenaron a 4°C tal como se recolectaron para evitar una posible alteración de condiciones originales.



Fig. 3.3 Corte de núcleos para las pruebas microbiológicas

3.4.1 Caracterización física y química

La medición de pH real, se realizó en una suspensión 1:2 (suelo-agua destilada), para el pH potencial se empleó la misma relación, sustituyendo el agua destilada por una solución de cloruro de calcio 0.01M. Las lecturas se tomaron con un potenciómetro Conductronic pH20 con electrodo de vidrio Corning G-p Combo W/RJ, el cual se introdujo en la solución obtenida después de 30 min de agitación y 1 hora de reposo (Aguilera, 1989; Allison *et al.*, 1985; Hendershot *et al.*, 1993; Jackson, 1982). Las soluciones obtenidas para la medición de pH real se emplearon también para medir la conductividad eléctrica, mediante un conductímetro conductronic PC18 (Jackson, 1982; Tchobanoglus *et al.*, 1987)

La cuantificación de la materia orgánica se realizó por el método indirecto de Walkley y Black modificado, el cual implica una combustión húmeda con ácido crómico y una fuente de calor externa. En este caso las muestras se colocaron en matraces de 125 ml con tapón de rosca y se calentaron por 30 min a 150°C en un horno Felisa Mod. 243. Para la titulación se empleó sulfato ferroso amoniacal 0.5N y difenilamina como indicador (Tiessen *et al.*, 1993; Pulido *et al.*, 1992).

El carbono orgánico se obtuvo por cálculo a partir de los valores obtenidos para la materia orgánica. Tomando en cuenta que el carbono orgánico representa del 48 al 58 % del peso total de la materia orgánica, se utilizó la siguiente fórmula: % carbono orgánico = (% materia orgánica) x (0.58) (Tiessen *et al.*, 1993; Pulido *et al.*, 1992).

La determinación de nitratos se obtuvo con un método colorimétrico, en el cual la respuesta positiva se confirma con una coloración amarilla. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Milton Roy 20D a una longitud de onda de 420 nm (Jackson, 1982).

El nitrógeno amoniacal se extrajo con una solución de cloruro de sodio 10 % (1.7 N) acidificada con ácido clorhídrico hasta un pH de 2.5. La destilación se realizó en un destilador BÜCHI 323 y el producto se recibió en una solución de ácido bórico con indicador mixto (una mezcla de verde de bromocresol - rojo de metilo en una relación 5:1) a pH 5. Para titular se empleó ácido sulfúrico 0.01N (Jackson, 1982).

El nitrógeno total se determinó a partir de la digestión de las muestras en presencia de una mezcla de catalizadores (sulfato de potasio y sulfato de cobre en relación 10:1), utilizando un equipo de digestión BÜCHI 435 con extractor de humos. Posteriormente se realizó la digestión en la misma forma que se hizo para el nitrógeno amoniacal (Jackson, 1982; NOM DGN-AA-24-1984).

El contenido de fósforo se evaluó a partir del método de Bray P-1, que es una prueba colorimétrica en la que el color azul indica la presencia de fosfatos. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro Milton Roy 20D a una longitud de onda de 660 nm (Jackson, 1982).

El porcentaje de humedad se realizó con 2 a 5 g de muestras de suelo colocadas en crisoles de porcelana de 100 ml. El secado se hizo en un horno Felisa Mod. 243 a 105°C, manteniendo las muestras por un periodo mínimo de 24 horas (Allison *et al.*, 1985; Toop, 1993; Gardner, 1986).

La capacidad de retención de agua se evaluó a presión atmosférica de la Ciudad de México (585 mmHg). Para ello se utilizó un embudo de filtración rápida y papel filtro Whatman GF/A de 9 cm de diámetro; en el cual se colocaron 100 g de suelo seco saturado con 100 ml de agua. El volumen del agua recuperada se midió hasta que dejó de gotear agua por el embudo (Allison *et al.*, 1985; Klute, 1986).

La densidad real se determinó con picnómetros de vidrio de 25 ml con capilar, los pesos se registraron en una balanza analítica OHAUSAGA 110. Mientras que para la densidad aparente, se utilizaron núcleos de PVC. El secado se realizó en un horno Felisa Mod. 243 a 105°C y los pesos se registraron en una balanza analítica OHAUSAGA Galaxy™ 1200 (Culley, 1993; Blake *et al.*, 1986; Paul *et al.*, 1986).

La porosidad se obtuvo por cálculo a partir de la densidad real y aparente, mediante la siguiente ecuación: % porosidad = $1 - (\rho_m/\rho_p) \times 100$ (Allison *et al.*, 1985; Carter *et al.*, 1993; Danielson *et al.*, 1987).

Los sólidos volátiles se calcularon por diferencia a partir de la muestra que se sometió a calcinamiento en una mufla Lindberg SIB Tipo 51894 CTD a 550°C para obtener los sólidos fijos (APHA, 1992).

La textura de las muestras se obtuvo con el método del hidrómetro (hidrómetro estándar ASTM No 152H con escala Bouyoucos g/l). La dispersión de las muestras se realizó con hexametáfosfato de sodio al 0.4 N y agitación en un batidor comercial durante 10 min. Las lecturas se realizaron a los 40 segundos y a los 160 minutos.

El análisis granulométrico se llevó a cabo utilizando un juego de mallas DAVIS, con especificaciones ASTM-AASHO No.4 (4.76 mm), No.10 (2.00 mm), No.20 (0.84 mm), No.40 (0.42 mm), No.60 (0.25 mm), No.100 (0.149 mm) y No.200 (0.074 mm) (Bowles, 1992; Engineering, 1965).

3.4.2 Caracterización microbiológica

La Cuenta de bacterias totales se realizó mediante la técnica de epifluorescencia, utilizando anaranjado de acridina (Sigma 46005) como colorante y para la cuantificación un microscopio American Optical One-Ten con un lente de aumento de 40x y 100x (APHA, 1992; Germida, 1993).

El conteo de bacterias heterótrofas se realizó mediante la técnica tradicional de conteo en placa, empleando como medio de crecimiento el agar cuenta en placa (Merck 1.05463), conteniendo: peptona de caseína (5.0 g/l), extracto de levadura (2.5 g/l), D(+) Glucosa (1.0 g/l) y agar-agar (14 g/l). Las muestras se incubaron a 26°C en una incubadora New Brunswick Scientific modelo G24, por un tiempo de 72 h (Germida, 1993; Cuillimore, 1992).

La cuenta de bacterias degradadoras se realizó empleando una técnica desarrollada en el propio laboratorio, mediante el uso de recipientes de sello hermético utilizando medio mineral sólido, conteniendo: 3.8 g de KH_2PO_4 , 12.5 g de K_2HPO_4 , 1.0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y 1 ml de solución de sales por litro. La solución de sales consta de la mezcla de 4 g de MgSO_4 , 0.2 g de NaCl, 0.2 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 g de MnSO_4 y 0.2 g de CaCl en 100 ml, esterilizada por separado. El tolueno y la mezcla de BTX se agregaron sobre el agar (30 μl). Los recipientes se incubaron a 26°C en una estufa Felisa Modelo TE-142A, durante un periodo de 7 a 10 días.

3.4.3 Caracterización de la actividad microbiana

La actividad microbiana se evaluó mediante la cuantificación del bióxido de carbono producido y el oxígeno consumido, en adición al seguimiento de la disminución de la concentración de sustrato a partir de las pruebas de biodegradación. En el primer caso se emplearon botellas serológicas de 150 ml con 20 g de suelo, selladas con tapones planos con cubierta de teflón y arillos metálicos; se realizaron mediciones consecutivas de volúmenes de 0.5 ml de la fase gaseosa en un cromatógrafo de gases Fisher Gas Partitioner modelo 1200, de doble columna (Poropak Q y malla molecular 5A), con detector de conductividad térmica (TCD); equipado con un registrador Fisher 5000.

El consumo de oxígeno se cuantificó por la disminución de la presión en un sistema cerrado (Botella ámbar de 500 ml), adaptado con un manómetro de mercurio. Se colocaron en el interior 40 g de suelo y un tubo de ensaye que contenía una solución de hidróxido de potasio 0.24 y 0.48 N para capturar el CO_2 producido dentro del sistema. Se tomaron lecturas del desplazamiento de la columna de mercurio, en mm.

Adicionalmente, cuando se contó con una columna Supelco Inc. Molecular Sieve 13x11"3/16" Al., el consumo de O₂ se midió simultáneamente a la producción de CO₂, en el mismo cromatógrafo de gases descrito anteriormente.

3.5 EXPERIMENTOS DE BIODEGRADACIÓN

3.5.1 Establecimiento de las condiciones para los experimentos de biodegradación

Unidad experimental.- Los experimentos se llevaron a cabo a nivel de microcosmos. Se probaron tres unidades experimentales, con el fin de evaluar su funcionalidad y la presencia de fugas, que pudieran resultar en mediciones erróneas. Las unidades utilizadas fueron:

- Unidad 1.- Botella ámbar de rosca inviolable con capacidad de 125 ml, con válvulas mininert de 24 mm CR5614163 (Fig. 3.4.a).
- Unidad 2.- Botella ámbar de rosca inviolable con capacidad de 125 ml, con tapones planos con cubierta de teflón gris 17 x 120 mm (WHEATON WH-5224100-175) y tapas de baquelita perforadas (Fig. 3.4.b).
- Unidad 3.- Botellas serológicas de 150 ml con tapones planos con cubierta de teflón gris 17 x 120 mm (WHEATON WH-5224100-175) sellados con arillos metálicos (Fig. 3.4.c).

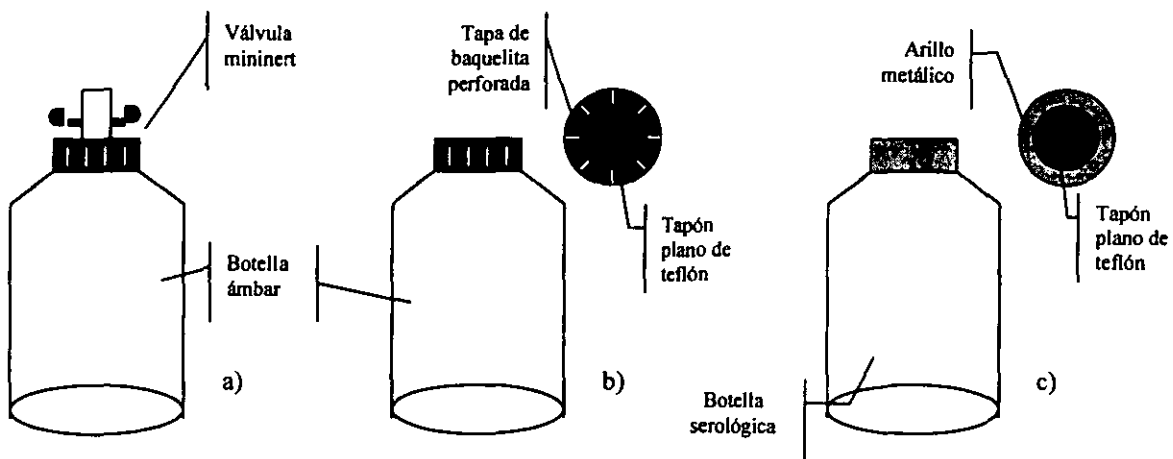


Fig. 3.4 Unidades experimentales probadas

Todos los recipientes se sometieron previamente a un lavado con disolventes orgánicos de polaridad ascendente para quitar cualquier traza de materia orgánica que pudiera interferir (metanol, acetona y hexano), se dejaron secar a 250°C durante 2 horas.

Microcosmos.- Los microcosmos se montaron empleando 20 g de suelo ajustado la humedad a 20 % para el suelo del Sitio 1 y 15 % para el suelo del Sitio 2, con base a la capacidad de retención de agua de los suelos a partir de una pasta de saturación. La temperatura de incubación se estableció a 26°C. Los controles de fuga fueron previamente esterilizados por 30 min tres veces a 120°C y 15 psi.

Medición de substratos residuales.- Para medir la respuesta de degradación se empleó un cromatógrafo de gases VARIAN modelo 3350, equipado con columna capilar J&W, DB-1 de 60 m de longitud y 0.25 mm de diámetro interno, y como fase estacionaria 100 % metilsilicon con un grosor de 1 µm. El detector de ionización de flama (FID) fue alimentado con una mezcla de aire e hidrógeno, el nitrógeno se utilizó como gas auxiliar y helio como gas acarreador.

Para determinar las condiciones de operación en el cromatógrafo se realizaron pruebas en las cuales se tomó en cuenta el incremento de temperatura, el volumen de inyección, y la atenuación.

Se empleó una jeringa Pressure-Lok serie A (0.29"x 0.12" x 2.25") con un volumen de 250 µl, fabricada por VICI, Inc., Baton Range, LA, USA.

Estándar interno.- Se probaron varios compuestos como; octanol, fenol, valerato, alcohol butílico, propanol y butanol con puntos de ebullición muy cercanos a los BTEX, con el fin de seleccionar el que diera la mejor respuesta. El ciclooctano fue el que dio mejores resultados con un tiempo de retención de 26.4 min.

Tiempo y temperatura para la volatilización de los BTEX (head-space).- Antes de establecer las condiciones para la volatilización se permitió un tiempo de equilibrio de 72 h una vez que los substratos se adicionaron al suelo. Posteriormente se realizaron pruebas a diferentes tiempos (30, 45, 60, 75 y 90 min.) y temperaturas (60, 65, 70, 75 y 80°C). Las condiciones más favorables, se determinaron con base en la mayor recuperación. Las condiciones que finalmente se establecieron fueron a 65°C por 60 min.

3.5.2 Aclimatación de cultivos

Con el fin de obtener un cultivo con capacidad degradadora de los BTX se realizó una aclimatación de la biomasa nativa a partir de las muestras originales, si bien estos microorganismos pudieran ya estar aclimatados a los hidrocarburos en estudio, con este paso se lograría estimularlas para obtener una mayor cantidad de biomasa con capacidad de degradación.

Se empleó inicialmente el medio reportado por Germida (1993), y posteriormente el medio mineral reportado por Robinson *et al.*, (1990), con el fin de forzar más la selectividad. Se aplicó tolueno en forma directa, para observar la respuesta de los microorganismos, a concentraciones crecientes y posteriormente una mezcla de BTX.

Por otra parte como control positivo se manejaron las cepas de colección NRRL 14484 (*Bacillus gordonae*), ATCC 33015 (*Pseudomonas putida*) y ATCC51349 (*Rhodococcus zopfii*), también se incluyeron dos preparaciones comerciales de origen extranjero identificadas como KM y WM, con capacidad para degradar hidrocarburos.

3.5.3 Experimentos de biodegradación

Modalidades.- Las pruebas se realizaron empleando las siguientes modalidades:

- * suelo inalterado
- * suelo inalterado adicionado de nutrimentos
- * suelo inalterado adicionado de bacterias aclimatadas
- * suelo inalterado adicionado de nutrimentos y bacterias aclimatadas

Los experimentos de biodegradación para tolueno, se realizaron bajo las condiciones que se presentan en la Tabla 3.2.

Las pruebas de biodegradabilidad, para BTX así como las de seguimiento del consumo de oxígeno y producción de bióxido de carbono, mediante su medición por cromatografía de gases (CG), se montaron bajo las condiciones que se presentan en la Tabla 3.3.

Nutrimentos.- Se adicionaron fósforo y nitrógeno amoniacal, empleando el mismo medio mineral en el que se realizaron las aclimataciones (Robinson *et al.*, 1990), pero incrementando la concentración de ingredientes al doble.

Biomasa.- Se emplearon los cultivos que resultaron del proceso de aclimatación, procedentes de los suelos de cada sitio.

Suelo inalterado.- En el caso de las muestras del Sitio 1 se mezclaron y se formó una sola muestra compuesta (S1c); en el caso del Sitio 2 se trabajaron por separado la muestra S2a y la S2b.

En este caso los controles negativos estériles fueron omitidos, ya que se pretendió trabajar con posibles condiciones reales. De tal forma que cada experimento contó con su propio patrón de comparación, basado principalmente en la adición o no de inóculo y nutrientes

Tabla 3.2 Condiciones para los experimentos de biodegradación de tolueno con el suelo del Sitio 1

Experimento Parámetros	Exp. 1		Exp. 2		Exp. 3		Exp. 4	
	S1c + T		S1c + T + I		S1c + T + N		S1c + T + N + I	
	PB	Cons. O ₂	PB	Cons. O ₂	PB	Cons. O ₂	PB	Cons. O ₂
Suelo (g)	20	40	20	40	20	40	20	40
% Humedad natural	10.26		10.26		10.22		10.22	
Ajuste de humedad a 20 % con	2	4	2	4	2	4	2	4
* Agua (ml)	2	4	1	2	1	2	---	---
* Sol. Mineral ¹ (ml)	---	---	---	---	1	2	1	2
Nutrientos* (mg/kg)								
KH ₂ PO ₄			---		380			
K ₂ HPO ₄			---		1250			
(NH ₄) ₂ HPO ₄			---		100			
MgSO ₄ •7H ₂ O			---		8.1226			
NaCl			---		0.2			
FeSO ₄ •7H ₂ O			---		0.2			
MnSO ₄ •H ₂ O			---		0.2238			
CaCl ₂			---		0.2			
tolueno (μl)	20	40	20	40	20	40	20	40
(mg/kg)	866.9	866.9	866.9	866.9	866.9	866.9	866.9	866.9
Inóculo (ml)	---		1	2	---		1	2
Absorbancia del inóculo								
540 nm	---		0.526		---		0.524	
620 nm			0.466				0.430	
Concen. final de ciclooctano (mg/kg)	10	---	10	---	10	---	10	---
Concentración de Hidróxido de bario (N) (10 ml)	---	0.24	---	0.24	---	0.48	---	0.48

¹ Medio mineral reportado por Robinson *et al.* 1990, con el doble de la concentración.

T: tolueno; S1c: suelo del Sitio 1, muestra compuesta; I: Inóculo de bacterias aclimatadas; N: nutrientes.

PB: prueba de biodegradación (tolueno residual y producción de bióxido de carbono).

Cons. O₂: consumo de oxígeno.

Tabla 3.3 Condiciones para los experimentos de biodegradación de BTX y seguimiento del consumo de O₂ y producción de CO₂

Experimento (suelo)	Exp. 7	Exp. 8	Exp. 5	Exp. 9	Exp. 6	Exp. 10
	S2a	S2a	S1c	S2a	S1c	S2a
Parámetros	BTX	BTX + I	BTX + N		BTX + N + I	
Suelo (g)	20	20	20		20	
% Humedad natural	7.97	7.97	10.2	7.5	10.2	7.5
Ajuste de humedad a 20% para S1c 15% para S2a			2	1.5	2	1.5
* Agua (ml)	1.4	0.4	1	0.5	---	---
* Sol. Mineral ¹ (ml)	---	---	1	1	1	1
Nutrientos* (mg/kg)						
KH ₂ PO ₄	---	---		380		
K ₂ HPO ₄	---	---		1250		
(NH ₄) ₂ HPO ₄	---	---		100		
MgSO ₄ •7H ₂ O	---	---		8.1226		
NaCl	---	---		0.2		
FeSO ₄ •7H ₂ O	---	---		0.2		
MnSO ₄ •H ₂ O	---	---		0.2238		
CaCl ₂	---	---		0.2		
Mezcla BTX (μl)	23.9	23.9	24	39.9	24	39.9
(mg/kg)	1048.03	1048.03	1051.9	1749.6	1051.9	1749.6
Inóculo (ml)	---	1	---	---	1	0.5
Absorbancia del inóculo						
540 nm		0.56			0.526	0.930
620nm		0.45			0.496	0.796
Concen. final de ciclooctano (mg/kg)	10	10	10		10	

¹ Medio mineral reportado por Robinson *et al.* 1990, con el doble de la concentración.

BTX: benceno, tolueno, xilenos (isómeros *meta*, *para* y *orto*).

I: Inóculo de bacterias aclimatadas del suelo correspondiente; N: nutrientes.

S1c: suelo del Sitio 1, muestra compuesta; S2a: Suelo del Sitio 2 muestra a.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS

Del Sitio 1 (terminal de almacenamiento) se analizó un control (CS1) no contaminado (Fig. 3.1) y dos muestras contaminadas (S1a y S1b). Del Sitio 2 (fuga de un poliducto), se analizaron dos muestras contaminadas (S2a y S2b) y dos controles no contaminados (CS2a y CS2b), uno para cada muestra, debido a las diferencias percibidas en campo (Fig. 3.2).

4.1.1 Caracterización física

El color es una de las características más perceptibles del suelo, y es importante porque está relacionado con el contenido de materia orgánica, el clima, el drenaje y la mineralogía del suelo.

En la Tabla 4.1, se presentan las determinaciones del color tanto en seco como en húmedo. En estos suelos, el color no está determinado por la cantidad de materia orgánica, ya que los porcentajes obtenidos para ambos sitios están por abajo del 5 % (Tabla 4.5), porcentaje al cual según Thompson *et al.*, (1982) la materia orgánica ejerce una influencia sobre el color al recubrir las partículas del suelo. Por lo que, la fracción inorgánica (sólidos fijos) es la que está ejerciendo la mayor influencia sobre el color, al constituir más del 90 % del peso total (Tabla 4.4).

En el Sitio 1, el suelo control (CS1) y la muestra a (S1a) presentan un color pardo, mientras que el de la muestra b (S1b) el color se oscurece hacia tonos grises. La diferencia entre la determinación en seco y en húmedo es mínima, debido al bajo contenido de materia orgánica que presenta. Tampoco existe una diferencia marcada entre el color del suelo control y las muestras, si bien la muestra S1b difiere un poco, se puede asumir que es debido a un aumento en la porción coloidal, la cual pudiera estar revistiendo a las partículas más gruesas confiriéndoles esa coloración grisácea (Gilbert, 1967); al ser dicha fracción el reflejo de un aumento en el contenido de limo y arcilla con respecto al control CS1 y a la muestra S1a (Tabla 4.2).

Cabe mencionar que en éste sitio, se observó la presencia de motas grandes con poca abundancia y un contraste distinto con respecto al color del suelo en campo, las cuales coincidían con la presencia de una textura más fina y con la acumulación de olor a gasolina más penetrante, por lo que el contenido de arcilla pudiera estar favoreciendo el fenómeno de adsorción. Asimismo son el indicativo de zonas de aireación alternadamente buenas y malas.

Tabla 4.1 Color de las muestras de suelo

Parámetro	Sitio 1			Sitio 2			
	CS1	S1a	S1b	CS2a	S2a	CS2b	S2b
Profundidad (cm)	15 - 30	40 - 60	30 - 50	50	90	50	50
Color en seco	10YR6/3 Pardo Pálido	10YR7/3 Pardo muy Pálido	10YR6/2 Gris ligeramente pardiso	10YR6/3 Pardo pálido	2.5Y5/4 Pardo olivo claro	10YR6/4 Pardo amarillento claro	2.5Y4/2 Pardo grisáceo oscuro
Color en húmedo	2.5Y4/4 Pardo olivo	2.5Y5/4 Pardo olivo Claro	2.5Y5/2 Pardo grisáceo	2.5Y4/4 Pardo olivo	2.5Y3/2 Pardo grisáceo muy oscuro	2.5Y4/2 Pardo grisáceo oscuro	2.5Y3/2 Pardo grisáceo muy oscuro

CS1: Control Sitio 1

S1a, S1b: Muestra a y b del Sitio 1

CS2a, S2a: Control y muestra a del Sitio 2

CS2b, S2b: Control y muestra b del Sitio 2

En el Sitio 2, predomina el color pardo, aunque este se presentó una mayor variación en el tono; desde uno claro predominante en la determinación en seco, hasta uno muy oscuro con la determinación en húmedo. Esto hace suponer la posible existencia de una mayor cantidad de feldspatos que originan coloraciones grisáceas (Don *et al.*, 1992) y algunos óxidos férricos con grados variables de hidratación que dan colores castaños y amarillos (Gilbert, 1967), ya que como se mencionó anteriormente el contenido de materia orgánica no es muy elevado, como para ejercer una gran influencia sobre el color.

Por otra parte, se sabe que los suelos color castaño son comunes bajo condiciones de percepción limitada de precipitaciones pluviales y oscilaciones bruscas de temperatura diarias y estacionales. Como resultado, las condiciones hidrotérmicas en estos suelos en el curso del año no son favorables para la actividad microbiana,

a pesar de que los suelos color castaño parecen ser bastante ricos en microorganismos (Kananova, 1982). Estas condiciones, si bien se presentan con mayor amplitud en el Sitio 1, las condiciones del Sitio 2 no son en mucho diferentes. Asimismo, hay que tener en cuenta que al presentar colores claros no absorben gran cantidad de calor y por lo tanto la pérdida de humedad por evaporación se puede ver disminuida, lo que sería en un momento dado, favorable para la actividad microbiana.

La textura es tal vez la característica más permanente e importante del suelo y como se puede ver en la Tabla 4.2, las texturas que presentan los suelos están determinadas por la fracción de arena, con valores por arriba del 70 %; exceptuando a la muestra S2b del Sitio 2, cuya textura está influenciada por la fracción de limos al representar casi el 50 % de su composición.

La clase textural arenas, indica que son suelos muy permeables al aire, al agua y a las raíces, sin embargo, se ven limitados por su bajo poder de retención de agua y por su deficiente capacidad de almacenamiento de nutrimentos. En general son pobres y de escasa productividad (López *et al.*, 1987, Thompson *et al.*, 1982). La clase textural franco arenoso indica, que son suelos medios, con las mismas deficiencias que los arenosos, pero más atenuadas.

Tabla 4.2 Texturas y tipo de material presente en las muestras de suelo

Material	Sitio 1			Sitio 2			
	CS1	S1a	S1b	CS2a	S2a	CS2b	S2b
Textura	Arena	Franco arenoso	Franco arenoso	Arena	Arena	Arena	Franco limoso
% Arena	93.2	77.2	70.0	97.2	87.2	97.2	43.2
% Limo	2.56	8.56	13.0	2.56	8.56	2.56	48.56
% Arcilla	4.24	14.24	17.0	0.24	4.24	0.24	8.24

CS1: Control Sitio 1

S1a, S1b: Muestra a y b del Sitio 1

CS2a, S2a: Control y muestra a del Sitio 2

CS2b, S2b: Control y muestra b del Sitio 2

En el caso de la muestra S2b, su textura franco limoso le confiere condiciones más favorables para el desarrollo microbiano, ya que el incremento en el porcentaje de limo favorece gradualmente la formación de arcilla, y con éste proceso de meteorización se liberan los nutrimentos presentes en la estructura mineral.

El porcentaje de humedad representa al contenido de agua presente en las muestras en el momento de su recolección, ya que el agua que interesa es aquella que favorece los procesos edafogénicos, la actividad y cambios complejos que originan la población microbiana, es decir, el agua disponible. Al analizar las muestras del Sitio 1, se observa que entre ellas existe una diferencia altamente significativa; el control CS1

presentó la más baja humedad con un valor de 4.27 % (Tabla 4.3); esto debido a su textura de tipo arena, la cual caracteriza en general a los suelos secos permitiendo una filtración rápida a través de ellos (Gilbert, 1967). Ahora bien, no se debe olvidar que el porcentaje de humedad varía con las condiciones climáticas presentes en el sitio. Las muestras S1a y S1b presentaron valores de 13.19 y 18.87 %, respectivamente; estas cifras son cercanas al porcentaje establecido para el desarrollo de la actividad microbiana en este suelo, que fue de 20 %; el cual se infirió a partir de la medición del porcentaje de saturación, que resultó ser de 15 %, sin embargo, con la presencia del contaminante se vió favorecida la agregación de las partículas del suelo y se decidió incrementar este valor hasta 20 %.

Tabla 4.3 Porcentaje de humedad y capacidad de retención de agua en las muestras de suelo

Parámetro	Sitio 1			Sitio 2			
	CS1	S1a	S1b	CS2a	S2a	CS2b	S2b
Profundidad (cm)	15 - 30	40 - 60	30 - 50	50	90	50	50
% humedad (%CV)	4.27 (8.51)	13.19 (5.92)	18.87 (9.13)	1.26 (5.24)	5.67 (2.59)	4.23 (2.79)	26.66 (5.14)
Capacidad de retención de agua (ml/kg)	271.6	276.5	345.1	334.2	222.6	52.2	463.6

CS1: Control Sitio 1
S1a, S1b: Muestra a y b del Sitio 1

CS2a, S2a: Control y muestra a del Sitio 2
CS2b, S2b: Control y muestra b del Sitio 2

En el caso del Sitio 2, el porcentaje de humedad de las muestras presenta de igual forma una diferencia significativa entre sí; e incluso entre las muestras y su respectivo control. La muestra S2b fue la que presentó el mayor porcentaje de humedad como resultado del incremento en el porcentaje de limo y arcilla. El ajuste de humedad con base en las pruebas de porcentaje de saturación, se estableció en 15 %. Es importante resaltar que en este sitio el nivel freático es muy somero, 56 cm de profundidad, y si bien los materiales gruesos son buenos conductores de agua cuando están en contacto directo con la provisión de la misma, el movimiento capilar se ve limitado debido a los espacios porosos tan grandes que presentan los suelos arenosos (Thompson *et al.*, 1982).

Es importante aclarar que los valores bajos en humedad no son un indicativo directo de que la biodegradación no tenga cabida, lo que sí, es que puede verse un poco limitada.

La retención de humedad aportada por las lluvias y el riego se debe al carácter granular y coloidal del suelo, siendo este ultimo el que determina el comportamiento del agua, asimismo intervienen otros factores como la profundidad y estructura del suelo; esto hace evidente que los suelos difieran mucho en cuanto a su capacidad de retención (Gilbert, 1967; Thompson *et al.*, 1982).

En el caso del Sitio 1, las variaciones no son tan evidentes como en el caso del Sitio 2 en donde la diferencia entre el valor más alto (463.6 ml/kg) y el más bajo (52.2) es bastante considerable y se atribuye sobre todo a la clase textural de cada muestra. Asimismo, en las muestras ambos suelos, no se vió favorecida la retención del agua debido al bajo contenido de materia orgánica, la cual en altos porcentajes afecta indirectamente la función de retención de agua por sus propiedades hidrofílicas y directamente por modificación de la estructura del suelo (Klute, 1986).

El porcentaje de sólidos volátiles (SV) con respecto a los sólidos totales (ST), es muy bajo, mientras que el porcentaje de sólidos fijos (SF), que representa a la fracción inorgánica, está por arriba del 90 % en todas las muestras, lo cual indica que estos suelos son de tipo mineral.

La densidad aparente tiene mucho que ver con la estructura que presenta el suelo, pues toma en cuenta el espacio poroso presente en el sistema. Las densidades de las muestras arenosas, CS1, S1a, S1b, CS2a, S2a y CS2b (Tabla 4.4), se encuentran dentro del intervalo reportado para este tipo de suelos, que es de 1.4 a 1.6 g/cm³ (Porta *et al.*, 1994). El valor de la muestra S2b de 1.16 g/cm³, está por abajo de este intervalo, sin embargo, si entra dentro del establecido para los suelos minerales que es de 1.0 a 1.6 g/cm³ (Thompson *et al.*, 1982). En general, al estar los valores por abajo de 1.9 g/cm³ habla de suelos que presentan poca compactación. Las densidades obtenidas para el Sitio 1, así como sus repeticiones, no presentan diferencia significativa, en el caso del Sitio 2, no se pudo hacer una comparación estadística por la falta de núcleos representativos que sirvieran como repeticiones en esta determinación.

Tabla 4.4 Contenido de sólidos y densidad de las muestras de suelo

Parámetro	Sitio 1			Sitio 2			
	CS1	S1a	S1b	CS2a	S2a	CS2b	S2b
S.T (mg/g)	959.52	870.19	802.29	987.72	940.76	957.95	743.36
(%)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)	(100)
S.V. (mg/g)	9.13	19.22	25.30	6.21	5.1	5.38	51.92
(%)	(0.95)	(2.21)	(3.15)	(0.63)	(0.54)	(0.561)	(6.98)
S.F (mg/g)	950.39	850.97	776.98	981.21	935.98	952.57	681.44
(%)	(99.05)	(97.79)	(96.84)	(99.37)	(99.49)	(99.44)	(91.67)
ρ_a (g/cm ³)	1.38	1.58	1.49	1.39	1.52	1.43	1.16
(%CV)	(14.16)	(15.11)	(12.47)	--	(6.39)	--	--
ρ_r (g/cm ³)	2.64	2.12	2.38	2.69	2.24	2.76	2.62
(%CV)	(2.72)	(20.4)	(4.9)	(0.74)	(3.07)	(6.18)	(0.07)
% Porosidad	47.89	25.59	37.50	48.38	32.46	48.10	55.79

CS1: Control Sitio 1
S1a, S1b: Muestra a y b del Sitio 1

CS2a, S2a: Control y muestra a del Sitio 2
CS2b, S2b: Control y muestra b del Sitio 2

La cantidad y composición de los ST de un suelo esta íntimamente relacionada con la densidad real del mismo, ya que ésta expresa una media de la densidad de las partículas presentes. La mayor parte de los ST de las muestras analizadas están constituidos por arenas, exceptuando la muestra S2b; con las cuales se obtuvieron valores un tanto diferentes al valor reportado para suelos minerales de 2.6 g/cm^3 y en especial los correspondientes a las muestras S1a, S1b y S2a. Ahora bien, como la densidad es un reflejo de los minerales más abundantes en suelos y rocas, se podría asumir la presencia de cuarzo (2.3 a 2.8 g/cm^3), ortoclasa (2.5 a 2.6 g/cm^3), feldspatos (2.6 a 2.7 g/cm^3) y en menor grado minerales de arcilla (2.0 a 2.6 g/cm^3) (Thompson *et al.*, 1982),

Entre los valores correspondientes a las densidades reales de las muestras del Sitio 1 no hay una diferencia estadística significativa, mientras que para los correspondientes a las muestras del Sitio 2, si existe una diferencia altamente significativa, incluso entre las muestras y sus controles.

En cuanto a la porosidad, los valores obtenidos para las muestras CS1, S1b, CS2a, S2a y CS2b se acercan al valor de 40 % reportado para arenas de granos individuales y la cual se considera como una porosidad insatisfactoria en cuanto a la eficacia en la retención de agua, sales, gases (Foth, 1985; Danielson *et al.*, 1986). La porosidad de la muestra S1a es muy baja, mientras que la muestra S1b con una porosidad de 55 % se considera satisfactoria.

Por otra parte, al presentar porosidades bajas, se establece que son suelos que presentan un calentamiento rápido, de ahí la importancia de que estos suelos no deben permanecer continuamente secos. Lo anterior, está muy ligado con el contenido de agua y su capacidad de retención.

4.1.2 Caracterización química

En la Tabla 4.5 se presentan los resultados de la caracterización química de los suelos de ambos sitios (1 y 2).

El pH que registraron las muestras y el control del Sitio 1, tiende a la alcalinidad, siendo este hecho más notorio al emplear agua (pH real) que al emplear cloruro de calcio (pH potencial). Con lo que se estima que hay cierto grado de saturación de bases que está favoreciendo el incremento de la concentración de iones OH^- sobre los iones H^+ en la solución del suelo; lo cual es característico de suelos de regiones áridas y semiáridas.

Estadísticamente no hay diferencia significativa entre el pH potencial registrado para el control CS1 y el correspondiente a la muestra S1a; pero ambas son diferentes estadísticamente con respecto a la muestra S1b.

En las muestras del Sitio 2, los valores registrados para el control CS2a y muestra S2a tienden más a la neutralidad, mientras que los del control CS2b y muestra S2b tienden hacia lo alcalino. En ambos casos la diferencia entre el pH real no es tan marcada con respecto al pH potencial. Entre las muestras hay diferencia significativa estadísticamente hablando, siendo la muestra S2a diferente a su control CS2a, pero no hay diferencia estadística entre la muestra S2b y su control respectivo. En este caso la diferencia se atribuye a que se trata de un material diferente.

Tabla 4.5 Caracterización química de las muestras de suelo

Parámetro	Sitio 1			Sitio 2			
	CS1	S1a	S1b	CS2a	S2a	CS2b	S2b
pH CaCl_2 (%CV)	7.62 (0.05)	7.80 (1.67)	7.94 (1.22)	7.04 (1.23)	7.26 (0.23)	7.80 (0.03)	7.75 (1.84)
pH agua	8.46	8.40	8.29	7.25	7.33	8.39	8.00
Conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{m}$)	140	418	428	133	446	142	1299
% Materia orgánica (%CV)	0.291 (117.33)	0.386 (54.07)	1.348 (22.17)	0.320 (34.96)	0.314 (44.21)	0.151 (86.64)	0.504 (10.91)
% Carbono orgánico (%CV)	0.169 (117.51)	0.224 (53.96)	(0.784) (22.19)	0.186 (34.96)	0.182 (44.43)	0.088 (86.65)	0.292 (10.95)
N_T (mg/kg) (%CV)	122 (90.16)	532 (9.39)	417 (2.39)	850 (71.76)	239 (33.47)	146 (0.68)	2735 (3.65)
N-NH_4^+ mg/kg	14.269	34.112	26.431	1.597	1.657	1.647	81.738
N-NO_3^- mg/kg (%CV)	0.0348 (8.62)	0.0676 (1.47)	0.0428 (14.01)	0.1639 (0.49)	0.0048 (83.33)	0.0017 (117.64)	0.0078 (12.82)
P-PO_4^{3-} mg/kg (%CV)	0.018 (25.13)	0.024 (29.28)	0.070 (32.76)	0.494 (51.57)	0.914 (5.36)	0.192 (6.78)	0.193 (2.58)

CS1: Control Sitio 1
S1a, S1b: Muestra a y b del Sitio 1

CS2a, S2a: Control y muestra a del Sitio 2
CS2b, S2b: Control y muestra b del Sitio 2

La conductividad eléctrica que presenta la solución de los suelos tanto del Sitio 1 como del Sitio 2 está por abajo de 1 dS/m. Tomando en cuenta que la conductividad permite establecer una aproximación cualitativa del contenido de sales, los valores indican que no existe problema de salinidad en estos suelos, por lo que sus efectos sobre la vegetación o cultivos son casi insignificantes según la clasificación que presenta Janzen (1993). Sin embargo, también es un indicio de que la velocidad de movilización de los elementos nutritivos es baja o de que algunos de ellos están totalmente ausentes; por otra parte, se ve reducida la capacidad de

intercambio iónico, teniendo por consecuencia que los minerales disueltos se encuentren más ionizados (Jackson, 1982; Nalco, 1982). A pesar de los valores bajos de conductividad, se logró observar una diferencia entre las muestras y sus controles, los cuales presentaron valores más bajos.

El contenido de materia orgánica según la clasificación que presenta Aguilera (1989), es muy bajo para las muestras CS1 y S1a y para todas las muestras del Sitio 2, mientras que la muestra S1b se considera sólo como bajo. Entre las muestras del Sitio 1 existe una diferencia estadística altamente significativa; siendo la muestra S1b la que difiere con respecto a las otras dos, esto con base en una prueba de rango múltiple. En cuanto a las repeticiones no hubo diferencia significativa. En el caso del Sitio 2 existe de igual forma, una diferencia significativa entre las muestras y no entre repeticiones, siendo la muestra S2b la que difiere del resto. Como una consecuencia de la relación que hay entre el porcentaje de carbono orgánico y el porcentaje de materia orgánica, el porcentaje de carbono orgánico presenta el mismo esquema. Ambos parámetros presentan valores muy bajos, esto como una consecuencia del casi nulo aporte externo de materia orgánica al sistema, el cual se limita a los residuos vegetales de pasto y de hierbas que crecen esporádicamente en el Sitio 1 y por temporal en el Sitio 2.

La mayor parte del nitrógeno total (N_T) se encuentra en la materia orgánica y al presentar una deficiencia de ésta, cabe esperar bajos contenidos de nitrógeno en ellos. De esta forma, el contenido de N_T en los suelos se considera pobre, debajo de 1000 mg/kg, exceptuando la muestra S2b, la cual contenía más de 2000 mg/kg, valor que vendría a considerarse como un contenido medianamente bueno (De la Garza, 1986). Lo anterior concuerda, con las características físicas de los suelos, donde se presenta una deficiencia incipiente de nitrógeno en muchos suelos arenosos de climas cálidos (Pritchett, 1986). Entre los valores obtenidos para el Sitio 1, existe una diferencia altamente significativa, en tanto que para las repeticiones no la hay.

El contenido de nitrógeno en forma amoniacal, se considera que una concentración de 25 ppm es adecuada para plantas poco exigentes (López *et al.*, 1987), con lo cual, en el caso del Sitio 1 se puede considerar con un contenido apropiado, mientras que el suelo del Sitio 2, se considera bajo o deficiente, exceptuando a la muestra S2b, que se considera buena.

Para la clasificación de los suelos con vistas a un análisis de contenido de fósforo, se agrupa a los suelos en dos, en un primer grupo se incluyen los suelos de textura gruesa y media y en un segundo a los de textura fina (López *et al.*, 1987). Las muestras analizadas corresponden al primer grupo y específicamente dentro de los de textura gruesa, incluyendo a la muestra S2b que es de textura media.

Los valores obtenidos para el contenido de fósforo en forma de fosfatos, esta por abajo de 1 mg/kg, lo que no arroja valores muy pequeños de fósforo como tal, si se considera que en concentraciones por abajo de 30 mg/kg indican deficiencia del elemento. Esto concuerda con la división de grupos mencionada anteriormente, ya que los suelos que conforman al primer grupo se caracterizan por presentar niveles muy bajos de P (12 ppm por el método de Truog y 1 ppm por el método de Olsen, según Lopez *et al.*, 1987).

4.1.3 Caracterización microbiológica

El análisis microbiológico se enfocó especialmente al grupo de bacterias, ya que aparte de ser el grupo más representativo en el suelo (Tabla 2.1), es el que puede representar un mayor potencial de degradación de contaminantes.

El contenido de bacterias totales tanto en el suelo del Sitio 1 como el del Sitio 2, se considera que está dentro del intervalo de una población que es buena, ya que como se puede ver en la Tabla 4.6, existen entre 10^9 y 10^{11} bacterias/g, a excepción de la muestra S1b que presentó 8.8×10^7 bacterias/g.

Tabla 4.6 Caracterización microbiológica de las muestras de suelo

Parámetro	Sitio 1			Sitio 2			
	CS1	S1a	S1b	CS2a	S2a	CS2b	S2b
Profundidad (cm)	15 - 30	40 - 60	30 - 50	50	90	50	50
Cuenta de bacterias totales (bacterias/g)	1.9E+11	7.4E+10	8.8E+07	7.1E+10	4.9E+09	1.0E+11	6.1E+11
Cuenta de heterótrofas (ufc/g)	7.6E+04	9.3E+03	4.6E+02	6.9E+03	3.1E+04	2.8E+04	1.9E+06
Cuenta de degradadoras de tolueno (ufc/g)	0	3.1E+02	4.0E+02	0	4.3E+03	0	2.5E+03

CS1: Control Sitio 1

S1a, S1b: Muestra a y b del Sitio 1

CS2a, S2a: Control y muestra a del Sitio 2

CS2b, S2b: Control y muestra b del Sitio 2

Por otra parte la población total de heterótrofas en comparación con los índices del conteo de bacterias total es muy baja, con valores entre 10^2 y 10^4 para el Sitio 1 y de 10^3 a 10^6 en el caso del Sitio 2. Esto debido en gran parte al bajo contenido de materia orgánica presente, ya que las divergencias entre un conteo directo y de cultivo, son mayores en suelos que no poseen materiales ricos en energía (Burges *et al.*, 1971). Dicha explicación toma más credibilidad por el hecho de encontrar una mayor proporción de células teñidas de color rojo-naranja, las cuales representan la porción viable de la población bacteriana, y la cual

probablemente se encuentra en un estado de reposo o de letargo (Borges *et al.*, 1971), por falta de nutrimentos, o bien es parte de la población viable pero no cultivable.

A pesar de la baja población heterótrofa, están presentes (exceptuando los controles) bacterias degradadoras de tolueno en un porcentaje con respecto a la población de heterótrofas totales del; 3.33 % para S1a, 86.95 % para S1b, 13.87 % para S2a y 0.13 % para S2b.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS PERFILES DE SUELO

4.2.1 Descripción

Como se mencionó anteriormente, en el Sitio 1 se tomaron muestras continuas en dos puntos para la zona contaminada, S1a y S1b, y uno para la zona control CS1 (Fig. 4.1).

En el punto S1a se insertaron dos cartuchos de acetato, que alcanzaron una profundidad de 92 cm. En el primer cartucho se obtuvo una recuperación del 100 %, en el segundo la recuperación bajó a 93.47 %, por lo que en realidad se llegó a una profundidad neta de 89 cm. En el punto S1b se obtuvo un solo cartucho, debido a que ya no se pudo penetrar más por la presencia de roca y se alcanzó una profundidad neta de 65 cm, con un 100 % de recuperación.

De ambos perfiles se obtuvieron submuestras al cortar los cartuchos bajo condiciones asépticas en los puntos en donde existía una diferencia de color, o consistencia determinada por observación directa. Se obtuvieron en total 7 submuestras para el perfil S1a, identificadas como S1a.1 a S1a.7 y 3 para el perfil S1b que se identificaron como S1b.1, S1b.2 y S1b.3 (Fig. 4.1).

En el caso del control CS1 no se logró obtener un perfil debido a las condiciones del sitio. Motivo por el cual sólo se muestreo a una profundidad de 30 a 50 cm, empleando una pala de mano.

Para el Sitio 2, se tomaron muestras continuas en dos puntos para la zona contaminada, S2a y S2b (Fig. 4.2) y en dos puntos para las zonas control, CS2a y CS2b.

En el punto S2a se insertaron dos cartuchos, que alcanzaron una profundidad de 92 cm, sin embargo en el primer cartucho se obtuvo una recuperación del 88.04 %, mientras que en el segundo la recuperación bajo a 70.65 %, la profundidad neta fue de 73 cm.

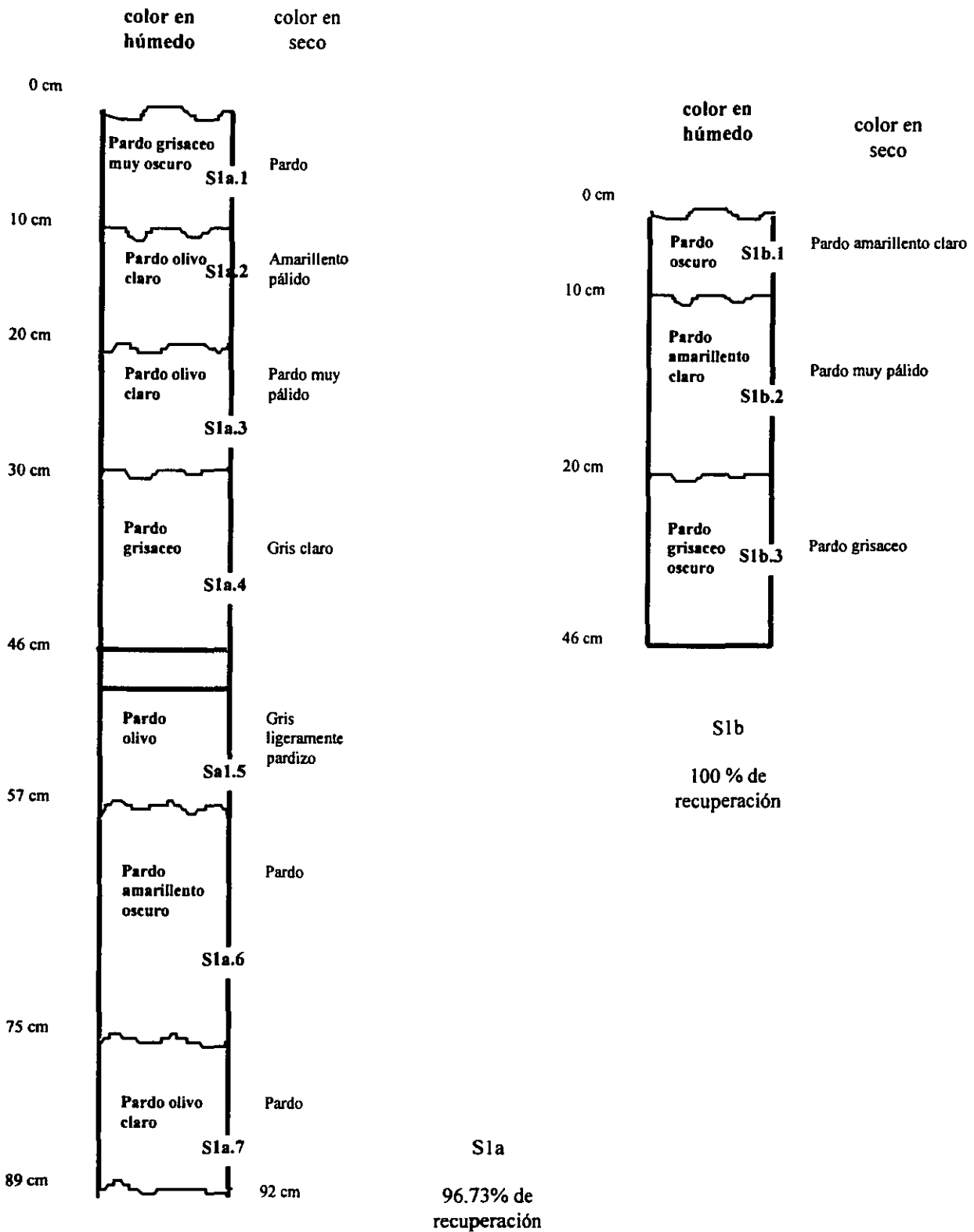


Fig. 4.1 Perfil de color correspondiente a los puntos de muestreo S1a y S1b del Sitio 1

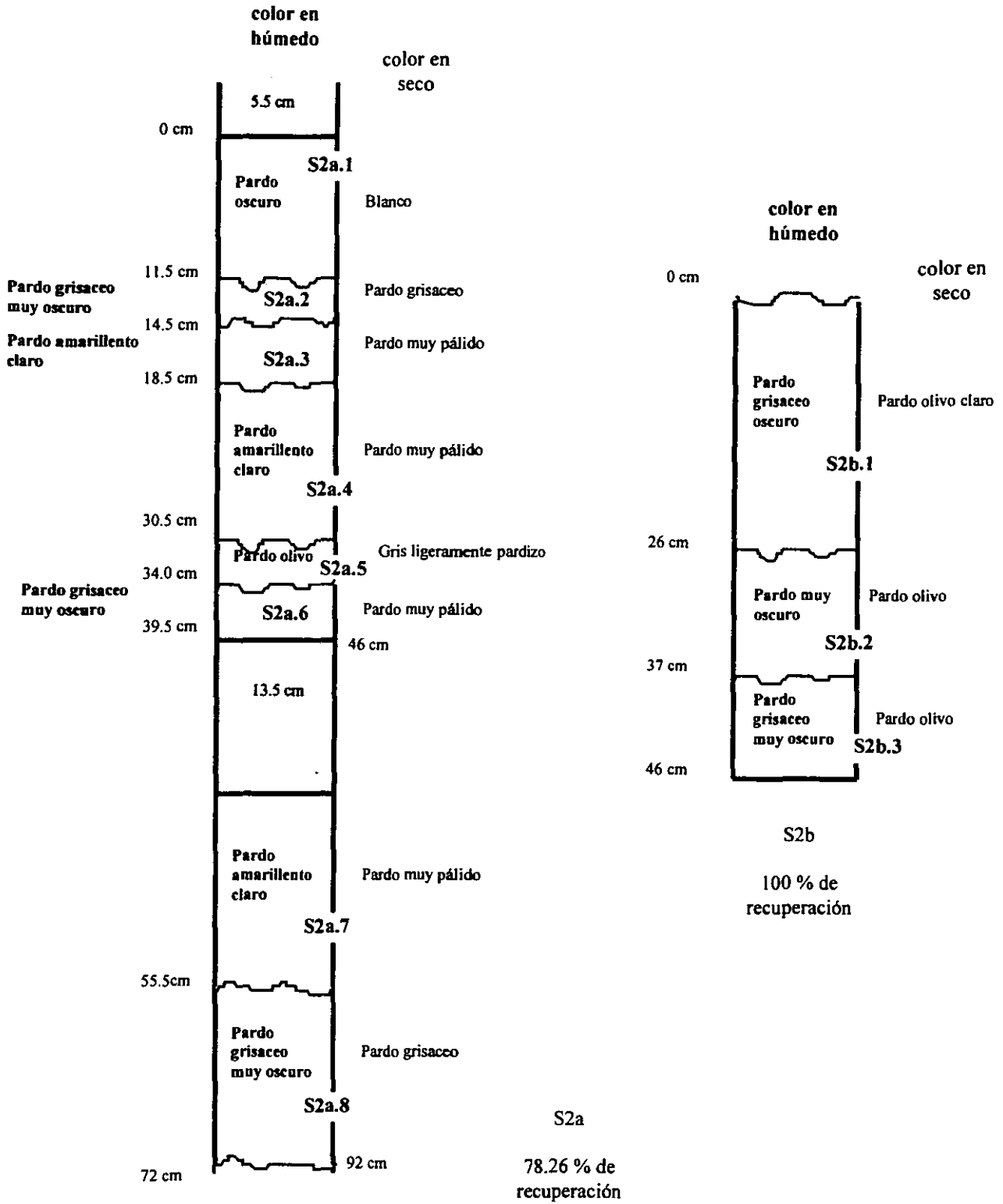


Fig. 4.2 Perfil de color correspondiente a los puntos de muestreo S2a y S2b del Sitio 2

En el punto S2b se insertó un sólo cartucho, debido a que se encontró un material color verde muy duro, el cual no pudo ser atravesado por el nucleador; con lo cual se alcanzó una profundidad neta de 46 cm, con una recuperación del 100 %. Al igual que en el caso anterior, de ambos perfiles se tomaron submuestras al cortar los cartuchos bajo condiciones asépticas en los puntos en donde existía una diferencia de color, o consistencia determinada por observación directa; se obtuvieron un total de 8 submuestras para el perfil S2a, que se identificaron como S2a.1 a S2a.8 y 3 para el perfil S2b, las cuales se clasificaron como S2b.1, S2b.2 y S2b.3 (Fig. 4.2).

En el punto CS2a se insertó un solo cartucho, debido a que el material ahí presente no permitió penetrar más allá, por lo que solo se alcanzó una profundidad neta de 33 cm, dada por la recuperación que fue de 71.73 %. De éste perfil no se obtuvieron submuestras, ya que la muestra resultó ser muy homogénea en cuanto a color y composición de partículas, por lo que se trabajó como una sola muestra.

En el caso del sitio control CS2b no se logró obtener un perfil debido a las condiciones del sitio.

4.2.2 Perfiles físicos, químicos y microbiológicos

El color predominante en los perfiles del Sitio 1 (Fig. 4.1) es el pardo con varias tonalidades en cuanto a la profundidad. Esto como resultado de la presencia de un matiz predominante 10YR en casi todos los horizontes, para la determinación en seco. La determinación en húmedo presentó una mayor variación en el matiz, cambiando a 2.5Y los primeros cinco horizontes junto con el S1a.7 del perfil S1a, así como el horizonte S1b.3 del perfil S1b, mientras que el resto mantuvo su matiz en 10YR.

La falta de variación en el matiz de ambos perfiles, es indicio de un bajo contenido de materia orgánica, ya que si bien, ésta tiene un efecto mucho más marcado en los suelos arenosos, pues sólo se requeriría de un contenido alrededor del 10 % para otorgarles una coloración oscura, los valores registrados a lo largo del perfil se mantiene por abajo del 5 % (Fig. 4.3). De tal forma que los colores más oscuros de los perfiles S1a.3, S1a.4 y S1b.3, se deben al incremento de la parte coloidal (limo y/o arcilla), esto con respecto a la presencia de motas en este sitio, ya mencionado anteriormente.

En la Fig. 4.2 se presentan los perfiles de color obtenidos para los suelos del Sitio 2 (S2a y S2b). En estos perfiles también predomina el color pardo, manteniendo el perfil S2a un matiz predominante en seco de 10YR. El perfil S2b presenta un matiz de 2.5Y en los tres horizontes; por lo que en ambos perfiles las variaciones se dan a nivel del *value* y del *chroma*. Este efecto no se presentó con la determinación en húmedo, ya que los matices cambian y no guardan un orden como en la determinación en seco.

En este caso se resalta la importancia del contenido de humedad en el suelo, así como de la materia orgánica, ya que como se puede ver los horizontes S2a.2 y S2a.8 del perfil S2a y los horizontes S2b.2 y S2b.3 del perfil S2b, presentan los colores más oscuros, lo cual coincide con en el hecho de que son los horizontes que presentan los mayores porcentajes de materia orgánica (Fig. 4.5), rebasando el 5 %, y por lo tanto es de esperar que dicho oscurecimiento se deba a la presencia de la misma, por otra parte en la determinación en seco de estos perfiles se aprecia un cambio hacia el aclaramiento del suelo.

El análisis granulométrico se realizó únicamente en los perfiles con la cantidad de suelo recuperada para cada perfil (Tablas 4.7 y 4.8).

Tabla 4.7 Análisis granulométrico de los perfiles S1a y S1b del Sitio 1

Submuestra	Diámetro Mm	C _u	C _c	% grava	% arena	% finos	Clasificación SUCS
S1a.1	D ₁₀ = 0.17 D ₃₀ = 0.23 D ₆₀ = 0.70	4.12	0.44	9.66	88.63	1.21	SP
S1a.2	D ₁₀ = 4.60 D ₃₀ = 0.13 D ₆₀ = 0.49	1.06	0.01	40.13	59.36	0.28	SP
S1a.3	D ₁₀ = 0.24 D ₃₀ = 0.70 D ₆₀ = 4.00	16.67	0.51	37.43	61.45	0.63	SP
S1a.4	D ₁₀ = 2.70 D ₃₀ = 5.60 D ₆₀ = 7.00	2.59	1.66	76.45	23.38	0.09	GW
S1a.5	D ₁₀ = 0.17 D ₃₀ = 0.40 D ₆₀ = 3.50	20.59	0.03	34.83	51.95	1.59	SP
S1a.6	D ₁₀ = 0.16 D ₃₀ = 0.18 D ₆₀ = 0.21	1.35	0.93	0.25	98.29	0.27	SW
S1a.7	D ₁₀ = 0.10 D ₃₀ = 0.17 D ₆₀ = 0.20	2.00	1.44	1.07	97.18	0.42	SW
S1b.1	D ₁₀ = 0.18 D ₃₀ = 0.85 D ₆₀ = 4.90	27.22	0.82	41.54	56.24	1.47	SP
S1b.2	D ₁₀ = 0.15 D ₃₀ = 0.22 D ₆₀ = 0.62	4.13	0.52	9.05	88.19	2.46	SP
S1b.3	D ₁₀ = 0.38 D ₃₀ = 2.00 D ₆₀ = 5.10	13.42	2.06	44.64	54.25	0.85	SP

D₁₀; D₃₀; D₆₀ = Diámetro de partícula al 10, 30 y 60 %
 C_u = Coeficiente de uniformidad (D₆₀ / D₁₀)
 C_c = Coeficiente de curvatura (D₃₀² / D₁₀ - D₆₀)
 SUCS = Sistema Unificado de Clasificación de Suelos

Para el Sitio 1, el tamaño efectivo de los perfiles S1a y S1b, dado por los valores obtenidos para D₁₀ (Bowles, 1992), presentó un intervalo de 0.10 - 4.60 mm y 0.15 - 0.38 mm respectivamente. El coeficiente de

uniformidad (C_u), indicó que los horizontes S1a.2, S1a.4, S1a.6, y S1a.7 fueron muy uniformes ya que su valor fue inferior a 3.5 ó 3, lo cual denota la uniformidad (Juarez *et al.*, 1997; Bowles, 1992). Para los horizontes S1a.1, S1a.3 y S1a.5 cuyos valores superaron el valor de 3, al igual que los tres horizontes del perfil S1b, se consideraron como no uniformes, lo cual indica que entre los tamaños D_{10} y D_{60} hay una gran diferencia.

Tabla 4.8 Análisis granulométrico de los perfiles S2a y S2b del Sitio 2

Submuestra	Diámetro	C_u	C_c	% grava	% arena	% finos	Clasificación SUCS
S2a.1	$D_{10} = 0.15$ $D_{30} = 0.19$ $D_{60} = 0.28$	1.87	0.86	0.00	97.96	1.64	SP
S2a.2	$D_{10} = 0.95$ $D_{30} = 3.70$ $D_{60} = 6.25$	6.58	2.30	63.64	36.02	0.33	GW
S2a.3	$D_{10} = 0.47$ $D_{30} = 0.90$ $D_{60} = 2.16$	4.59	0.80	0.00	99.48	0.52	SW
S2a.4	$D_{10} = 0.45$ $D_{30} = 0.80$ $D_{60} = 1.60$	3.55	0.89	1.15	98.70	0.15	SW
S2a.5	$D_{10} = 0.49$ $D_{30} = 1.00$ $D_{60} = 3.10$	6.33	0.66	28.09	71.44	0.35	SW
S2a.6	$D_{10} = 0.20$ $D_{30} = 0.52$ $D_{60} = 1.00$	5.00	1.352	1.47	96.98	0.64	SW
S2a.7	$D_{10} = 0.46$ $D_{30} = 0.85$ $D_{60} = 1.80$	3.91	0.87	1.24	98.14	0.37	SW
S2a.8	$D_{10} = 1.00$ $D_{30} = 2.90$ $D_{60} = 5.75$	5.75	1.46	52.76	46.45	0.64	GW
S2b.1	$D_{10} = 0.15$ $D_{30} = 0.19$ $D_{60} = 0.29$	1.93	0.83	11.14	87.65	0.28	SP
S2b.2	$D_{10} = 0.26$ $D_{30} = 1.88$ $D_{60} = 4.40$	16.92	2.83	37.91	59.95	2.01	SW
S2b.3	$D_{10} = 1.20$ $D_{30} = 3.50$ $D_{60} = 6.20$	5.17	1.65	61.02	37.62	1.15	GW

D_{10} ; D_{30} ; D_{60} = Diámetro de partícula al 10, 30 y 60 %
 C_u = Coeficiente de uniformidad (D_{60} / D_{10})
 C_c = Coeficiente de curvatura ($D_{30}^2 / D_{10} - D_{60}$)
 SUCS = Sistema Unificado de Clasificación de Suelos

Con el coeficiente de curvatura (C_c), se vió que los horizontes S1a.1, S1a.3, S1a.4, S1a.6 y S1a.7 del perfil S1a y el horizonte S1b.3 del perfil S1b, al presentar valores entre 0.7 y 3 (Juarez *et al.*, 1997; Bowles, 1992) se consideran como bien graduados. En el caso de los horizontes del perfil S1a, coincide con su uniformidad y por lo tanto presentan un amplio margen de tamaños de partículas, no obstante que no presenta apreciables cantidades de cada tamaño intermedio, esto debido a su clase textural, que como se mencionó anteriormente

el suelo es franco arenoso. Los horizontes S1a.2 y S1a.5 del perfil S1a y S1b.1 y S1b.2 del perfil S1b, cuyos valores están por abajo de 0.1, se consideran como mal graduados.

Tomando en cuenta la clasificación SUCS (Juarez *et al.*, 1997), la cual considera como arenas bien graduadas (SW) a aquellos materiales con valores de $C_u > 6$ y C_c 1 y 3; se tiene que sólo los horizontes S1a.6 y S1a.7 del perfil S1a son SW, mientras que el horizonte S1a.4 queda como grava bien graduada (GW), el resto de los horizontes del perfil S1a y todo el perfil S1b, resultaron ser arenas pobremente graduadas (SP).

Para los perfiles del Sitio 2 se tiene que, el tamaño efectivo del perfil S2a presentó un intervalo de 0.15 a 1.00 mm. La uniformidad sólo se presentó en el horizonte S2a.1, en tanto que los horizontes S2a.2, S2a.6 y S2a.8 son los que presentan una buena graduación. Tomando en cuenta los parámetros mencionados anteriormente, se tiene que exceptuando a los horizontes S2a.2 y S2a.8 que son GW, los horizontes son SW. En el caso del perfil S2b el intervalo del tamaño efectivo del perfil va de 0.15 a 1.20 mm; sólo el horizonte S2b.1 fue uniforme mientras que los horizontes S2b.2 y S2b.3 fueron bien graduados, por los que se clasifican como SP, SW y GW, respectivamente.

En las Figs. 4.3 y 4.4 se presentan los gráficos correspondientes a los parámetros físicos químicos y microbiológicos de los perfiles S1a y S1b, respectivamente. Los puntos no corresponden a una profundidad puntual, sino que representan un intervalo de profundidad, como se indica en el anexo 3.

Los valores de $\text{pH}_{\text{CaCl}_2}$ a lo largo de los perfiles, oscilaron entre valores de 7.1 a 7.97, lo cual indicó que se trata efectivamente de un suelo alcalino, aunque después de los 50 cm de profundidad parece presentar una ligera tendencia hacia la neutralidad. Con esto se descarta la posibilidad de que el pH sea un factor limitante para el desarrollo de la actividad microbiana.

Como se mencionó anteriormente, el aporte de materia orgánica a este sitio es mínimo, como resultado de ser un suelo para fines industriales. Por lo que los porcentajes de materia orgánica y de carbono orgánico registrados no sobrepasan el 5 %, lo que significa que el contenido es muy bajo; no obstante, se registraron dos puntos en donde se alcanza una máxima concentración en el perfil S1a (Fig. 4.3), el primero se presenta dentro de los primeros 10 cm de profundidad, y el segundo a los 50 cm, si bien en el perfil S1b (Fig. 4.4) no es tan claro por la falta de una medición más continua, los puntos máximos registrados son similares a los del perfil S1a.

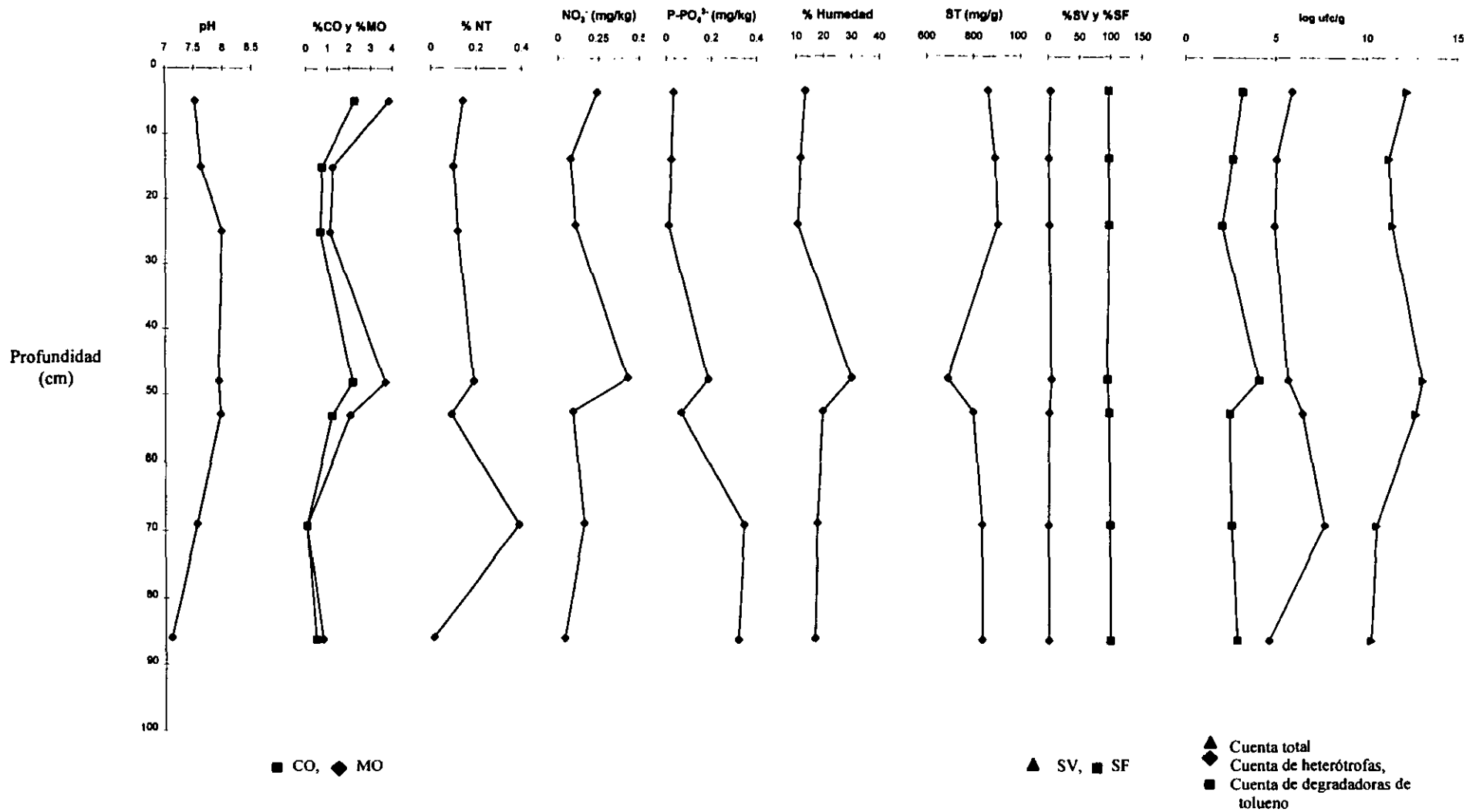


Fig. 4.3 Perfiles físicos, químicos y microbiológicos del suelo S1a (Sitio 1).
 CO: carbono orgánico, MO: materia orgánica, SV: sólidos volátiles, SF: sólidos fijos

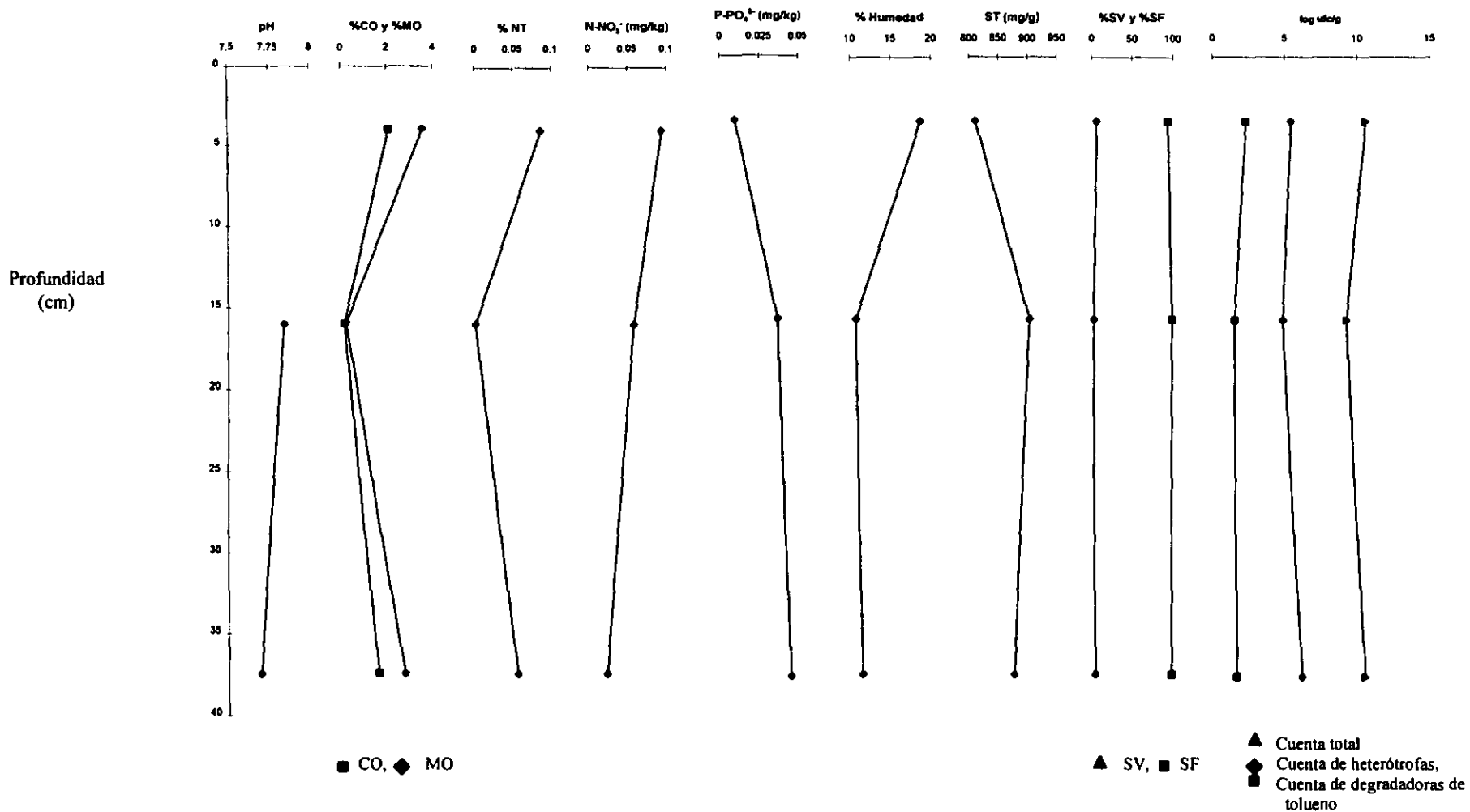


Fig. 4.4 Perfiles físicos, químicos y microbiológicos del suelo S1b (Sitio 1)
 CO: carbono orgánico, MO: materia orgánica, SV: sólidos volátiles, SF: sólidos fijos

Por otra parte, los valores tan bajos de materia orgánica se ven reflejados en los bajos porcentajes de sólidos volátiles (SV), los cuales representan la parte orgánica de los sólidos totales (ST), y que no van más allá del 7 % en ambos perfiles, S1a y S1b.

Para el nitrógeno total (N_T) y el que se encuentra en forma de nitratos (NO_3^-), al igual que el fósforo en forma de fosfatos (PO_4^{3-}), se obtuvieron valores bajos que caracterizan a un suelo pobre. En el perfil S1b (Fig. 4.3) no se aprecia realmente un cambio para el N_T , los NO_3^- tienden a disminuir mientras que los PO_4^{3-} tienden a aumentar, este comportamiento se ve más claro en el perfil S1b, en donde se puede apreciar que el comportamiento de los tres parámetros es muy similar, aunque no tan marcado al que presentó la materia orgánica hasta pasados un poco los 50 cm de profundidad, ya que a una profundidad alrededor de los 70 cm, los tres parámetros presentan un ligero incremento en concentración, siendo más evidente para el caso del N_T , el cual presentó una disminución más drástica después de dicho incremento.

Llama la atención que el perfil de humedad presenta un comportamiento muy similar al que se obtuvo para los parámetros antes mencionados. Por lo que cabría pensar que a una profundidad de 50 cm se presentan ciertas condiciones para la acumulación de material procedente del lavado o percolación de la parte más superficial, que es en donde se registran los primeros valores pico.

El hecho de encontrar el mayor número de bacterias a la profundidad de 50 cm, da un elemento más para pensar que las condiciones en este punto favorecen la acumulación de materia orgánica y como consecuencia el incremento de los valores del resto de los parámetros. Un aspecto a resaltar es que, a lo largo del núcleo se registró la existencia de bacterias degradadoras de tolueno, así como un buen porcentaje de bacterias heterótrofas del total de la población, por lo que podría esperarse que el proceso de biodegradación sería factible, sino es que ya se está dando a tasas muy bajas.

En las Figs. 4.5 y 4.6 se presentan los resultados para los perfiles S2a y S2b correspondientes al Sitio 2. Los puntos, nuevamente no corresponden a una profundidad puntual, sino que representan un intervalo de profundidad, que pueden ser revisados en el anexo 4.

Los valores de pH se encuentran en un intervalo de 6.77 a 7.55, por lo que en este caso se habla de un suelo con mayor variación de pH, ya que mientras en el perfil S2a se observa la tendencia a la neutralidad conforme se avanza en profundidad. En el perfil S2b se observa lo contrario, un incremento en los valores de pH. Esto como resultado de la diferencia en sí de ambas muestras de suelo (textura, color etc.), la cuales fueron perceptibles en el momento de recolectar las muestras.

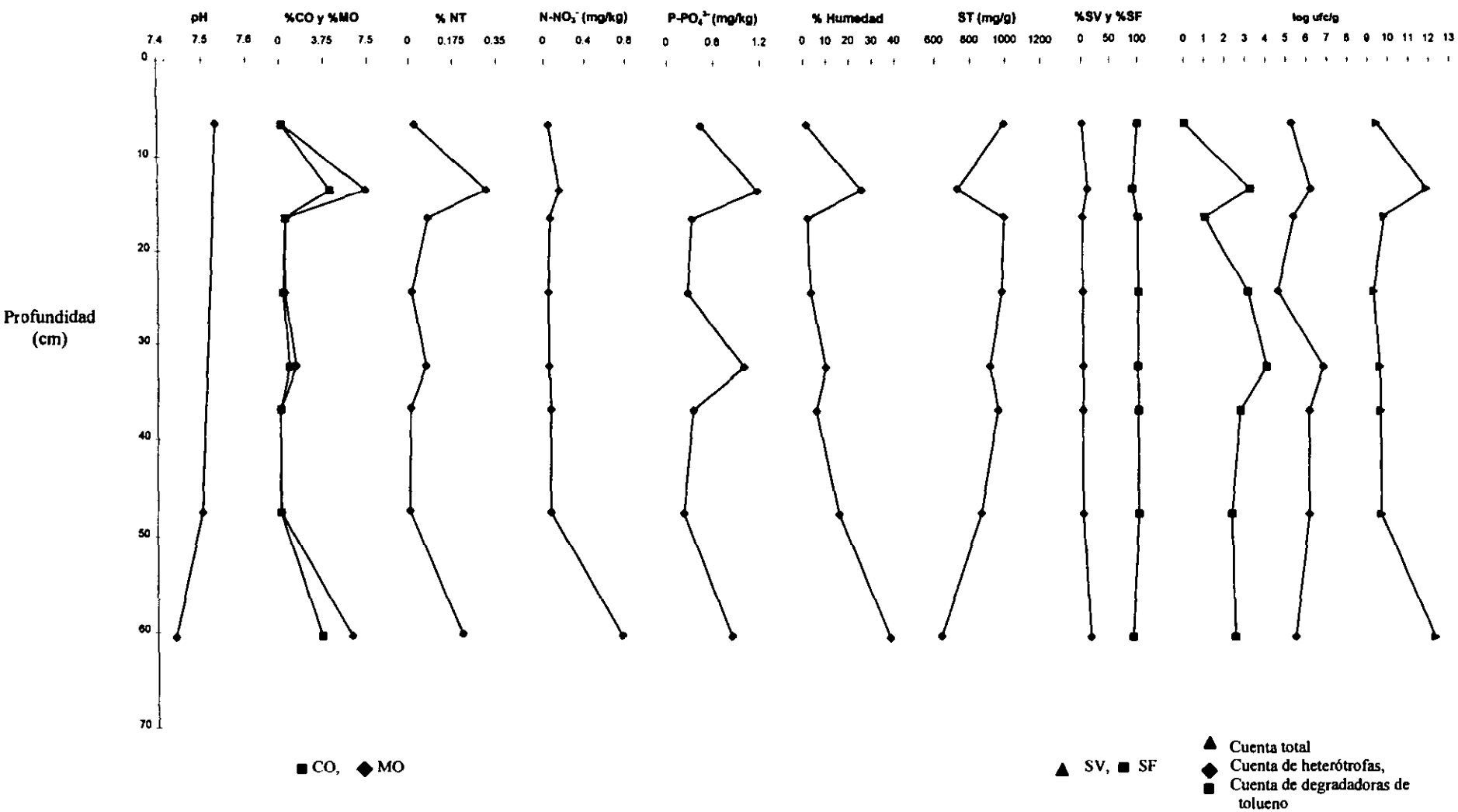


Fig. 4.5 Perfiles físicos, químicos y microbiológicos del suelo S2a (Sitio 2)
 CO: carbono orgánico, MO: materia orgánica, SV: sólidos volátiles, SF: sólidos fijos

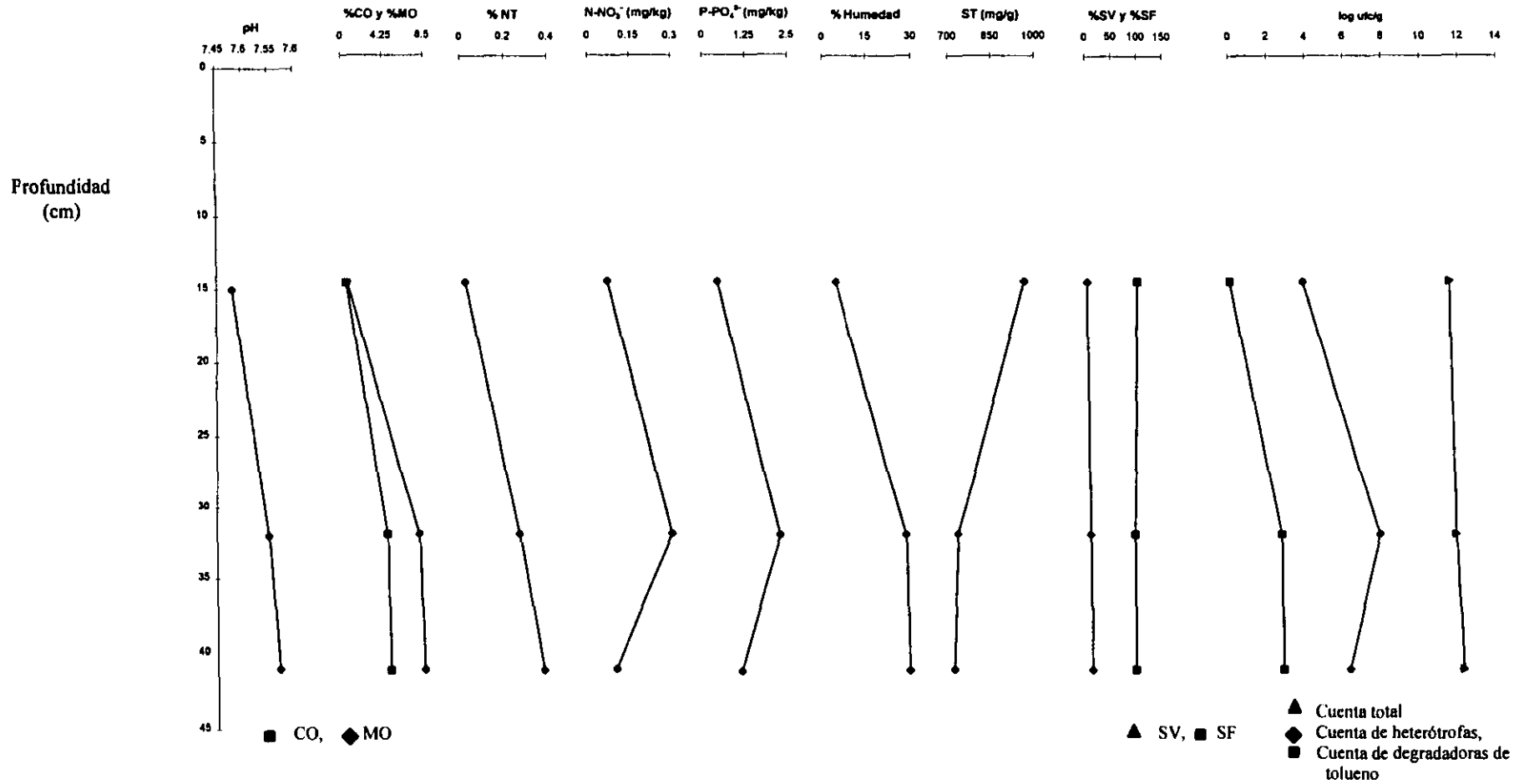


Fig. 4.6 Perfiles físicos químicos y microbiológicos del suelo S2b (Sitio 2)
 CO: carbono orgánico, MO: materia orgánica, SV: sólidos volátiles, SF: sólidos fijos

Los porcentajes de materia orgánica y carbono orgánico son muy bajos para el perfil S2a, exceptuando dos valores registrados, uno entre los 10 y 15 cm de profundidad y el otro a los 60 cm. En tanto que en el perfil S2b, en un intervalo de profundidad de 0 a 25 cm los porcentajes son muy bajos, pero se ven incrementados a mayor profundidad.

La forma de la gráfica registrada para la materia orgánica en S2a, se ve repetida en el resto de los parámetros, incluyendo el conteo microbiano. Por lo que en este perfil se pueden diferenciar tres horizontes en los que se presenta la acumulación y por tanto, una mayor actividad microbiana, el primero sería a una profundidad entre 0 a 15 cm, el segundo que no es tan evidente, de 25 a 35 cm y un tercero alrededor de los 60 cm. En cuanto al aspecto microbiológico es importante resaltar que un alto porcentaje de la población bacteriana total está representado por bacterias heterótrofas de las cuales, igualmente están representadas por un alto porcentaje de bacterias degradadoras de tolueno, y que estas últimas sufren un incremento como se avanza en profundidad. Lo anterior refleja el alto potencial de este sitio para poder desarrollar un proceso de biodegradación natural.

En el caso del perfil S2b, se presenta un incremento en la mayoría de los parámetros alrededor de los 32 cm de profundidad, incluyendo el contenido de bacterias.

Con base en estos resultados, se puede determinar que el potencial para desarrollar el proceso de biodegradación es alto, ya que en ambos sitios se detectó la presencia de bacterias degradadoras nativas a una profundidad de 1 m; y que tal vez la limitante en ambos casos es la baja cantidad de nutrimentos y la disponibilidad de humedad, la cual no resultó ser tan homogénea a lo largo de los perfiles.

4.3 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LOS EXPERIMENTOS DE BIODEGRADACIÓN

4.3.1 Selección de la unidad experimental

Los experimentos de biodegradación se llevaron a cabo a nivel de microcosmos, los cuales se constituyen como la escala de trabajo inicial dentro del área de biorremediación. El hecho de que los substratos empleados fueran volátiles obligó a la selección de una unidad experimental que asegurara el mejor sellado, es decir, sin pérdida de los substratos por volatilización. Las unidades experimentales que se probaron fueron: U1) Botella ámbar con rosca inviolable y válvula mininert, U2) Botella ámbar con rosca inviolable, tapón plano con cubierta de teflón y tapa de baquelita perforada y U3) Botellas serológicas con tapón plano con cubierta de teflón y arillo metálico (Fig. 3.4).

Las unidades experimentales se montaron bajo las condiciones de incubación referidas en el capítulo de estrategia experimental, seleccionando al tolueno para realizar las pruebas debido a su menor toxicidad respecto al benceno. Cabe aclarar que para seleccionar la mejor unidad experimental que funcionara como control de pérdida por fuga, no se permitió actividad microbiana alguna, al esterilizar el suelo, de tal forma que al detectar pérdida de tolueno dentro del microcosmos sería exclusivamente por fallas en el sellado de la unidad experimental correspondiente.

El seguimiento de tolueno se realizó a partir de la medición de su presencia en la fase gas del sistema de acuerdo a la técnica Head-space (EPA 3810; EPA 8020).

En la figura 4.7 se presentan los resultados obtenidos con el tolueno, en la que se puede observar que la unidad experimental tres (U3) presentó una mejor confiabilidad, al no detectar pérdida de tolueno después de 23 días de incubación. Los resultados correspondientes a la unidad experimental uno, no se presentan ya que con este sistema se presentaron fugas desde el instante de la toma de muestra. Cada punto en los gráficos corresponde a una medición por unidad experimental, que se tomó de manera aleatoria respecto al tiempo. A partir de estas pruebas se decidió emplear la unidad experimental sellada con tapón con cubierta de teflón y arillo de aluminio para los experimentos de biodegradación (U3).

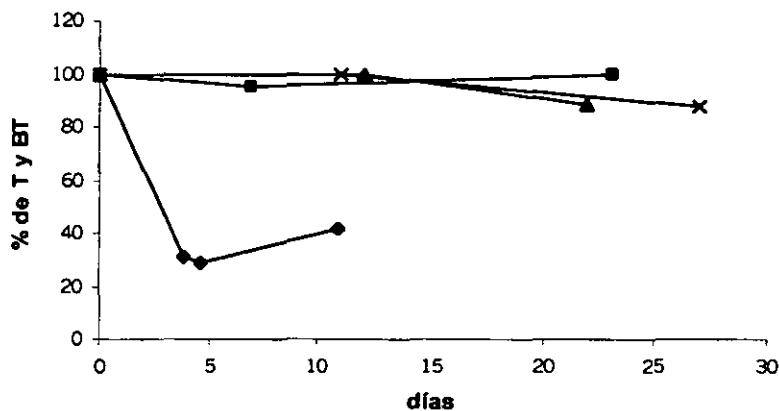


Fig. 4.7 Evaluación de las unidades experimentales: **◆** U2 (tolueno) y **■** U3 (tolueno), con tolueno y seguimiento de BTX con la unidad tres **▲** U3(BTX con suelo del Sitio 1) **×** U3 (BTX con suelo del Sitio 2).

Los resultados de los testigos de fuga corridos para los experimentos con la mezcla de BTX son el suelo de ambos sitios, utilizando la unidad experimental tres, una vez seleccionada, también se presentan en la Fig. 4.7. Estos resultados confirmaron la eficiencia de la unidad como microcosmos, de tal forma que los resultados obtenidos representan realmente la actividad de los microorganismos.

4.3.2 Definición de la temperatura de volatilización para la cuantificación de BTEX

La cuantificación de BTEX que se hizo por la técnica de Head-space (EPA 3810; EPA 8020), la cual consiste en promover la volatilización de los hidrocarburos dentro del espacio vacío del microcosmos. Si bien ya existen valores de temperatura, se prefirió establecer la temperatura más adecuada para el sistema experimental empleado, bajo las condiciones del laboratorio.

En la Fig. 4.8, se muestran los resultados obtenidos al probar cinco temperaturas diferentes por un periodo de 30 minutos; este intervalo de tiempo se estableció de manera arbitraria. La concentración se fijó por cálculo a 80 mg/kg de la mezcla de BTEX.

Como se puede ver dentro del intervalo determinado, la mayor recuperación se presentó en el intervalo de 65 a 70°C, que se encuentra por debajo de los 90°C de temperatura, que recomienda el método EPA 3810 que sirvió como referencia. Se probó a 90°C, pero dentro de los microcosmos se generaba mucha presión, de tal forma que al introducir la jeringa de muestreo, se presentaban fugas bastante evidentes, incluso de vapor de agua que además provocaba problemas a la columna del cromatógrafo. Se decidió entonces realizar esta parte del proceso analítico por Head-space a una temperatura de 65°C, a reserva de fijar el tiempo de volatilización, que fue la siguiente condición a establecer.

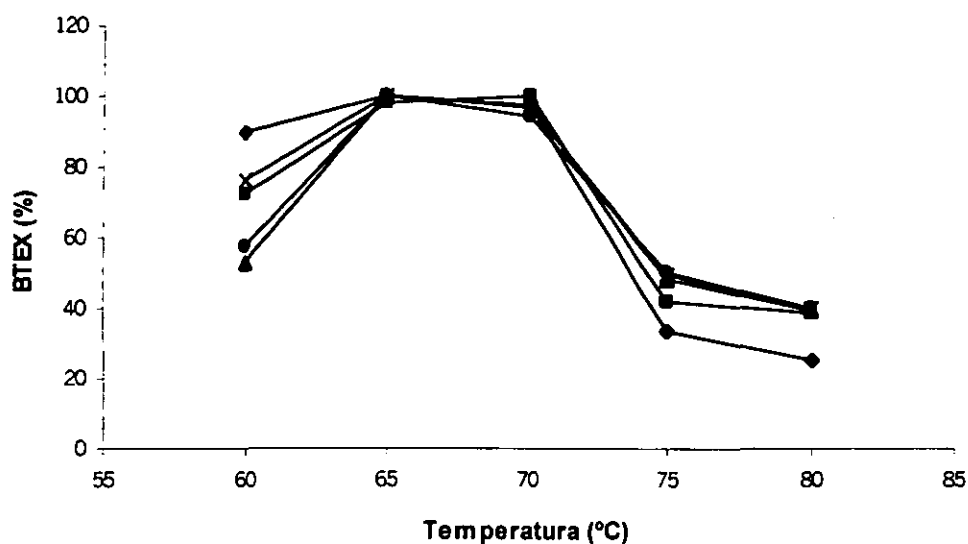


Fig. 4.8 Efecto de la temperatura sobre la volatilización de BTEX mediante la técnica de Head-space.
 ◆ Benceno, ■ Tolueno, ▲ Etilbenceno, × *m y p*-Xilenos, ● *o*-Xileno.

4.3.3 Definición del tiempo de volatilización para la cuantificación de BTEX

En la Fig. 4.9, se presentan los resultados obtenidos después de permitir la volatilización de BTEX a 65°C, que fue la temperatura óptima, con una concentración inicial calculada de 80 mg/kg. Como se puede observar, la tendencia es de mayor recuperación a conforme se incrementa el tiempo hasta casi una hora y media de incubación, ya que después se puede apreciar que el incremento ya no tan evidente.

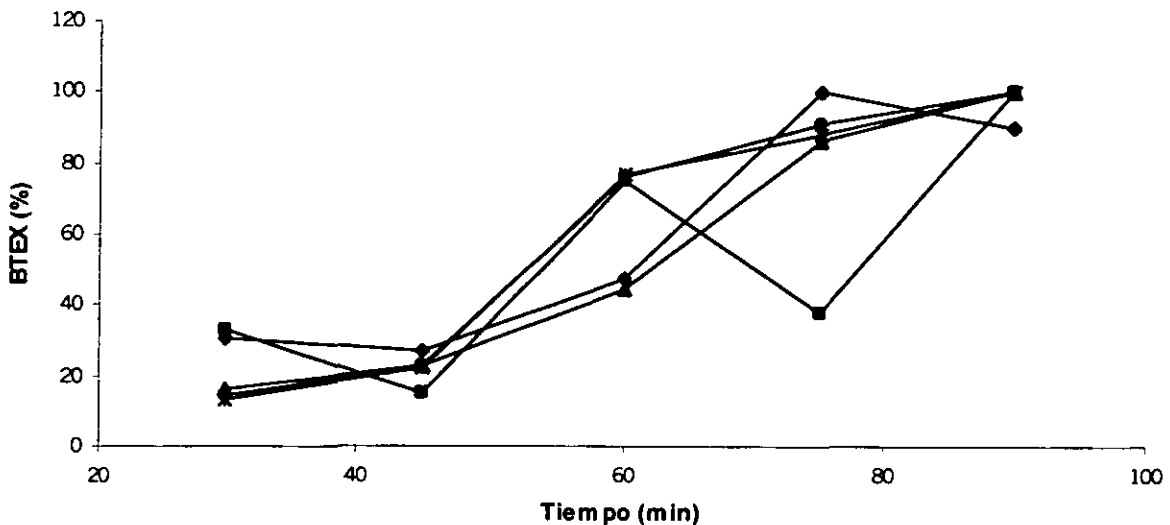


Fig. 4.9. Efecto del tiempo de calentamiento durante la volatilización de BTEX a una temperatura de 65°C.
 ◆ Benceno, ■ Tolueno, ▲ Etilbenceno, ● *m* y *p*-Xilenos, x *o*-Xileno.

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede ver que el tiempo óptimo de volatilización de BTEX a 65°C en el análisis por Head-space es de 90 minutos. Sin embargo, se decidió establecer el tiempo de 60 minutos para el tiempo de volatilización, ya que es el tiempo recomendado en el método de la EPA 3810 y el que nos permitió realizar los análisis cromatográficos de manera continua.

4.4 ACLIMATACIÓN DE LOS CULTIVOS

Se procedió a la aclimatación de los microorganismos presentes en los suelos de los dos sitios en estudio, con el fin de contar con un cultivo capaz de degradar los hidrocarburos monoaromáticos volátiles de interés. Al mismo tiempo se probaron 3 cepas de colección reportadas como degradadoras de BTEX, las cuales fueron consideradas como controles positivos y 2 preparaciones comerciales. En la Tabla 4.9 se presenta la identificación de cada una.

Tabla 4.9 Microorganismos degradadores de BTEX utilizados como referencia

IDENTIFICACIÓN	ORIGEN
NRRL 14484	<i>Bacillus gordonae</i>
ATCC 33014	<i>Pseudomonas putida</i>
ATCC 51349	<i>Rhodococcus zopfii</i>
PTB50	Cultivo obtenido del sedimento de un canal de aguas residuales industriales contaminado con BTEX
KAM	Preparación comercial
WMI	Preparación comercial

Para activar las cepas de colección se emplearon los medios recomendados para cada una de ellas. Los cultivos nativos de los sitios de trabajo, así como el PTB 50, fueron cultivados en un medio complejo constituido de extracto de suelo (Germida *et al.*, 1993) y posteriormente en el medio mineral reportado por Robinson *et al.*, (1990).

Los 6 cultivos de referencia fueron crecidos en medio líquido, inicialmente en presencia de tolueno y benceno por separado a concentraciones crecientes, posteriormente se les adicionó la mezcla benceno-tolueno, respetando los incrementos empleados con anterioridad para cada compuesto. En cada incremento de concentración se realizó el seguimiento de la producción de CO₂ como una medida indirecta de la actividad microbiana. En todos los casos se incluyó el control correspondiente sin la adición de benceno-tolueno y su producción de CO₂ se utilizó para ajustar la producción neta con el experimentos de biodegradación del de los mismos.

En la Fig. 4.10 se presenta la producción neta de CO₂ obtenida con las cepas de colección ATCC 33015 y ATCC 51349, a partir de diferentes concentraciones de la mezcla benceno-tolueno. La cepa NRRL 14484, no fue capaz de crecer en la presencia benceno y tolueno.

Con las cepas de colección de la ATCC, sí se observó producción de CO₂ a partir del sustrato. En el caso de la cepa ATCC 33015, ésta producción se registró con las primeras cuatro concentraciones, y aparentemente 872 mg/l de la mezcla de sustrato fue una concentración inhibitoria. Con la cepa 51349, solo se registró producción de CO₂ para las dos concentraciones más bajas, siendo mayor la producción neta a partir de la concentración de 349 mg/l.

En el caso de los cultivos PTB50, KM y WM, no se registró producción alguna de CO₂, por lo que estos cultivos no fueron capaces de generar una respuesta ante la presencia de la mezcla de benceno y tolueno,

incluso a las más bajas concentraciones. En este caso se esperaba alguna respuesta por parte del consorcio PTB50, ya que éste fue obtenido de un sitio en el cual se había detectado la presencia de ambos substratos. En el caso de las preparaciones comerciales, no se tenía idea alguna de cual podría ser su respuesta, pero en este caso fue no satisfactoria.

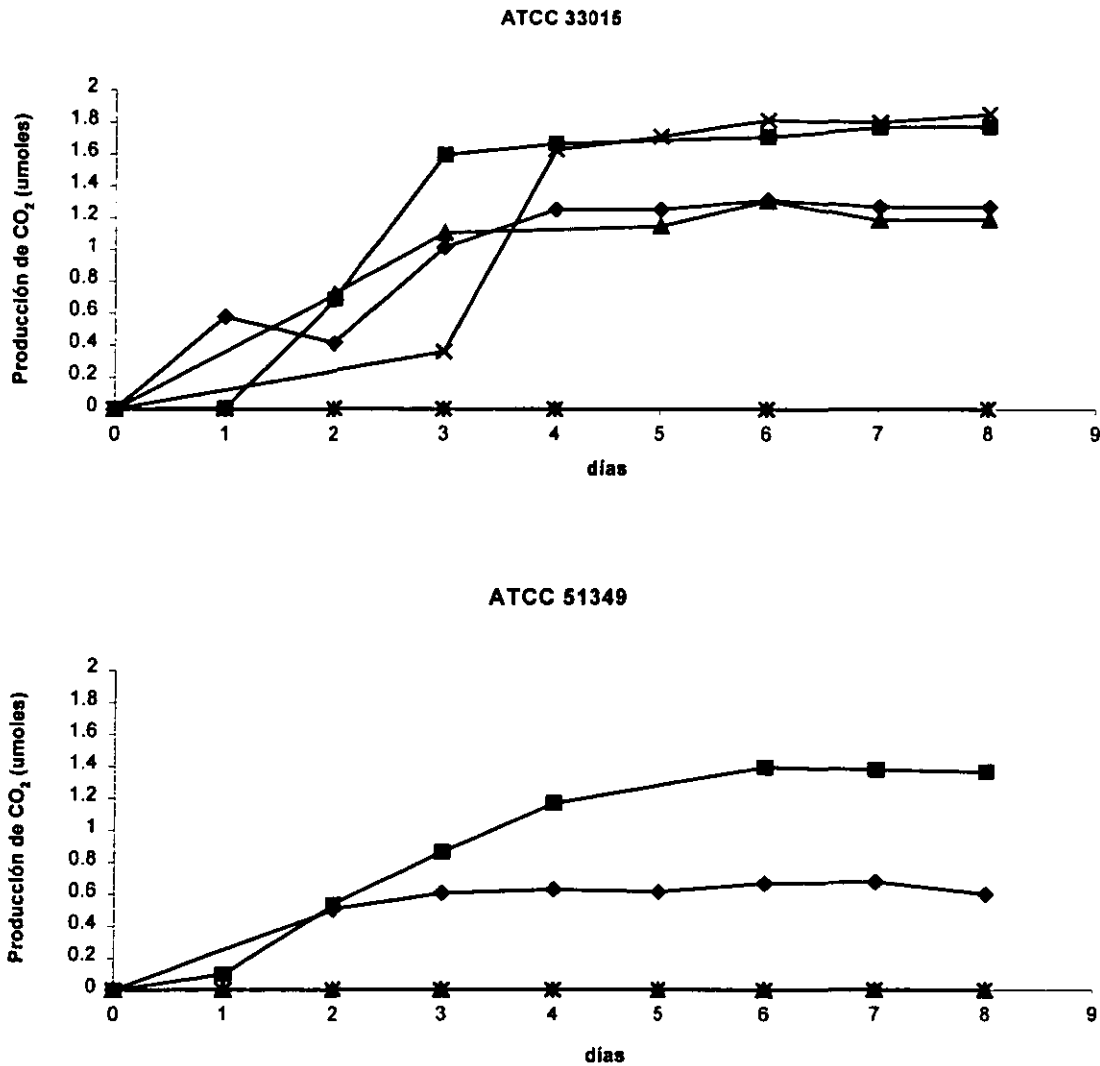


Fig. 4.10 Evolución de la producción neta de CO₂ a partir de las cepas de colección cultivadas en medio líquido en presencia de la mezcla benceno-tolueno a diferentes concentraciones. ◆ 174 mg/kg, ■ 349 mg/kg, ▲ 523 mg/kg, ✕ 697 mg/kg, * 872 mg/kg.

Al observar producción de CO₂ con las cepas de referencia ATCC 33015 y ATCC 51349, en presencia de benceno y tolueno como únicos substratos, se asumió que era una respuesta directa de la degradación de estos

hidrocarburos, por lo que esta determinación podría ser realizada de manera simultánea a la cuantificación de los substratos residuales para tener una confirmación de la actividad degradadora de los cultivos aclimatados.

4.5 BIODEGRADACIÓN DE TOLUENO EN MEDIO LÍQUIDO

El cultivo aclimatado proveniente del Sitio 1, se utilizó para evaluar la degradación de tolueno en medio líquido. En la Fig. 4.11 se presenta la cinética de degradación, a una concentración inicial de tolueno de 867 mg/l.

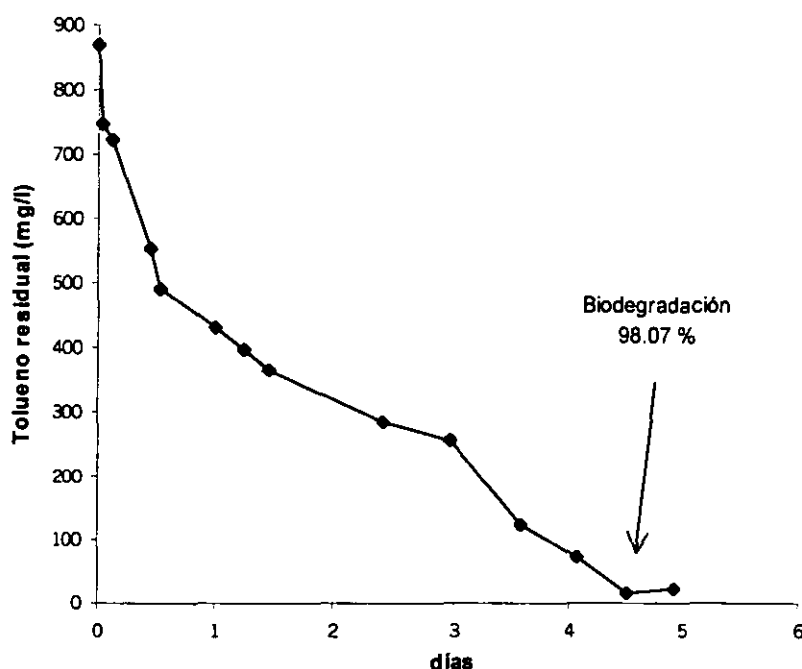


Fig. 4.11 Biodegradación de tolueno en medio mineral líquido, por un cultivo aclimatado, proveniente del Sitio 1. ♦ Tolueno residual

La mayor biodegradación se presentó durante el transcurso del primer día, con una velocidad de degradación de 119.29 mgT/l-h en la primera hora de incubación y de 31.32 mgT/l-h para las siguientes doce horas. A este tiempo la concentración bajó a casi la mitad. Para los siguientes 4 días las velocidades se mantuvieron por debajo de los 9 mgT/l-h. El porcentaje de degradación alcanzado después de 4.5 días fue de 98.07 %.

En este experimento, no se realizó el seguimiento de la producción de bióxido de carbono y consumo de oxígeno, ya que el interés fundamental fue integrar todas las condiciones establecidas anteriormente para la cuantificación neta del substrato residual, es decir, sin interferencia de alguna fuga. Una vez que se logró dar seguimiento a la disminución en la concentración de tolueno en medio líquido, se realizaron los experimentos en suelo.

4.6 BIODEGRADACIÓN DE HIDROCARBUROS MONOAROMÁTICOS VOLÁTILES EN SUELO

Se realizaron 10 experimentos de biodegradación diferentes, los 6 primeros corresponden al suelo del Sitio 1 (S1c) y los 4 restantes al suelo del Sitio 2 (S2) (Tabla 4.10). Con el suelo de ambos sitios, se evaluó la capacidad de la flora nativa para degradar los sustratos y el efecto de la inoculación (I) con bacterias nativas previamente aclimatadas. En ambos casos con y sin la adición de nutrientes (N), los cuales consistieron principalmente de fuentes de nitrógeno y fósforo. El ajuste de humedad fue de 20 % para el suelo S1c y de 15 % para el S2.

Tabla 4.10. Relación de experimentos relacionados con las pruebas de biodegradación de BTX

Substrato	Condiciones del experimento	Parámetros de seguimiento
Suelo del Sitio 1		
Tolueno	1. Degradación de tolueno por bacterias nativas. S1c+T.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentración del tolueno residual ▪ Consumo de oxígeno ▪ Producción de bióxido de carbono ▪ Cuenta de heterótrofas y degradadoras ▪ *Seguimiento de pH
	2. Degradación de tolueno en presencia de inóculo. S1c+T+I.	
	3. Degradación de tolueno por bacterias nativas en presencia de nutrientes. S1c+T+N*.	
	4. Degradación de tolueno en presencia del inóculo y de nutrientes. S1c+T+I+N*.	
BTX	5. Degradación de BTX por bacterias nativas en presencia de nutrientes. S1c+BTX+N.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentración de BTX residual ▪ Consumo de oxígeno ▪ Producción de bióxido de carbono ▪ Cuenta de heterótrofas y degradadoras
	6. Degradación de BTX en presencia del inóculo y de nutrientes. S1c+BTX+I+N.	
Suelo del Sitio 2		
BTX	7. Degradación de BTX por bacterias nativas. S2+BTX.	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Concentración de BTX residual ▪ Consumo de oxígeno ▪ Producción de bióxido de carbono ▪ Cuenta de heterótrofas y degradadoras
	8. Degradación de BTX en presencia del inóculo. S2+BTX+I.	
	9. Degradación de BTX por bacterias nativas en presencia de nutrientes. S2+BTX+N.	
	10. Degradación de BTX en presencia del inóculo y de nutrientes. S2+BTX+I+N.	

4.6.1 Biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 1

Degradación de tolueno

En la Fig. 4.12 se esquematiza el porcentaje de tolueno (T) residual con respecto al tiempo de incubación, obtenido en los primeros cuatro experimentos con el suelo del Sitio 1 (S1c).

En todos los casos, el máximo porcentaje de biodegradación alcanzado (Tabla 4.11) indica que tanto la población bacteriana nativa sola (S1c+T) como la nativa en conjunto con el inóculo aclimatado (S1c+T+I), fueron capaces de llevar a cabo la biodegradación del tolueno con y sin la adición de nutrientes (N). La mayor actividad se presentó durante los primeros cinco días de incubación al disminuir el porcentaje de tolueno residual a un 50 % o más. El máximo porcentaje de biodegradación alcanzado fue de 97.7 % con la población nativa y la adición de nutrientes S1c+T+N, y el más bajo correspondió al experimento con la adición del inóculo aclimatado sin nutrientes S1c+T+I con un 79.4 %.

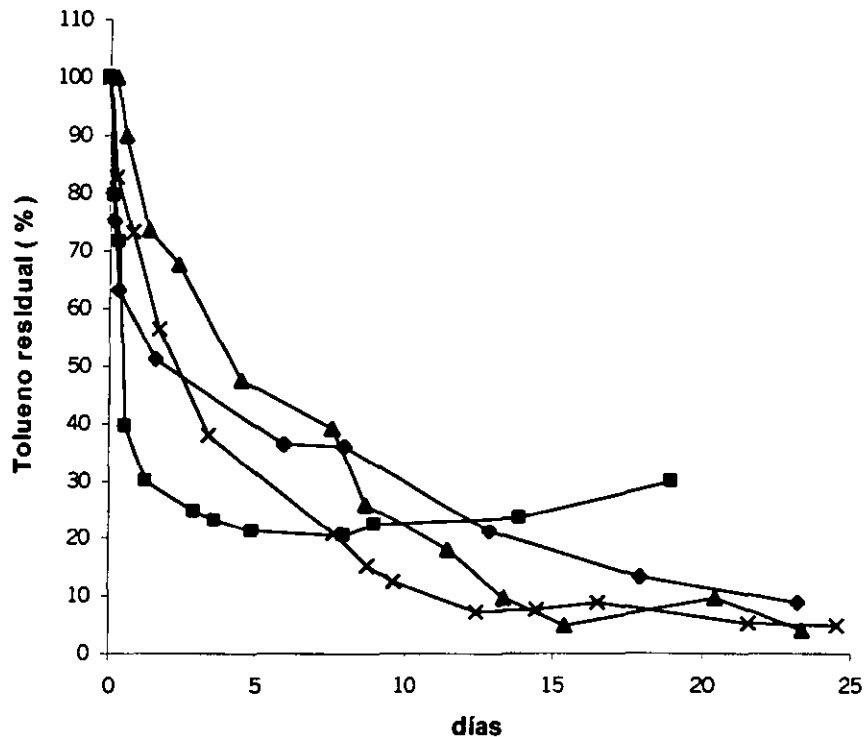


Fig. 4.12 Biodegradación de tolueno con el suelo del Sitio 1(S1c). ♦ S1c+T, ■ S1c+T+I, ▲ S1c+T+N, ✕ S1c+T+I+N. T: tolueno, N: nutrientes, I: Inóculo aclimatado

Dichos porcentajes, indican que el mejor procedimiento a seguir para tratar el suelo del Sitio 1, sería adicionar nutrientes al mismo. Sin embargo, para poder tomar una buena decisión hay que tomar en cuenta otros factores como el tiempo y la velocidad. En la Tabla 4.11 se presentan las velocidades de degradación de tolueno calculadas durante las primeras 8 horas de incubación.

Al comparar resultados obtenidos en los experimentos sin la adición de nutrientes (S1c+T y S1c+T+I), se puede ver que la mayor velocidad de biodegradación de 113.95 mg/kg-h, fue para el experimento en el cual únicamente se adicionó tolueno S1c+T. El experimento en el que además se adicionó el inóculo S1c+T+I, se registro una velocidad de 96.68 mg/kg-h que es más o menos similar, pero al comparar los porcentajes que

representan la máxima biodegradación y el tiempo en que fueron alcanzados, la diferencia es más considerable, 91 % con las bacterias nativas S1c+T y 79.4 % con la adición del inóculo S1c+T+I, los cuales se alcanzan en 23.2 días y 7.9 días respectivamente.

Este tipo de respuesta pudo deberse al hecho de que las bacterias nativas del suelo respondieron de manera inmediata ante la presencia del tolueno con una velocidad mayor reduciendo el porcentaje de tolueno residual a un 63 % (Fig. 4.12 ♦), aunque después de las 8 horas de incubación su actividad disminuyó y su velocidad se redujo a 9.4 mg/kg-h en las siguientes 30.5 hrs (1.2 días), con lo que se alcanza una disminución del porcentaje a 51.3 %. En contraste, cuando se adicionó el inóculo pudo haber un estado de competencia con las bacterias nativas, en conjunto con un periodo de adaptación del inóculo adicionado al sistema del suelo, por lo que la velocidad inicial fue un poco inferior disminuyendo el porcentaje a un 71.7 %; sin embargo, en este caso su actividad no se vio disminuida y la velocidad se incrementó a 159.5 mg/kg-h en las siguientes 5.5 hrs (0.2 día), reduciendo el porcentaje a un 40 % (Fig. 4.12 ■). Este comportamiento se aprecia más claramente con el seguimiento de la producción de CO₂ (Fig. 4.13A), en la cual se ve que la producción del experimento con adición de inóculo S1c+T+I (■) mantiene una producción mucho mayor, la cual disminuye después de 5 días de incubación, tiempo al cual también se ve detenida la actividad sobre el tolueno, esto como resultado de la posible falta de nutrientes disponibles ya que la caracterización del suelo refleja la deficiencia de los mismos (Tabla 4.5), o porque con la disminución en el porcentaje del tolueno residual ya no se pudo sostener la actividad del inóculo. Al no adicionar el inóculo S1c+T (♦) las bacterias nativas mantienen una producción de CO₂ más constante.

Tabla 4.11 Velocidades de biodegradación de tolueno obtenidas con el suelo del Sitio 1

Experimento	Velocidad de degradación de tolueno en las primeras 8 hrs (0.33 días) de incubación (mg/kg-h)	Máxima biodegradación	
		(%)	(días)
1. S1c+T	113.95	91	23.2
2. S1c+T+I	96.68	79.4	7.9
3. S1c+T+N	22.51	97.7	29.4
4. S1c+T+N+I	74.89	95	24.5

T: tolueno; N: nutrientes I: inóculo aclimatado.

Con los experimentos en los cuales se adicionaron nutrientes (S1c+T+N y S1c+T+N+I), se presentó también una diferencia en la velocidad de biodegradación en las primeras 8 hrs (Tabla 4.11); 22.51 mg/kg-h para el experimento sólo con nutrientes S1c+T+N y 74.82 mg/kg-h para el adicionado además del inóculo aclimatado S1c+T+N+I; a pesar de que se alcanzó prácticamente el mismo porcentaje de biodegradación

final, 97.7 % y 95 % respectivamente y en los cuales prácticamente no hay diferencia. El tiempo en que fueron alcanzados dichos porcentajes son semejantes, disminuyendo con la adición del inóculo aclimatado.

En este caso, al adicionar nutrimentos el inóculo incrementó la respuesta inicial, en cambio las bacteria nativas solas respondieron más lentamente como respuesta a la adaptación del incremento en la concentración de nutrimentos, a la cual no están acostumbradas. En ambos experimentos al tiempo de las 8 hrs no se había disminuido el porcentaje de tolueno residual a no menos del 90 %, sin embargo, en el tiempo subsecuente se mantuvo una actividad más constante aunque las velocidades de biodegradación fueron inferiores a 25 mg/kg-h. Esto se vió reflejado de igual forma en el comportamiento tanto de la producción de CO₂ y como del consumo de O₂ (Fig. 4.13 A y B).

Al comparar los experimentos con y sin adición de nutrimentos (Tabla 4.11); se tiene que al adicionarlos (S1c+T+N y S1c+T+N+I), se vió reducida la actividad inicial tanto con y sin la adición del inóculo con respecto a los que no se les suministró (S1c+T y S1c+T+I). No obstante, la aportación de nutrimentos favoreció la actividad microbiana a largo plazo incrementando así los porcentajes de biodegradación del tolueno, en comparación con los que no fueron adicionados, sin embargo, el tiempo en el que se alcanzaron los máximos porcentajes de biodegradación son menores en estos últimos.

En la Fig. 4.13, se presenta el seguimiento de la producción de bióxido de carbono (CO₂) y del consumo de oxígeno (O₂) a partir de la actividad microbiana sobre el tolueno. Estos valores se obtuvieron al restar la producción CO₂ y consumo de O₂ natural de ese suelo, registrados en los controles bajo las condiciones establecidas para cada experimento, pero sin la presencia de tolueno, de los valores correspondientes a las muestras con tolueno. En el caso del oxígeno se representa el consumo acumulado.

Con base a la producción de CO₂, la diferencia entre los experimentos con y sin adición de nutrimentos es más notable que entre los experimentos con y sin la adición del inóculo aclimatado. En cuanto al consumo de O₂ también se manifestó tal diferencia aunque no tan marcada. Esto debido a que el seguimiento de ambos parámetros se realizó en diferentes unidades experimentales (ver estrategia experimental).

Los resultados anteriores ponen de manifiesto que la velocidad de biodegradación inicial no influye por si misma en el máximo porcentaje de biodegradación alcanzado, pero si se vió reflejada sobre el tiempo en cual se alcanzó dicho porcentaje. Asimismo, la adición del inóculo aclimatado también ayudo a reducir el tiempo en alcanzar el máximo porcentaje; en tanto que el efecto de la adición de nutrimentos, básicamente se reflejo en el incremento del porcentaje de biodegradación con base al tiempo

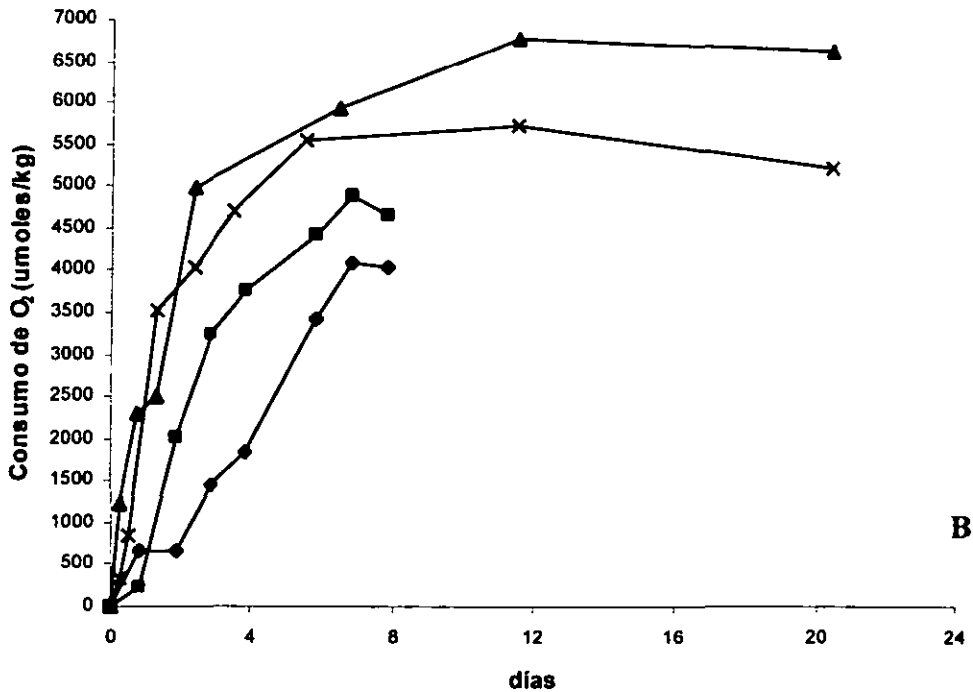
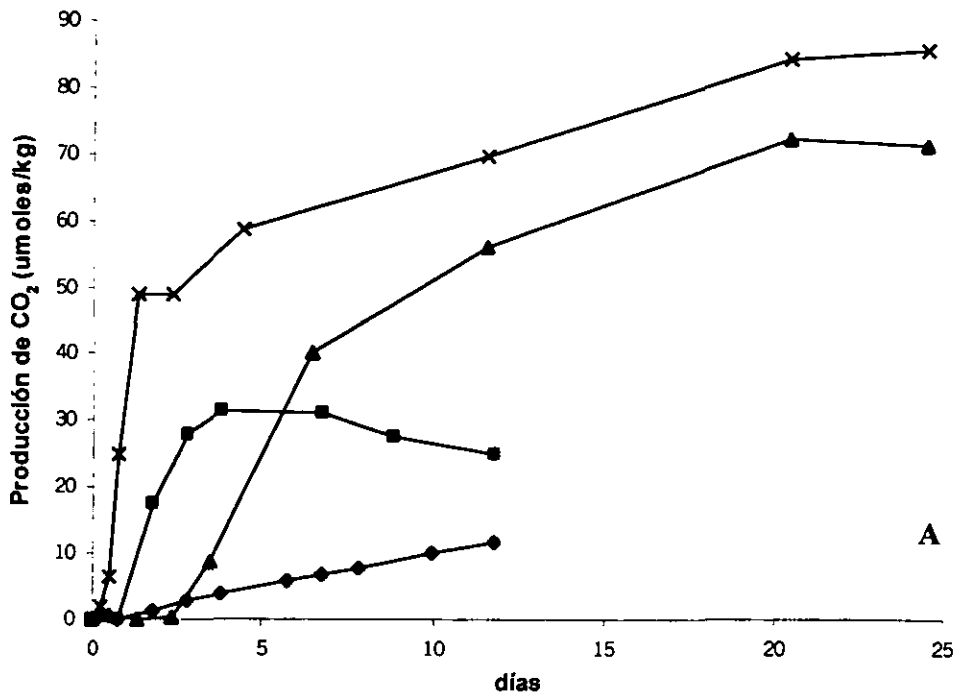


Fig. 4.13 Evolución del CO₂ acumulado (gráfica A) y del O₂ consumido (gráfica B) de durante la biodegradación de tolueno con el suelo del Sitio 1. ◆ S1c+T, ■ S1c+T+I, ▲ S1c+T+N, ✕ S1c+T+N+I.

Para ver el comportamiento de pH en el suelo a partir de la actividad de los microorganismos, se realizó el seguimiento del mismo durante el periodo de tiempo de incubación para los experimentos a los cuales se les adicionaron nutrientes, con y sin adición del inóculo aclimatado (S1c+T+N y S1c+T+N+I).

Las mediciones se realizaron después de cuantificar el tolueno residual de tolueno. Los resultados se presentan en la Fig. 4.14.

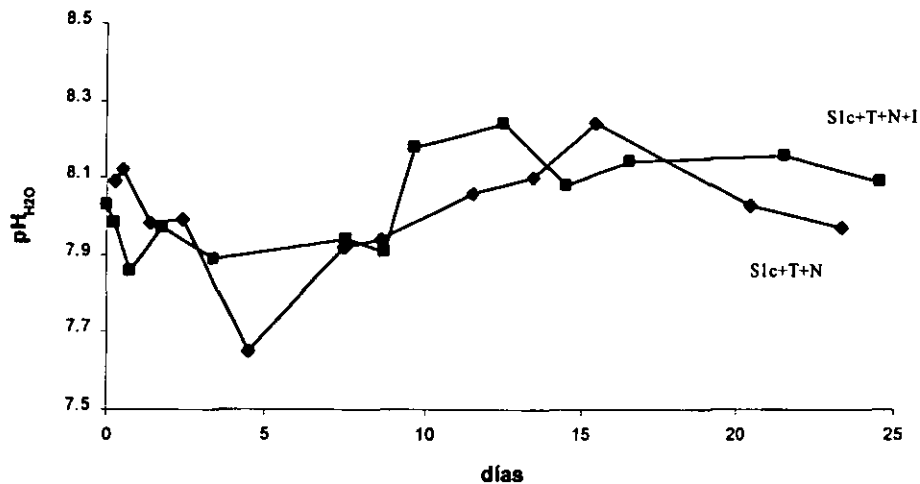


Fig. 4.14 Seguimiento de pH en los experimentos de biodegradación de tolueno con el suelo del Sitio 1 adicionados de nutrientes. ♦ S1c+T+N, ■ S1c+T+N+I.

En ambos experimentos, el pH osciló en un intervalo de 7.6 a 8.3, por lo que los valores registrados difieren poco del valor original del suelo (Tabla 4.5), cuyo valor estuvo alrededor de 8. Esto es indicio del gran poder amortiguador que presentan los suelos, para neutralizar la producción de los ácidos que se crean como resultado de la actividad metabólica y por otra parte, que este parámetro se manifiesta más bien como un factor selectivo de la población, al favorecer el desarrollo de bacterias.

Biodegradación de BTX

La biodegradación de BTX como mezcla conjunta en el suelo del Sitio 1, se esquematiza en la Fig. 4.15 y en forma individual en las Fig. 4.17. Para estos experimentos se trabajó con adición de nutrientes (N) con y sin la inoculación del cultivo aclimatado a BTX (I).

La proporción de los hidrocarburos en la mezcla fue de 1.0 : 1.0 : 0.3 : 0.3 : 0.3 para benceno, tolueno, *m*, *p* y *o*-xilenos, respectivamente. Este mismo criterio se utilizó para el resto de los experimentos.

En este caso, se puede observar que la actividad con ambos experimentos (S1c+BTX+N y S1c+BTX+N+I) se mantiene durante los primeros 6 días de incubación y después disminuye considerablemente en los días subsiguientes. Esto se ve reflejado en las velocidades iniciales registradas entre las 3.5 hrs y las 9.5 hrs de incubación (Tabla 4.12), las cuales fueron muy similares, siendo mayor la obtenida con el experimento en el cual solo se adiciono nutrimentos S1c+BTX+N, con un 14.92 mg/kg-h. Incluso los porcentajes de máxima biodegradación son muy semejantes, por lo que en este caso la diferencia tangible es el tiempo. El máximo porcentaje de biodegradación de 73.2 % del experimento con adición de inóculo S1c+BTX+N+I, se alcanzó alrededor de los cinco días y medio, mientras que para alcanzar el máximo de 86.1 % correspondiente al experimento sin inóculo S1c+BTX+N, se requirió de aproximadamente doce días, que es el doble de tiempo.

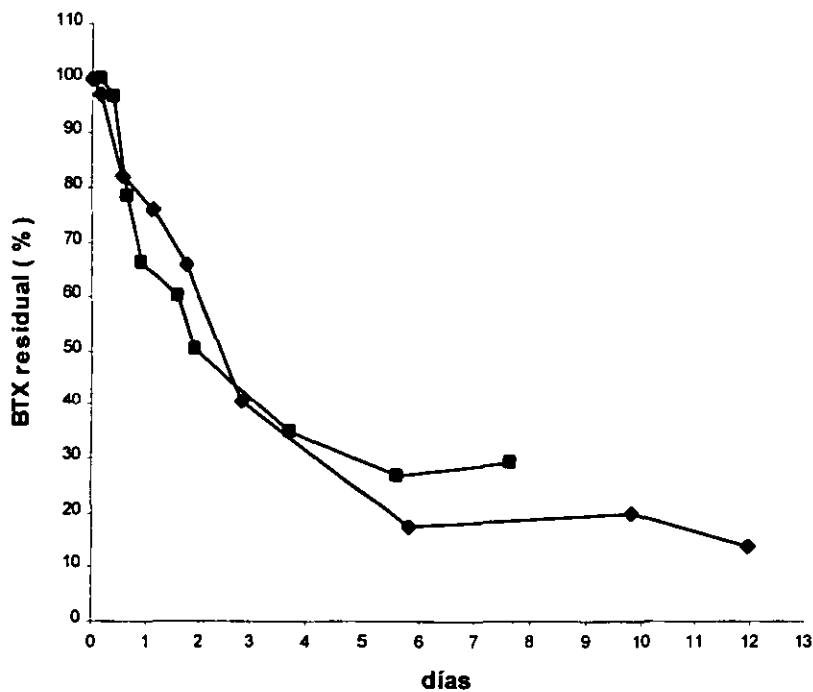


Fig. 4.15 Biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 1 (S1c). ♦ S1c+BTX+N; ■ S1c+BTX+N+I

Probablemente en ambos casos no se alcanzó un porcentaje de biodegradación mayor debido a la disminución considerable del O_2 y a la acumulación del CO_2 dentro del sistema, sobre todo cuando se adicionó el inóculo ya que aproximadamente al día de incubación el O_2 ya había disminuido drásticamente (Fig. 4.17B), mientras que al no adicionar el inóculo, tal efecto se observó aproximadamente un día y medio después.

En la Fig. 4.16 se presenta el seguimiento de la disminución del porcentaje de BTX residual en forma individual.

En el experimento sin la adición del inóculo S1c+BTX+N, se observó una mayor biodegradación inicial sobre el benceno a una velocidad de 85.32 mg/kg-h durante las primeras 3.9 hrs; mientras que para el resto de los compuestos no hubo respuesta hasta después de este periodo de tiempo (Fig. 16A). A pesar de ser el benceno el compuesto sobre el cual actuaron inicialmente los microorganismos, los porcentajes de mayor biodegradación correspondieron al conjunto de isómeros de xileno *meta* y *para* (98.1%) y al tolueno (96.1 %), alcanzados en un tiempo de 5.8 días, mientras que para el benceno y el isómero *o*-xileno se requirió de casi doce días (Tabla 4.12).

Tabla 4.12 Velocidades de biodegradación de BTX obtenidas con el suelo del Sitio 1

Experimento	Substrato	Velocidad de degradación de tolueno		Máxima biodegradación	
		mg/kg-h	Intervalo (hrs)	%	días
5. S1c+BTX+N	BTX	14.92	3.5 – 9.5	86.09	11.9
	Benceno	3.75	3.9 -- 13.7	88.6	11.9
	Tolueno	1.92	3.9 -- 13.7	96.1	5.8
	<i>m</i> y <i>p</i> -Xileno	2.77	3.9 -- 13.7	98.1	5.8
	<i>o</i> -Xileno	3.3	3.9 -- 13.7	62.8	11.9
6. S1c+BTX+N+I	BTX	11.27	3.5 – 9.5	73.2	5.6
	Benceno	2.77	3.9 -- 13.7	54.6	7.6
	Tolueno	6.81	3.9 -- 13.7	97.5	5.6
	<i>m</i> y <i>p</i> -Xileno	7.85	3.9 -- 13.7	93.3	7.6
	<i>o</i> -Xileno	3.49	3.9 -- 13.7	44.1	5.6

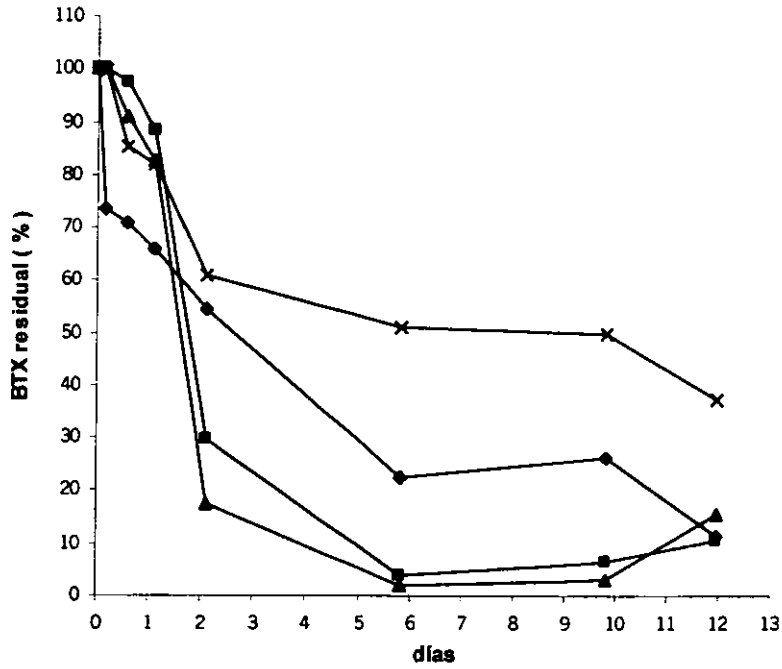
BTX: benceno, tolueno y xilenos; N: nutrientes I: inóculo aclimatado.

Los resultados obtenidos con el experimento adicionado del inóculo S1c+BTX+N+I, fueron muy similares, ya que el tolueno y los isómeros *meta* y *para* fueron los más biodegradados con un 97.5 % y 93.3 % respectivamente. El benceno fue el que más variación tuvo con respecto al experimento sin la adición del inóculo, ya que la velocidad de su biodegradación en las primeras 3.9 hrs fue de 85.32 mg/kg-h, mientras que al adicionarlo, la velocidad se redujo considerablemente a 3.28 mg/kg-h en las primeras 15.5 hrs (Fig. 4.16 A y B), y su porcentaje máximo de biodegradación resultó ser muy inferior (54.6 %). Por otra parte los tiempos en los que se alcanzaron los mayores porcentajes de biodegradación para el benceno y el isómero *orto* xileno, se vieron reducidos en comparación con los tiempos correspondientes al tolueno y al conjunto de isómeros de xileno *meta* y *para*, los cuales no cambiaron mucho con respecto al experimento sin inóculo.

En ambos casos el *o*-xileno fue el compuesto menos biodegradado, ya que apenas se alcanzó a reducir el porcentaje residual del mismo, alrededor del 50 % (Fig. 4.16 A y B).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

A) S1c+BTX+N



B) S1c+BTX+N+I

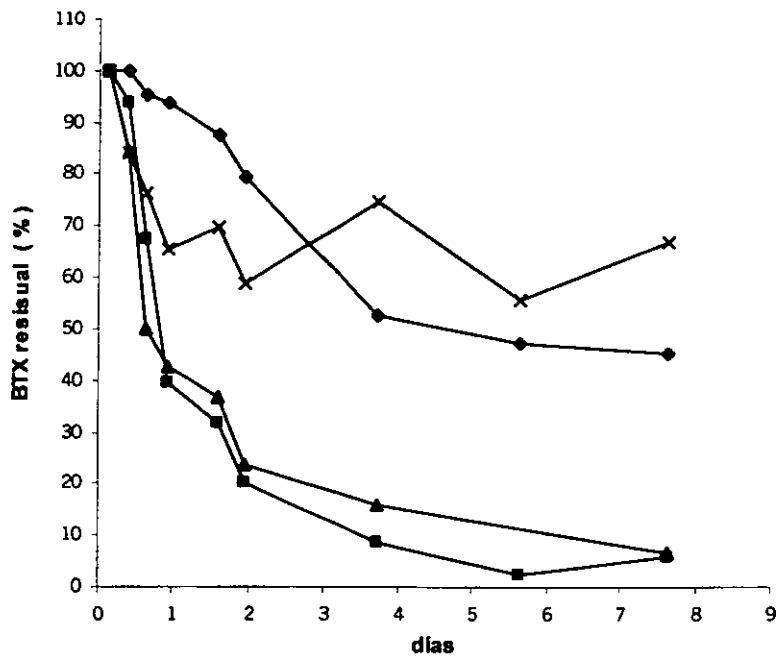
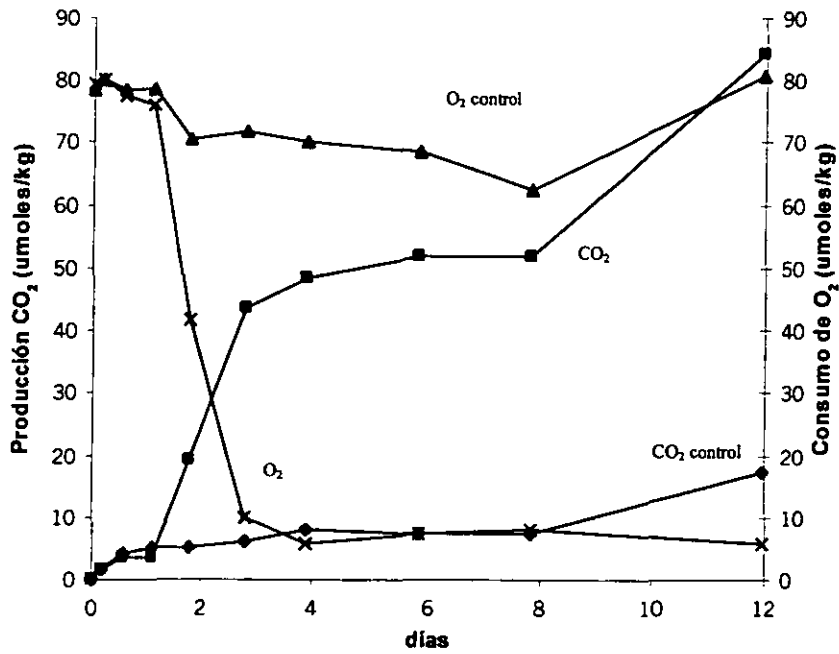


Fig. 4.16 Representación individual de la biodegradación de BTX, con el suelo del sitio 1.

◆ benceno; ■ tolueno; ▴ m y p-xileno, ✕ o-xileno

A) S1c+BTX+N



B) S1c+BTX+N+I

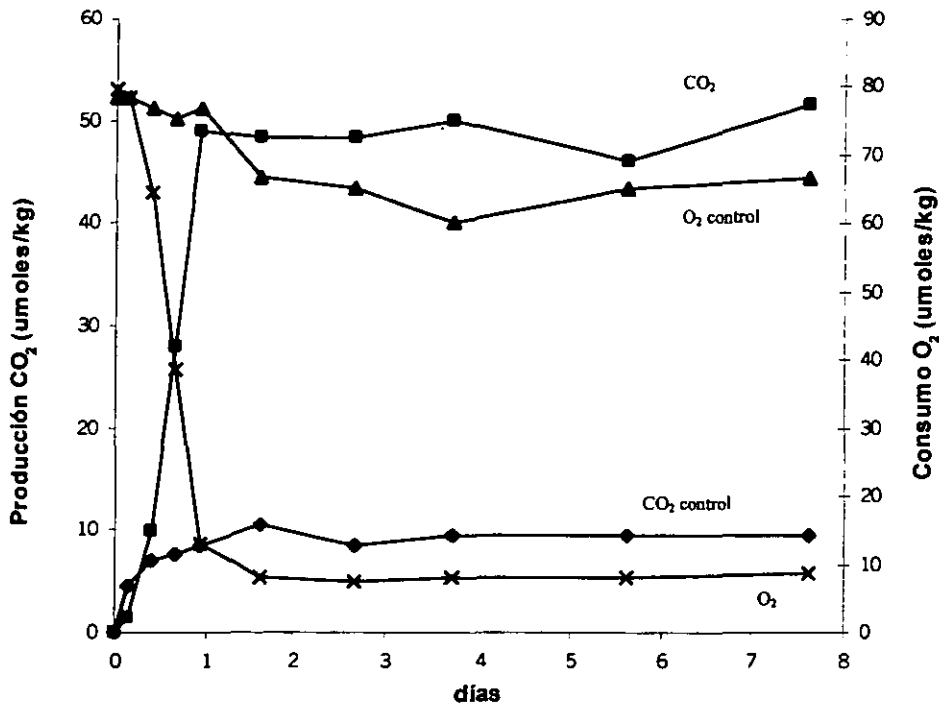


Fig. 4.17 Evolución de CO₂ acumulado y de O₂ consumido durante la biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 1 (S1c). ♦ CO₂ (control), ■ CO₂, ▲ O₂ (control), × O₂.

En estos experimentos, se puede ver que las velocidades de degradación fueron muy similares, por lo tanto el efecto en cuanto a las diferencias obtenidas en cuanto al tiempo requerido para alcanzar el máximo porcentaje de biodegradación se relacionó más con la adición o no del inóculo aclimatado. No hubo una relación en cuanto al orden de la biodegradación individual de los compuestos, y el hecho de afrontar la presencia de una mezcla de compuestos si se reflejó en la capacidad biodegradadora de la población microbiana, al tomar en cuenta el porcentaje de degradación colectivo. En cuanto a la mejor opción para el desarrollo del proceso de biodegradación se establece que en este caso la inoculación del cultivo aclimatado favoreció el proceso, bajo la expectativa de una posible limitación de oxígeno. Este aspecto cobra importancia si se recuerda que de la caracterización física de este suelo, se determinó que su porosidad resultó ser inferior al 50 %, lo cual podría presentar dicho problema durante la aplicación del proceso en campo, ya que dichas porosidades no favorecen la retención de agua y gases.

4.6.2 Biodegradación de hidrocarburos monoaromáticos volátiles en el suelo del Sitio 2

Los experimentos realizados a partir del suelo S2a del Sitio 2, sólo se llevaron a cabo con la mezcla de BTX, ya que los experimentos con tolueno en suelo del Sitio 1 sirvieron para establecer las condiciones de seguimiento de la actividad microbiana.

Los experimentos de biodegradación de la mezcla de BTX en el suelo del Sitio 2 (S2a) se corrieron sin la adición de nutrientes (N) combinados con y sin la adición del inóculo (I) aclimatado (S2a+BTX+I y S2a+BTX) y con la adición de nutrientes (fuentes de nitrógeno y fósforo) combinados con y sin la adición del inóculo aclimatado (S2a+BTX+N+I y S2a+BTX+N). Los resultados del porcentaje de biodegradación de la mezcla de BTX de cada experimento se esquematiza de manera conjunta en la Fig. 4.18, y por compuesto en la Fig. 4.19.

En la Fig. 4.18 se observa que los cuatro experimentos mantienen una relación en cuanto al la disminución del porcentaje residual de los BTX durante los primeros tres días de incubación, ya que a partir de este tiempo, el seguimiento de la actividad varió con cada experimento. El mayor porcentaje de biodegradación se alcanzó en el experimento con las bacterias nativas S2a+BTX, con un valor de 97.9 % (Tabla 4.13) y el menor de 74.2 % correspondió al experimento en el que se adicionó nutrientes e inóculo S2a+BTX+N+I.

En la Tabla 4.13 se presentan las velocidades de degradación correspondientes a los experimentos realizados con el suelo del Sitio 2, en intervalos de tiempo determinados para ser comparados.

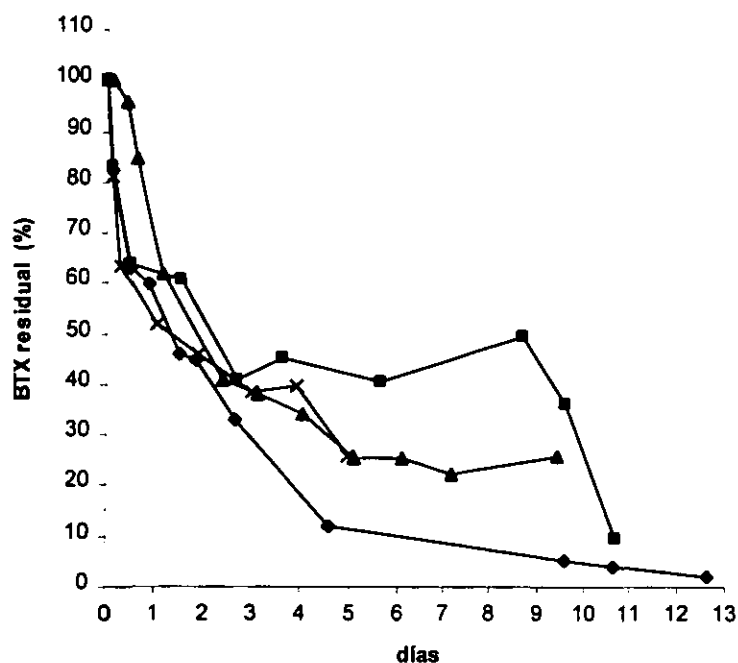


Fig. 4.18 Biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 2 (S2a).
 ◆ S2a+BTX, ■ S2a+BTX+I, ▲ S2a+BTX+N, ✕ S2a+BTX+N+I
 BTX: benceno, tolueno, xilenos; N: nutrientes; I: inóculo aclimatado

La mayor velocidad de degradación de la mezcla de BTX en un intervalo de tiempo de 3.5 a 10.5 hrs (0.15 a 0.44 días), correspondió al experimento adicionado de nutrientes e inóculo S2a+BTX+N+I con un valor de 231.89 mg/kg-h, seguida de las obtenidas para los experimentos solo con bacterias nativas S2a+BTX, con adición de inóculo sin nutrientes S2a+BTX+I y finalmente con la adición de nutrientes S2a+BTX+N. El orden de estas velocidades no se reflejó en los máximos porcentajes de biodegradación. Y si bien los más bajos correspondieron a los experimentos adicionados de nutrientes, se puede ver que en general del 75 al 80 % de biodegradación obtenido en estos casos, se presentó en un periodo de tiempo entre los 5 y 7 días que es inferior al registrado para las pruebas sin la adición de nutrientes, para los cuales se requirieron de 12 días. Lo cual cobra importancia cuando se trata de tener en cuenta el tiempo como un factor primordial en la toma de decisiones.

Esta respuesta pudo haber sido el reflejo de una limitación de oxígeno en el sistema, aspecto que también debe ser tomado en cuenta pues también el suelo S2a del Sitio 2 resultó ser un tanto deficiente en el aspecto de porosidad.

Tabla 4.13 Velocidades de biodegradación de BTX obtenidas con el suelo del Sitio 2

Experimento	Substrato	Velocidad de degradación de BTX		Máxima degradación	
		mg/kg-h	Intervalo (hrs)	%	Días
7.- S2a+BTX	BTX	77.01	3.5 – 10.5	97.9	12.61
	Benceno	36.43	3.5 – 6.9	99.2	12.6
	Tolueno	6.15	3.5 – 6.9	99.2	12.6
	<i>m y p</i> -Xilenos	0.61	3.5 – 6.9	96.5	12.6
	<i>o</i> -Xileno	2.52	3.5 – 6.9	81.5	12.6
8.-S2a+BTX+I	BTX	57.02	3.5 – 10.5	90.5	10.7
	Benceno	165.43	3.5 – 7	94.6	10.7
	Tolueno	8.14	3.5 – 7	95.6	10.7
	<i>m y p</i> -Xilenos	0.53	3.5 – 7	96.5	10.7
	<i>o</i> -Xileno	0.07	3.5 – 7	68.8	10.7
9.- S2a+BTX+N	BTX	23.32	3.5 – 10.5	77.9	7.2
	Benceno	6.55	3.5 – 7	67.3	7.2
	Tolueno	17.09	3.5 – 7	83.6	7.2
	<i>m y p</i> -Xilenos	13.36	3.5 – 7	90.3	7.2
	<i>o</i> -Xileno	9.77	3.5 – 7	85.6	7.2
10.- S2a+BTX+N+I	BTX	231.89	3.5 – 10.5	74.2	4.9
	Benceno	100.37	3.5 – 7	57.7	4.9
	Tolueno	67.5	3.5 – 7	83.2	4.9
	<i>m y p</i> -Xilenos	34.19	3.5 – 7	92.9	4.9
	<i>o</i> -Xileno	30.47	3.5 – 7	85.5	4.9

BTX: benceno, tolueno y xilenos; N: nutrientes I: inóculo aclimatado.

En la Fig. 4.19 se esquematiza la biodegradación en forma individual, obtenida con cada uno de los experimentos realizados con el suelo del Sitio 2.

En cuanto a la velocidad de biodegradación de cada compuesto (Tabla 4.13), se puede ver que el benceno fue el compuesto para el cual se registraron las mayores velocidades en el intervalo de tiempo de 3.5 a 7 hrs (0.15 a 0.29 días) excepto en el experimento adicionado de nutrientes S2a+BTX+N, en donde fue superada por la velocidad registrada para el tolueno que fue la velocidad más alta. Los xilenos en general no mantuvieron un orden preferente entre ellos, pero sí fueron las velocidades más bajas en comparación con el tolueno y el benceno, incluso cuando se adicionó el inóculo S2a+BTX+I, al parecer el *o*-xileno es biodegradado hasta que el porcentaje del resto de los compuestos se ve reducido considerablemente. Si bien en estos casos tampoco se vieron reflejadas las velocidades en los porcentajes de biodegradación, si se puede hablar de una preferencia

inicial por parte de los microorganismos hacia el benceno y el tolueno, sin embargo, los porcentajes de biodegradación finales más altos correspondieron al tolueno y al conjunto de isómeros de xileno *meta* y *para*, exceptuando los porcentajes obtenidos en el experimento con las bacterias nativas S2a+BTX, los cuales correspondieron al benceno y tolueno.

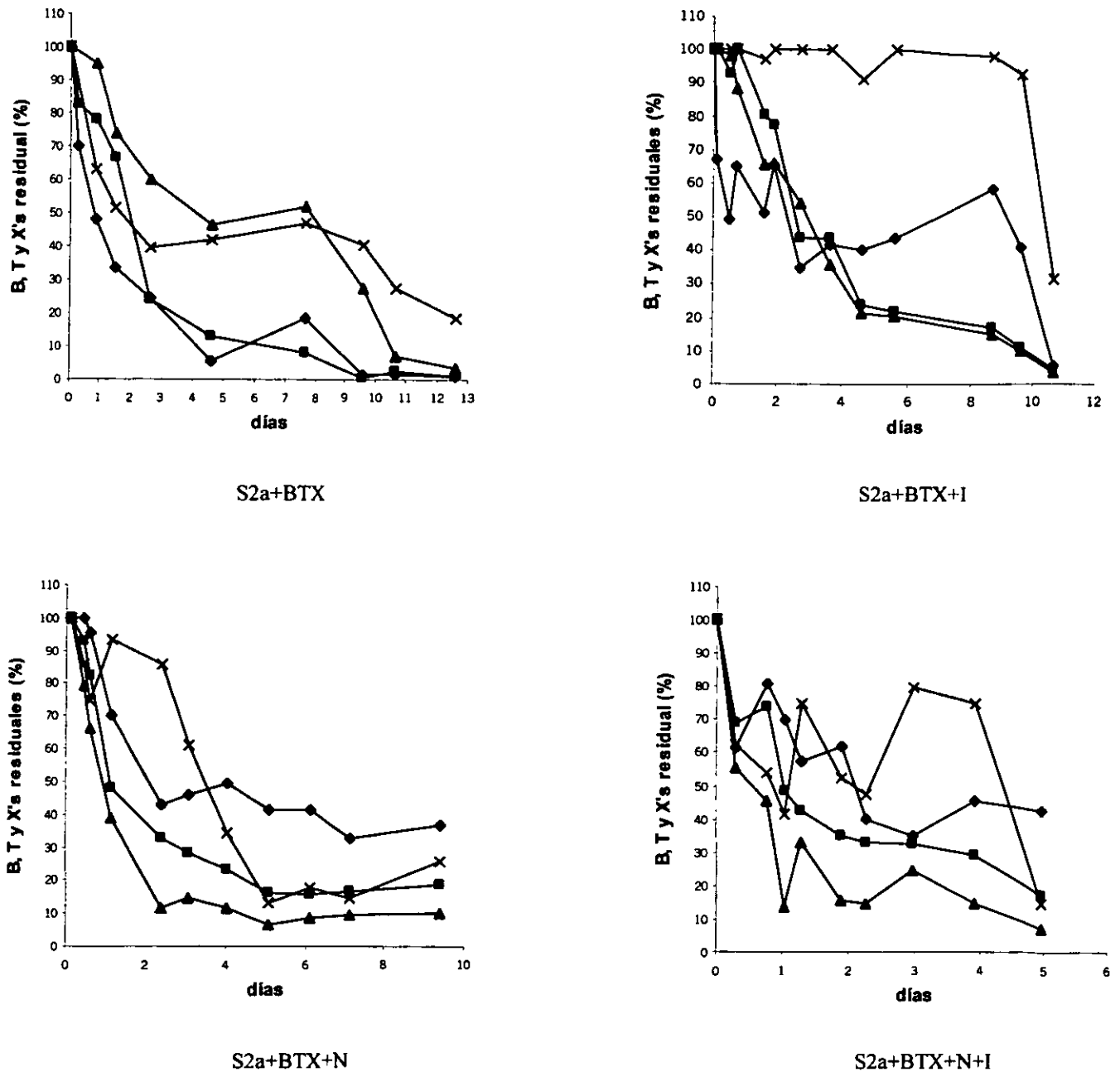
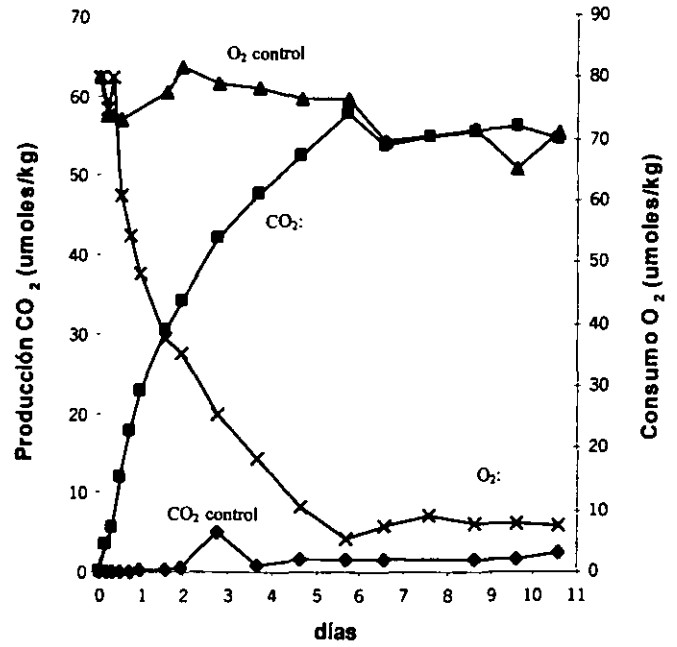
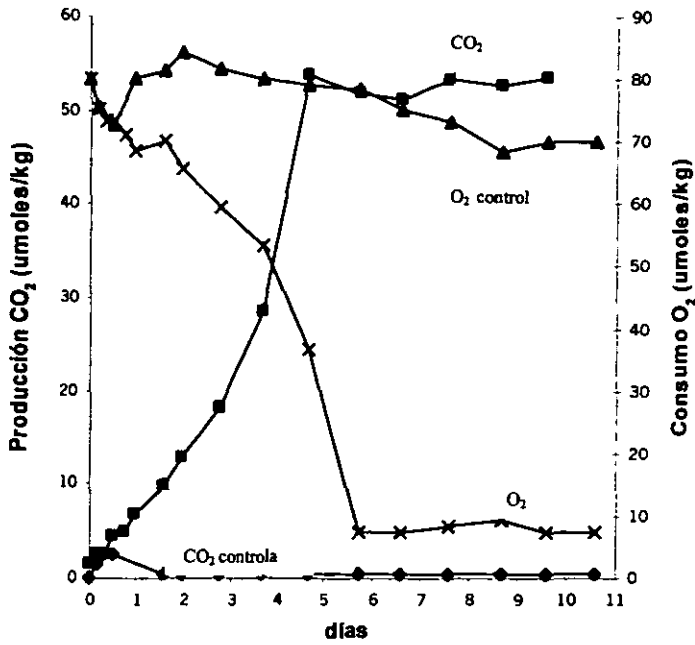


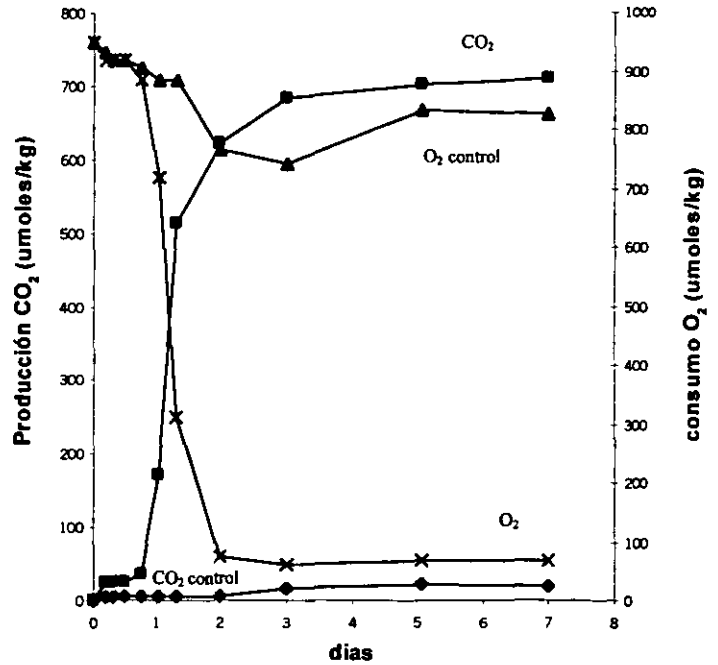
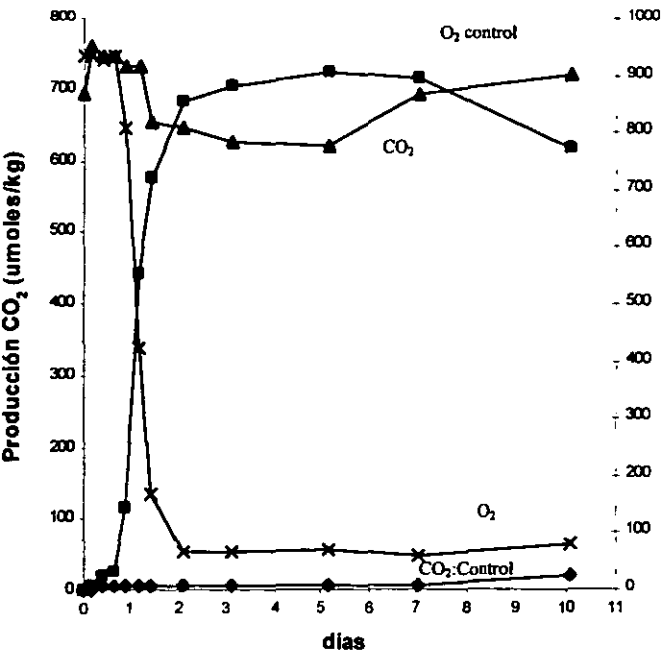
Fig. 4.19 Representación individual de la biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 2.

◆ Benceno, ■ Tolueno, ▲ *m* y *p*-Xilenos, ✕ *o*-Xileno.



S2a+BTX

S2a+BTX+I



S2a+BTX+N

S2a+BTX+N+I

Fig. 4.20 Evolución del CO₂ acumulado y del O₂ consumido durante la biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 2. ♦ CO₂ (control), ■ CO₂, ▲ O₂ (control), ✕ O₂.

En la Fig. 4.21, se esquematiza la evolución del CO₂ producido y del O₂ consumido para los cuatro experimentos. Los controles para CO₂ (♦) se mantuvieron con una producción casi nula, en tanto que los correspondientes al consumo de O₂ (▲) mantuvo su concentración inicial aunque con cierta disminución con respecto al tiempo, sobre todo en los experimentos con adición de nutrientes (S2a+BTX+N y S2a+BTX+N+I), esto como indicio de que la actividad del suelo es mínima, bajo las condiciones reportadas en la caracterización de este suelo. Por lo que cabe resaltar que la evolución de ambos parámetros es debida a la actividad biodegradadora de los microorganismos hacia los BTX.

Dicha actividad y sobre todo en el periodo en que es más acentuada, coincide con el intervalo de tiempo en que se da tanto el mayor consumo de O₂ (✖) como la mayor producción de CO₂ (■). En el caso del experimento con las bacterias nativas S2a+BTX, dicho periodo corresponde a los primeros seis días de actividad; al adicionar el inóculo aclimatado S2a+BTX+I se mantuvo el intervalo en seis días. Cuando se adicionaron nutrientes S2a+BTX+N y nutrientes e inóculo S2a+BTX+N+I, el periodo se redujo considerablemente a dos días.

Esto sugiere que en los experimentos en los que se adiciono nutrientes, los microorganismos agotaron muy pronto el oxígeno presente dentro del sistema, lo cual pudo haber limitando así su actividad. Por lo tanto, los bajos porcentajes de degradación obtenidos bajo estas condiciones, pudieron ser el resultado de una limitación de oxígeno y no por la falta de capacidad de los microorganismos para degradar los hidrocarburos.

Si bien las pruebas realizadas en el suelo del Sitio 2, no dan una respuesta muy clara con respecto a las mejores condiciones para promover la biodegradación en este mismo, por el problema de limitación de oxígeno, se puede afirmar que la adición de nutrientes en conjunto con un buen porcentaje de humedad, favorecen el proceso de biodegradación de los hidrocarburos estudiados.

4.6.3 Cuantificación de bacterias

En la Tabla 4.13. se presentan los resultados obtenidos para la cuenta de microorganismos en los experimentos realizados con el suelo del Sitio 1. En algunos casos no fue posible realizar esta cuantificación, debido al tiempo que había pasado.

Los valores obtenidos para el conteo total de bacterias, resultaron ser muy semejantes a los obtenidos durante la caracterización, y solo se puede ver que en los experimentos con tolueno y adición de nutrientes (S1c+T+N y S1c+T+N+I) y con la mezcla de BTX y adición de nutrientes (S1c+BTX+N) se incrementó el número de bacterias heterótrofas y degradadoras al final del experimento.

Tabla 4.13 Cuantificación de bacterias en los experimentos de biodegradación con el suelo del Sitio 1

Experimento	Cuenta total (bacterias/g)		Heterótrofas (ufc/g)		Degradadoras de tolueno (ufc/g)		Degradadoras de BTX (ufc/g)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
S1c+T	5.7E+11	--	3.3E+04	9.2E+05	--	--	--	--
S1c+T+I	3.9E+11	--	1.5E+06	9.7E+05	2E+02	--	--	--
S1c+T+N	1.1E+12	2.7E+12	2.5E+04	5.4E+05	6.3E+02	3.7E+03	--	--
S1c+T+N+I	1.3E+12	2.2E+12	3.3E+05	5.9E+06	--	1.2E+03	--	--
S1c+BTX+N	--	--	1.3E+06	1.9E+06	--	--	6.3E+04	2.32E+07
S1c+BTX+N+I	--	--	4.6E+06	1.4E+07	--	--	3.3E+04	4.1E+04

BTX: benceno, tolueno y xilenos; N: nutrientes; I: inóculo aclimatado

El conteo de heterótrofas fue el que se aplicó a todos los experimentos, y en general también se registró un incremento en la población, con excepción del experimento con tolueno y adición del inóculo (S1c+T+I).

El incremento obtenido en la determinación para degradadoras de BTX fue más evidente en el experimento con bacterias aclimatadas y adición de nutrientes, y esto pudiera ser el reflejo de una estimulación de bacterias degradadoras de BTX que se encontraban en un estado de letargo, mientras que en el experimento con adición de nutrientes e inóculo el incremento fue mínimo. Esto debido a que pudo presentarse cierta competencia entre la población autóctona y el inóculo, o porque cierta proporción de bacterias inoculadas no logro adaptarse al cambio del medio de cultivo líquido al suelo, a pesar de provenir de la misma fuente (el suelo).

Los valores correspondientes a los parámetros microbiológicos para las pruebas con el suelo del Sitio 2 se presentan en la Tabla 4.14. En este caso se omitió el conteo de bacterias totales, debido a que no fue un parámetro que aportara mayor información.

En este caso, también se puede ver un incremento general tanto de la población heterótrofa como de la degradadora de BTX.

Una situación que resalta en las Tablas 4.13 y 4.14 es que la población de bacterias heterótrofas está dentro de órdenes de magnitud que se han reportado en otros estudios, que van de 10^2 a 10^6 ufc/g en un intervalo de profundidad de los 55 a los 65 m (Brockman, 1992); por su parte Kieft *et al.*, (1993) reportaron intervalos que van desde 2 a 10^7 ufc/g, en profundidades que van de los 130 a los 450 m de profundidad. Además, el

incremento observado hacia el final de los experimentos aunque sea mínimo, representa un incremento real y no solamente un recambio en la población.

Tabla 4.14 Cuantificación de bacteria en los experimentos de biodegradación con el suelo del Sitio 2 (S2a)

Experimento	Heterótrofas (ufc/g)		Degradadoras de BTX (ufc/g)	
	Inicial	Final	Inicial	Final
S2a+BTX	7.2E+05	4.2E+06	1.1E+05	3.2E+05
S2a+BTX+I	1.8E+06	4.8E+06	5.9E+05	--
S2a+BTX+N	1.8E+04	1.8E+06	--	6E+05
S2a+BTX+N+I	5.5E+04	--	1.1E+04	--

BTX: benceno, tolueno y xilenos; N: nutrientes; I: inóculo aclimatado

4.7 EVALUACIÓN DEL PROCESO Y PERSPECTIVAS DE SEGUIMIENTO

El proceso de biodegradación sobre los hidrocarburos monoaromáticos volátiles BTX con el suelo del Sitio 1, el cual corresponde a un suelo de tipo industrial por estar dentro de una terminal de almacenamiento de combustibles, es factible bajo las condiciones intrínsecas que presenta el lugar. Sin embargo, a través del tiempo se ha mantenido cierto grado de contaminación residual la cual no se ha logrado eliminar, esto como posible resultado de que la fuente contaminante no ha sido totalmente eliminada o reparada, o porque existen otras que no han sido detectadas. Otras de las posibles explicaciones serían; la falta de una estimulación de la población autóctona con el incremento de nutrientes y el mantenimiento de una buena humedad; la disponibilidad de los contaminantes así como la falta de una buena oxigenación.

La importancia de la limpieza de este suelo en sí, tal vez no radique en el uso del mismo, pero sí en el hecho de que puede constituirse como una fuente de contaminación de mantos acuíferos, como resultado de la lixiviación o del transporte tanto vertical como horizontal de los contaminantes. Sin embargo, el recurso de una posible inoculación del suelo junto con un aprovisionamiento de nutrientes para elevar el porcentaje de biodegradación y de limpieza del mismo, debe ser evaluado tomando en cuenta los aspectos de riesgo, características del suelo, factibilidad y costos. En cuanto a las características y la factibilidad, este trabajo a aportado ya cierta información que puede ser tomada en cuenta.

En el caso del suelo del Sitio 2, también el proceso de biodegradación resultó ser factible bajo las condiciones intrínsecas del mismo suelo. La diferencia con respecto al Sitio 1, es que en este caso si es necesaria una acción más rápida, por el hecho de ser un suelo que se encuentra en tierras muy cercanas a un río de temporal y porque el manto acuífero que es muy somero, ya está contaminado. Por lo que la primera acción que se tomó fue la extracción de producto libre (gasolina).

Como una propuesta para reducir la concentración de los monoaromáticos volátiles en este suelo en un periodo de tiempo más corto, está la inoculación con bacterias aclimatadas junto con la adición de nutrimentos. No obstante, habría que tomar en cuenta que para poder llevar a cabo dicho procedimiento, se tendría que analizar más la situación, para no repercutir en una contaminación del manto acuífero con exceso de nutrimentos y de las mismas bacterias adicionadas, que pudieran incrementar los problemas de recuperación tanto del suelo como del agua del manto.

Si bien en este trabajo se ha visto que el proceso de biodegradación es factible de llevarse a cabo en el suelo de ambos sitios, no se debe de tomar como un estudio final para la determinación de los pasos a seguir dentro del establecimiento de una tecnología de biorremediación en ambos suelos. Ya que es necesario llevar a cabo otros estudios complementarios que puedan evaluar entre otras cosas, la movilidad y disponibilidad de los nutrimentos adicionados, la supervivencia, aclimatación, movimiento y fijación de las bacterias inoculadas, la repercusión en el proceso por los cambios de humedad, así como el posible desarrollo o aplicación de algún método para introducir oxígeno.

Estos estudios podrían ser realizados en columnas empacadas a partir de núcleos inalterados extraídos a partir de los mismos sitios de estudio. Todo esto con la finalidad de comprender más el papel que desempeñan los microorganismos en un medio tan complejo como lo es el suelo y poder determinar las mejores condiciones bajo las cuales se pueden obtener mejores resultados en periodo de tiempo corto.

5. CONCLUSIONES

- ◆ El suelo del Sitio 1 (terminal de almacenamiento) presentó una textura de tipo franco arenosa y se clasificó como una arena mal graduada, lo cual indica que no presenta una buena distribución de los diferentes tamaños de partícula, cuyo tamaño efectivo en este suelo favorece la permeabilidad. La textura del suelo del Sitio 2 (fuga de un poliducto) fue de tipo arena y se clasificó como arena bien graduada y cuyo tamaño efectivo de partícula también favorece la permeabilidad.

- ◆ La caracterización física y química realizada para ambos suelos reflejó las condiciones típicas de los suelos arenosos de zonas calientes:
 - colores claros que impiden gran absorción de calor
 - baja capacidad de retención de agua
 - densidades características de suelos minerales
 - bajo contenido de nutrimentos, materia orgánica y carbono orgánico.

- ◆ La baja conductividad eléctrica fue un indicio de que ambos suelos no presentaron problemas de salinidad.

- ◆ La variación de tonos del color pardo a lo largo de los perfiles en ambos sitios, es el reflejo del bajo contenido de materia orgánica y de carbono orgánico. Así como de la presencia de un sistema de drenado intermedio

- ◆ La presencia de bacterias degradadoras de tolueno en las muestras y a lo largo de los perfiles de suelo en ambos sitios, es un indicio del proceso de adaptación de las mismas como medio de supervivencia y de la manifestación de la posibilidad de desarrollar el proceso de biodegradación en la zona vadosa de estos suelos.
- ◆ Los parámetros más favorables para la supervivencia de los microorganismos, se encuentran a una profundidad de 40 a 60 cm para el caso del suelo del Sitio 1, mientras que para el suelo del Sitio 2 se presentan entre los 10 y los 20 cm de profundidad.
- ◆ A través de las mediciones de CO₂, se comprobó que las cepas de colección *Pseudomonas putida* ATCC 33015 y *Rhodococcus zopfii* ATCC 51349 sí mostraron capacidad para metabolizar benceno y tolueno en medio líquido, a diferencia del cultivo PTN50 aislado en el laboratorio a partir de un canal de aguas residuales en donde se detectó la presencia de BTEX.
- ◆ La unidad experimental (microcosmo) seleccionada para los experimentos de biodegradación, cumplió con el requerimiento indispensable para evitar la pérdida de los compuestos por volatilización. Con lo cual se asegura que las respuestas obtenidas fueran completamente el resultado de la actividad microbiana dentro del sistema.
- ◆ La población nativa presente en el suelo de ambos sitios, fue capaz de biodegradar los hidrocarburos monoaromáticos volátiles BTX bajo las condiciones intrínsecas de los mismos, obteniendo incluso en la mayoría de los casos los más altos porcentajes de biodegradación, aunque en periodos más largos.
- ◆ El efecto de la adición del inóculo aclimatado en el proceso de biodegradación de tolueno con el suelo del Sitio 1, se vio reflejado en la disminución del tiempo requerido para alcanzar el máximo porcentaje de biodegradación, mientras que el suministro de nutrientes ayudó a elevar tal porcentaje de biodegradación alcanzado.
- ◆ La biodegradación de la mezcla de BTX con el suelo del Sitio 1 adicionado de nutrientes, se vio favorecida con respecto al tiempo, al adicionar el inóculo aclimatado. Individualmente el tolueno y el conjunto de isómeros *meta* y *para*-xilenos, fueron los más biodegradados, seguidos por el benceno y finalmente por el isómero *orto*-xileno.

- ◆ El efecto tanto de la adición de nutrientes como de la inoculación con el cultivo aclimatado en el proceso de biodegradación de BTX con el suelo del Sitio 2, únicamente se vió reflejado en la disminución del tiempo en el cual se alcanzó el máximo porcentaje de biodegradación. Individualmente el tolueno y el conjunto de isómeros *meta* y *para*-xilenos, fueron los más biodegradados, seguidos por el isómero *orto*-xileno y el benceno.
- ◆ La tendencia de producción de CO₂ coincide con la disminución del porcentaje residual de los contaminantes, con lo que se confirma su efectividad en la estimación de la actividad degradadora microbiana en los suelos no saturados.
- ◆ La diferencia en la respuesta obtenida en los suelos de ambos sitios, refleja la importancia de que cada suelo representa un hábitat completamente distinto, por ello es conveniente estudiar las condiciones particulares de cada sitio para establecer las mejores condiciones que favorezcan el proceso de biodegradación.

5.1 RECOMENDACIONES

- ◆ Si bien se comprobó que el proceso de biodegradación de los hidrocarburos monoaromáticos volátiles BTX, es factible de llevarse a cabo en el suelo de ambos sitios, es necesario llevar a cabo otros estudios complementarios para mejorar la evaluación y la aplicación del proceso
- ◆ Se recomiendan estudios enfocados a comprender más el papel que desempeñan los microorganismos en un medio tan complejo como lo es el suelo y poder determinar las mejores condiciones bajo las cuales se pueden obtener mejores resultados en periodo de tiempo corto. Como lo serían, la movilidad y disponibilidad de los nutrientes adicionados; la supervivencia, aclimatación, movimiento y fijación de las bacterias inoculadas; el papel de las interacciones entre las diferentes poblaciones; la repercusión en el proceso por los cambios de humedad, así como el posible desarrollo o aplicación de algún método para introducir oxígeno.
- ◆ Dichos estudios podrían desarrollarse ya a nivel de columnas empacadas, que sería el siguiente nivel de escalamiento dentro del área de biorremediación.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera H.N., 1989. Tratado de Edafología de México. Tomo 1. Laboratorio de Investigación de Edafología. Depto. de Biología. Facultad de Ciencias, UNAM, México. pp: 1 - 96.
- Alexander M., 1980. Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editor, S.A., México. pp: 11 - 46, 127 - 352.
- Allison L.E., Berenstein L., Bower C.A., Brown J.W., Fireman M., Hatcher J.T., Hayward H.E., Pearson G.A., Reeve R.C., Richards L.A. y Wilcox L.V., 1985. Diagnóstico y Rehabilitación de Suelos Salinos Sódicos. Editorial Limusa, México. Editado por Richards L.A. 6a Edición. pp: 8, 18, 25, 112, 114, y 130.
- Andrzejak R., Tomczyk J., Antonowicz J., Lewczuk E., Beck B. and Smolik R., 1992. Prospective examinations concerning the effect of exposure to aromatic hydrocarbons on health status (abstrac). **Med. Pr.** 43(6): 531 - 535.
- Anid P.J., Alvarez P.J.J. and Vogel T.M., 1993. Biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in aquifer columns amended with hydrogen peroxide and nitrate. **Water Res.** 27(4): 685 - 691.

- APHA-AWWA-WPCF., 1990. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Díaz Santos Editores. España. Cap. 9.
- Berry-Spark K., Barker J.F., Major D. and Mayfield C.I., Remediation of gasoline-contaminated groundwaters: a controlled field experiment. Documento proporcionado por el autor.
- Bianchi-Mosquera G.C., Allen-King R.M. and Mackay D.M., 1994. Enhanced Degradation of Dissolved Benzene and Toluene Using a Solid Oxygen-Release Compound. *GWMR*. pp: 120 a 128.
- Blake G.R. and Hartge K.H., 1986. Bulk Density. In *Methods of Soil Analysis Part 1. Physical and mineralogical Methods*. Ed. por Klute A., American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publisher, Madison Wisconsin USA. 2a Edición. pp: 363 - 376.
- Bowles J.E., 1992. *Engineering Properties of Soil and Their Measurement*. Editorial McGraw Hill. Inc. US. 4a edición.
- Brockman F.J., Kieft T.I., Fredricson J.K., Bjornstad N.N., Li S.W., Spangenburg W. and Long P.E., 1992. Microbiology of Vadose Zone Paleosols in South-Central Washington State. *Microb. Ecol.* **23**: 279 - 301.
- Brown-Woodman P.D.C., Webster W.S., Picker K. and Rotchie H.E., 1991. Embryotoxicity of xylene and toluene: an in vitro study. (Abstrac). *Industrial Health*. **29**(4): 139 - 152.
- Carter M.R. and Ball B.C., 1993. Soil porosity. In *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Edited by Carter M.R. for Canadian Society of Soil Science. Ediciones Lewis Publisher. pp: 581 - 587.
- Clark F.E., 1971. Bacterias del suelo. En *Biología del Suelo*. Editado por Burges A. y Raw F. Ediciones Omega, Barcelona. pp: 27 - 68.
- Cotwell F.S., 1989. Microbiological Comparison of Surface Soil and Unsaturated Subsurface Soil from a Semiarid High Desert. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(9): 2423 - 2423.
- Crz. A., 1999. La contaminación industrial amenaza un monumento histórico. *El Universal*. Abril 5.
- Cullimore D.R., 1992. *Practical Manual of Groundwater Microbiology*. Ediciones Lewis Publisher. U.S. pp: 234 - 276.
- Culley J.L.B., 1993. Density and Compressibility. In *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Edited by Carter M.R. for Canadian Society of Soil Science. Ediciones Lewis Publisher. pp: 529 - 540.

- Danielson R.E. and Sutherland P.L., 1986. Porosity. In *Methods of Soil Analysis Part 1. Physical and mineralogical Methods*. Edited by Klute A., American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publisher, Madison Wisconsin USA. 2a edición. pp: 443 - 461.
- De la Garza M.R.E., 1992. Determinación de algunas propiedades fisicoquímicas y su comportamiento con relación al clima y la fisiografía en suelos del norte del estado de Nuevo León. Tesis. UNANL. Facultad de Ciencias Biológicas. pp: 19 - 27, 48 - 59 y 62 - 110.
- Don L.L. y Judson S., 1992. *Fundamentos de Geología Física*. Editorial Limusa, México. 11a edición. Cap. 4.
- Edwards E.A., Wills L.E., Reinhard M. And Grbic-Galic D., 1992. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(3): 794 - 800.
- Engineering and Design., 1965. *Laboratory Soils Testing*. Headquarters Departmen of the Army Office of the Chief of Engineers. 1965. Appendix V.
- EPA Método 3810. "Headspace". Septiembre de 1986.
- EPA Método 8020. "Aromatic Volatile Organics by Gas Chromatography". Noviembre 1990.
- Findlay R.H., King G.M. and Watling L., 1989. Efficacy of Phospholipid Analysis in Determinin Microbial Biomass in Sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(11): 2888 - 2893.
- FitzPatrick E.A., 1980. *Suelos, su formación, clasificación y distribución*. Editorial Continental, México. Cap. 1, 2 y 4.
- Foth H.D., 1985. *Fundamentos de la ciencia del suelo*. Editorial Continental, México. Cap. 1, 3, 4, 7 y 9.
- Gardner W.H., 1986. Water Content. In *Methods of Soil Analysis Part 1. Physical and mineralogical Methods*. Edited by Klute A., American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publisher, Madison Wisconsin USA. 2a Edición. pp: 493 - 544.
- Gavande S.A., 1972. *Física de Suelos Principios y Aplicaciones*. Editorial Limusa, Noriega Editores, México. Cap. 2, 4 y 7.

- Gee G.W. and Bauder J.W., 1986. Particle-Size-Analysis., en *Methods of Soil Analysis Part 1. Physical and mineralogical Methods*. Ed. por Klute A., American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publisher, Madison Wisconsin USA. 2a Edición. pp: 383 - 411.
- Germida J.J., 1993. Cultural Methods for Soil Microorganisms. In *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Edited by Carter M.R. for Canadian Society of Soil Science. Ediciones Lewis Publisher. pp: 263 - 276.
- Gilbert E.R., 1967. Los Suelos; su origen, constitución y clasificación. *Introducción a la Edafología*. Ediciones Omega, Barcelona. 2a Edición. pp: 219 - 222; 241 - 245; 248 - 279.
- Gorshkov G. y Yakushova A., 1970. *Geología General*. Editorial Mir. Moscú. pp: 77 - 80.
- Gudiño. A., 1999. Acolman Méx. La Jornada. Enero 6. pp: 29.
- Hanson K.G., Desai J.D., and Desai A.J., 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biochemistry Techniques*. 7(10): 745 - 748.
- Hendershot W.H., Lalonde H. and Duquette M., 1993. Soil Reaction and Exchangeable Acidity. In *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Edited by Carter M.R. for Canadian Society of Soil Science. Ediciones Lewis Publisher. pp: 141 - 146.
- Hutchins S.R., 1991. Optimizing BTEX biodegradation under denitrifying conditions. (Abstrac). *Environ. Toxicol Chem.* 10(11): 1437 - 1448.
- Iturbe A.R. y Silva M.A.E., 1992. Agua subterránea y contaminación. Series del Instituto de Ingeniería No. 539. UNAM. pp: 2 - 3.
- Jackson M.L., 1982. *Análisis Químico de Suelos*. Ediciones Omega, Barcelona 4a edición. Cap. 3, 7, 8 y 9.
- Janzen H.H., 1993. Soluble Salts. In *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Edited by Carter M.R. for Canadian Society of Soil Science. Ediciones Lewis Publisher. pp: 161 - 166.
- Juarez B.E. y Rico R.A., 1997. *Mecánica de Suelos*. Tomo 1. Fundamentos de Mecánica de Suelos. Editorial. Limusa, Noriega Editores, México 3a edición. pp: 97 - 121, 149 - 163.
- Kananova M.M., 1982. *Materia Orgánica del Suelo, su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Ediciones Oikos-tau. S.A., Barcelona. pp: 21 - 62, 111 - 156.

- Kieft T.L., Army P.S., Brockman F.J., Fredricson J.K., Bjornstad B.N. and Rosacker L.L., 1993. Microbial Abundance and Activities in Relation to Water Potential in the Vadose Zones of Arid and Semiarid Sites. *Microb. Ecol.* **26**(1): 59 - 78.
- Klute A., 1986. Water Retention: Laboratory Methods. In *Methods of Soil Analysis Part 1. Physical and mineralogical Methods*. Edited by Klute A., American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publisher, Madison Wisconsin USA. 2a Edición. pp: 635 - 662.
- Kunc F. and Macura J., 1998. Mechanisms of adaptation and selection of microorganisms in the soil. In *Developmen in agricultural and managed-forest ecology 17: Soil microbial associations control of structures and funtions*. Edited by Vancura V. and Kunc F. Ediciones, ELSEVIER. Amsterdam, NY., Tokyo. pp. 283 - 298.
- Lee S., Bollinger J., Bezdicek D. And Ogram A., 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a completitive quantitative PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **2**(10): 3787 - 3793.
- Lemon L.A., Barbaro J.R. and Barker J.F., 1989. Biotransformation of BTEX Under Anaerobic Denitrifying Conditions: Evaluation of Field Observations. *Proceedings of the FOCUS Conference On Eastern Regional Ground Water Issues*. October 17. Valhalla Inn Kitchener, Ontario, Canada. Published by National Water Well Association.
- López R.A., 1999. Pediran tabasqueños a PEMEX pago de indemnizaciones. *La Jornada*. Enero 5, pp: 25.
- López R.A., 1999. Se incendió una bodega de PEMEX en Cárdenas Tabasco. *La Jornada*. Enero 7, pp: 21.
- López R.J. y López M.J., 1987. *Diagnóstico del Suelo y Plantas, métodos de campo y laboratorio*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid 3a edición. pp: 37 - 55.
- McGill W.B. and Figueredo C.T., 1993. Total Nitrogen. In *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Edited by Carter M.R. for Canadian Society of Soil Science. Edicione Lewis Publisher. pp: 201 - 212.
- Millar C.E., Turk L.M. y Foth H.D., 1972. *Fundamentos de la Ciencia del Suelo*. Editorial Continental, México. pp: 13 - 25.
- Moeller Ch.G. y Ferat T.C., 1991. *Manual de Practicas de Microbiología Sanitaria*. Facultad de Ingeniería. División de Estudios de Posgrado Facultad de Ingeniería (DEPFI). UNAM, México

- Molnar J., Paksy K.A. and Naray M., 1986. Changes in the rat's motor behavior during 4 hr inhalation exposure to preanesthetic concentrations of benzene and its derivatives. (abstrac). **Acta. Physiol. Hung.** 67(3). pp: 349 - 354.
- Munsell., 1992. Soil Chart Edition Munsell Color Co. Baltimore Maryland.
- Murphy S.L. and Tate III R.L., 1996. Bacterial Movement Throught Soli. In Soil Biochemistry Vol. 9. Edited by Stotzky G. and Bollag J. Ediciones Marcel Dekker. New York. pp: 253-286.
- Nalco Chemical Company., 1982. Manual del Agua, su naturaleza, tratamiento, y aplicaciones. Editorial McGraw Hill. Cap. 4.
- Neralla S., Wright A.L. and Weaver W., 1995. Microbial Inoculants and Fertilization for Bioremediation of Oil in Wetland. In Bioaugmentation for site remediation. Edited by Hinchee R.E., Fredricson J. and Alleman B.C. Battelle Press, Battelle Memorial Institute, Printed in the Unites States of America. pp: 31 - 38.
- NOM. DGN-AA-24-1984. Protección al ambiente-Contaminación del Suelo Residuos Sólidos Municipales- Detrminación de Nitrógeno Total.
- Palacios M.S., 1996. El Suelo como una Unidad Biológica. En Apuntes del Curso de Biorremediación de Suelos y Acuíferos. Programa Universitario del Medio Ambiente. Instituto de Ingeniería. UNAM.
- Parisi V., 1979. Biología y ecología del suelo. Editorial Blume ecología, España. pp: 9 - 29, 80 - 83.
- Paul E.A. and Clark F.E., 1989 Soil Microbiology and Biochemistry. Editione Academic Press, INC. U.S. Cap. 2
- Pedersen K. And Ekendahl S. 1990. Distribution and Activity of Bacteria in deep granitic Greunwaters of southeastern Sweden. **Microb. Ecol.** 20: 37-52.
- Perry J.H. 1963. Chemical Enginners Hand Book. Editorial McGraww Hill. 3ª ed. México. pp: 3-23, 3-42.
- Porta C.J., López-Acevedo R.M. y Roquero de Laburu C., 1994. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. pp: 225 - 244, 275 -316, 970 - 116.
- Pulido S.J., Aguilar A.G. y Vazquez A., 1992. Química de Suelos, manual de prácticas. 2a ed. Departamento de suelos. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp: 52.

- Pritchett W.L., 1986. Suelos Forestales, propiedades, conservación y mejoramiento. Editorial Limusa, México. pp: 129 - 1168.
- Ríos G., 1999. Afecta derrame de petróleo a más de 100 pescadores. La Jornada. Enero 17. pp: 24.
- Robinson K.G., Farmer W.S. and Novak J.T., 1990. Availability of sorbed toluene in soils for biodegradation by acclimated bacteria. *Wat. Res.* **24**(3): 345 - 350.
- Rose A.H., 1977. Microbiología Química, introducción a la fisiología microbiana. Editorial Alhambra, Madrid. pp: 110 - 177.
- Somerville C.C., Monti, C.A. and Spain J.C. 1985. Modification of the 14C Most-Probable Method for use with nonpolar and volatile substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(3): 711 - 713.
- Suthersan S.S., 1997. Biorremediation Engineering, design concepts. Ediciones Lewis Publishers, London. pp: 3 - 26, 123 - 143.
- Tamayo J.L., 1980. Geografía Moderna de México. Editorial Trillas. México. 9a edición. pp: 150 - 157.
- Tchobanoglous G. and Schroeder E.D., 1987. Water Quality. Ediciones Addison-Wesley Publishing Company. Massachusetts, US. México pp: 91.
- Thompson L.M. y Troe F.R., 1982. Los suelos y su fertilidad. Editorial Reverte, México 4a edición. Cap. 3, 4, 5, 7, 10 y 11.
- Tiessen H. and Moir J.O., 1993. Total an Organic Carbon. In Soil Sampling and Methods of Analysis. Edited by Carter M.R. for Canadian Society of Soil Science. Ediciones Lewis Publisher. pp: 187 - 199.
- Topp G.C., 1993. Soil Water Content. In Soil Sampling and Methods of Analysis. Edited by Carter M.R. for Canadian Society of Soil Science. Ediciones Lewis Publisher. pp: 541 - 558.
- Velázquez A. y León R., 1974. Comparación de Métodos en la Determinación de la Textura VI Congreso Nacional de la Soc. Mexicana de la Ciencia del Suelo.
- Vivó J.A., 1945. Geografía física. Editorial Herrero. México. pp: 299 - 315.
- Wild A., 1992. Condiciones del Suelo y desarrollo de las plantas según Rusell. Ediciones Mundi Prensa, Madrid. pp: 471 - 525.

- Yelian F.D. and Dukelow W.R., 1992. Cellular toxicity of toluene on mouse gamete cells and preimplantation embryos. (abstrac). **Archives of toxicology**. **66**(6): 443 - 445.
- Zehnder A.J.B., 1995. Perspective and Limits in Biodegradation. In Soil and Groundwater Pollution, fundamentals, risk assessment and legislation. Edited by Zehnder A.J.B. Kluwewr Academic Publishers. Dordrecht/Boston/London. pp: 31 - 35.
- Zeyer J., Kuhn E.P. and Schwarzenbach R.P., 1986. Rapid microbial mineralization of toluene and 1-3-dimethylbenzene in the absence of molecular oxygen. **Appl. Environ. Microbiol.** **52**(4): 944 - 947.
- Zhou E. and Crawford R.L., 1995. Effects of oxygen, nitrogen and temperature on gasoline biodegradation in soil. **Biodegradation**. **6**: 127-140.

ANEXOS

Anexo 1. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de las muestras de suelo del Sitio 1

Muestra	Rep	pH	pH	Humedad	Carga Microbiana	Carga de bacterias	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	PO ₄ ⁻³	S	S	S	C	C	Bacterias		
																		total	heterófitas	degradadoras
CSI	1	7.58	8.41	4.2348	140	0.2716	0.2030	0.1192	0.0140	126835	0.0339	0.0125	957.3669	8.7612	948.9338	2.5546	1.5338	1.95E+11	6.02E+04	0
	2	7.62	8.52	3.9918	140		0.6669	0.3378	0.0224	158574	0.0330	0.0160	981.6885	9.5061	982.1674	2.6917	1.4388		9.03E+04	0
	3	7.6		4.039			0	0	0		0.0312	0.0168				2.715	1.138			0
	4	7.71		4.7914							0.0331	0.0233				2.5986				
	T		7.576	8.43	4.2713	140	0.2716	0.213	0.1192	0.0224	12703	0.033	0.0125	957.3669	8.7612	948.9338	2.5546	1.5338	1.95E+11	7.2E+04
Sta	1	7.81	8.39	14.319	40	0.2755	0.2035	0.1213	0.0337	481574	0.0374	0.0146	886.8552	19.9005	846.9547	2.0309	1.3588	7.35E+10	4.33E+03	2.75E+02
	2	7.92	8.42	12.975	40		0.6155	0.3578	0.0330	190364	0.0338	0.0321	873.5232	18.5430	854.9802	1.5296	1.5357		1.33E+04	5.65E+02
	3	7.62		13.032			0.3338	0.1935	0.0478		0.0364	0.0277				2.4572	1.8403		9.69E+03	7.53E+01
	4	7.87		12.478							0.0374	0.0211				2.4361				
	T		7.805	8.405	13.689	40	0.2755	0.333	0.2242	0.0337	31116	0.036	0.033	870.182	18.2206	808.945	2.1281	1.5316	7.0E+10	3.32E+03
Sib	1	7.93	8.35	20.6155	47	0.3461	1.5400	0.8971	0.0418	272322	0.0463	0.0716	812.9885	24.3001	788.6885	2.2780	1.6388	8.83E+07	3.72E+02	3.4E+02
	2	8.02	8.23	16.768	40		1.4991	0.8716	0.0405	256305	0.0364	0.0411	791.5887	26.3085	765.2792	2.3723	1.5489		3.33E+02	4.9E+02
	3	7.81		18.2318			1.0330	0.5532	0.0426		0.0312	0.0338				2.5489	1.282		6.78E+02	
	4	8.01		19.8801							0.0364	0.0364				2.3418				
	T		7.923	8.29	18.976	47	0.3461	1.209	0.773	0.041	27133	0.043	0.07	812.9885	25.30	769.8885	2.357	1.60	8.8E+07	3.6E+02

*Totales: promedio de 30 campos. Heterófitas y degradadoras: cada dato es promedio de tres cajas

Anexo 3. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los perfiles de suelo del Sitio 1

Muestra	Profundidad (cm)	Repeticiones	pH	Moist. (%)	Nitro. (mg/kg)	Fósforo (mg/kg)	Cin. (mg/kg)	Ca. (mg/kg)	Mg. (mg/kg)	K. (mg/kg)	Carb. org. (%)	Heterótrofos	Degradadoras		
PERFIL S1a															
S1a.1	(0 a 10) 5 cm	1	7.51	12.4630	4.1184	2.3944	0.1355	0.2369	0.0089	860.431	30.2122	830.2188	1.52E+12	3.98E+05	6.91E+02
		2		13.9589	3.4891	2.0285	0.1403	0.2342	0.0520					1.15E+06	2.07E+03
										100%	3.61%	98.49%			
S1a.2	(10 a 20) 15 cm	1	7.62	12.2979	0.8701	0.5059	0.0934	0.0724	0.0114	891.0358	18.1275	872.9081	1.89E+11	1.16E+05	4.35E+02
		2		10.8064	1.5373	0.8955	0.0966	0.0771	0.0326					1.09E+05	
										100%	2.83%	97.87%			
S1a.3	(20 a 30) 25 cm	1	7.97	9.7487	1.7682	1.0289	0.1074	0.0935	0.0008	902.5134	20.8701	881.6433	2.58E+11	1.04E+05	1.89E+02
		2		11.1259	0.3550	0.2064	0.1198	0.1113	0.0163					6.30E+04	1.89E+01
										100%	2.31%	97.69%			
S1a.4	(30 a 48) 48 cm	1	7.92	31.0876	3.7332	2.1705	0.1875	0.4305	0.171	889.1241	38.761	650.3631	1.18E+13	1.40E+05	1.13E+04
		2		28.5595	3.5298	2.0521	0.1835	0.4164	0.1944					5.01E+05	
		3												4.31E+05	
										100%	5.62%	94.38%			
S1a.5	(48 a 57) 63 cm	1	7.96	20.1723	2.1488	1.2493	0.1235	0.08	0.0708	798.2773	18.701	779.5763	5.07E+12	1.62E+06	2.76E+02
		2		18.8351	1.8711	1.0876	0.0475	0.0889	0.056					4.48E+06	
										100%	2.34%	97.66%			
S1a.6	(57 a 75) 68 cm	1	7.55	18.4737	0	0	0.7624	0.2563	0.304	835.2632	6.3815	828.8817	3.48E+10	1.84E+07	7.85E+01
		2		18.4182	0	0	0.0085	0.055	0.3777					7.79E+07	3.82E+02
		3													5.61E+02
										100%	0.76%	99.24%			
S1a.7	(75 a 89) 86 cm	1	7.11	16.6494	0.5798	0.337	0.0084	0.017	0.2669	833.5062	6.3036	827.1226	1.69E+10	2.18E+04	6.87E+02
		2		16.5503	0.9088	0.5284	0.0084	0.058	0.343					5.78E+04	
										100%	0.77%	99.23%			
PERFIL S1b															
S1b.1	(0 a 8) 4 cm	1		18.4871	3.3847	1.9878	0.0945	0.0989	0.0181	810.8458	50.1327	780.7129	4.12E+10	1.16E+05	3.15E+02
		2		18.9154	3.8952	2.1483	0.0775	0.0894	0.0009					4.62E+05	1.17E+02
										100%	6.18%	93.82%			
S1b.2	(8 a 26.5) 18 cm	1	7.84	11.5385	0	0	0	0.0542	0.0557	902.167	15.5484	888.6206	1.83E+09	3.18E+04	3.25E+01
		2		9.7833	0.3788	0.2203	0	0.0595	0.0165					1.08E+05	
										100%	1.72%	98.28%			
S1b.3	(26.5 a 48) 37.5 cm	1	7.7	10.4058	2.8372	1.5332	0.055	0.0247	0.043	875.231	24.731	850.5	3.33E+10	1.52E+06	3.27E+01
		2		12.4768	2.8213	1.6403	0.0548		0.0457					5.45E+01	
		3												3.27E+03	
										100%	2.83%	97.17%			

*Totales: promedio de 30 campos. Heterótrofos y degradadoras: cada dato es promedio de tres cajas

Anexo 4. Caracterización fisicoquímica y microbiológica de los perfiles de suelo del Sitio 2

PERFIL S1a															
S2a.1	(0 a 11.5) 8.8 cm	1	7.53	1.0728	0.298	0.1835	0.0071	0.0459	8.4031	989.2721	10.338	978.838	2.80E+09	9.98E+04	0
		2		1.2602	0.102	0.0583	0.0353	0.0382	0.4551					1.29E+05	
		3													3.23E+05
										100%	1.64%	98.98%			
S2a.2	(11.5 a 14.5) 13.8 cm	1		22.9218	8.7881	3.9281	0.2905	0.1434	1.1888	724.3376	89.9326	854.4049	7.81E+11	4.26E+05	2.32E+02
		2		27.5882	7.8584	4.5884	0.3272		1.1243					8.04E+05	8.81E+02
		3												3.50E+08	4.09E+03
										100%	9.68%	99.38%			
S2a.3	(14.5 a 18.5) 18.8 cm	1		1.2402	0.8361	0.7801	0.0783	0.0481	0.2803	887.188	4.8789	982.3311	6.11E+08	7.38E+04	8.84E+00
		2		1.8406	0	0	0.0838		0.3189					1.78E+05	
		3												4.31E+05	
										100%	8.48%	99.81%			
S2a.4	(18.5 a 30.5) 24.8 cm	1		2.7877	0.3141	0.1828	0.0072	0.0343	0.1488	972.1231	5.1824	886.8808	1.83E+09	8.22E+04	1.58E+03
		2			0.4018	0.2335	0.0072		0.3488					1.38E+04	8.91E+02
		3												3.45E+04	
										100%	8.83%	99.47%			
S2a.5	(30.5 a 35) 32.8 cm	1		8.3434	1.1052	0.8425	0.0848	0.0525	0.8302	908.5858	12.8424	893.8234	3.89E+08	2.07E+08	1.41E+02
		2		9.4127	1.8093	0.8358	0.0848	0.0328	1.0247					8.13E+08	2.02E+04
		3												8.43E+08	
										100%	1.43%	98.87%			
S2a.6	(35 a 40.5) 37.8 cm	1		5.2058	0	0	0.0074	0.0411	0.3237	948.8144	4.7188	944.8855	3.80E+08	3.00E+05	6.98E+02
		2		5.0388	0	0	0	0.0759	0.3138					7.74E+05	2.89E+02
		3												2.58E+08	5.57E+02
										100%	8.89%	99.89%			
S2a.7	(40.5 a 56.5) 47.8 cm	1	7.5	14.8088	0.0448	0.0261	0	0.0524	0.1888	853.931	3.487	850.464	4.08E+09	4.37E+05	5.39E+01
		2		15.3031	0.0401	0.0233	0	0.0591	0.1833					8.20E+05	3.23E+02
		3												2.23E+08	
										100%	8.41%	99.89%			
S2a.8	(56.5 a 73) 68.8 cm	1	7.44	38.4555	8.8808	3.8318	0.1876	0.7578	0.7858	824.4357	78.3788	548.0588	1.80E+12	1.38E+08	3.10E+02
		2		37.5884	5.858	3.2801	0.2333	0.7423	0.8218					1.80E+05	1.85E+02
		3												3.81E+05	
										100%	18.23%	87.77%			
PERFIL S1b															
S2b.1	(0 a 28) 18 cm	1	7.48	3.928	0.8985	0.4087	0.0073	0.0638	0.3886	958.6324	13.0002	945.8322	3.28E+11	8.22E+03	0
		2		4.1388	0.1328	0.1817	0.0217		0.4853					8.24E+03	
		3													
										100%	1.38%	98.64%			
S2b.2	(28 a 37) 36 cm	1	7.58	27.4878	7.1488	4.1581	0.2788	0.2881	2.1887	725.1848	48.2088	676.978	8.88E+11	3.28E+07	4.10E+02
		2		27.4815	8.8278	4.8578	0.2384		2.2885					1.10E+08	5.88E+02
		3													
										100%	8.78%	93.21%			
S2b.3	(37 a 48) 41 cm	1	7.57	27.8188	8.8818	4.8732	0.3801	0.082	1.048	708.808	57.3148	651.4934	1.48E+12	5.20E+05	4.05E+02
		2		28.1371	8.2847	4.8051	0.3804		1.0857					9.72E+05	8.42E+02
		3												3.43E+08	
										100%	8.89%	91.81%			

*Totales: promedio de 30 campos. Heterótrofas y degradadoras: cada dato es promedio de tres cajas

Anexo 5. Análisis de tamaño de partícula por tamices de los perfiles de suelo del Sitio 1

Peso total en gramos de la muestra, W _s			W _s = 31,4700			W _s = 42,0400			W _s = 47,4300			W _s = 84,8800		
Abertura de tamiz		Tamaño o número de tamiz	Porcentaje			Porcentaje			Porcentaje			Porcentaje		
Pulgadas	Milímetros		Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa
3.00		3-in												
2.00		2-in												
1.50		1-1/2-in												
1.00	25.4	1-in												
0.750	19.1	3/4-in												
0.500	12.7	1/2-in												
0.375	9.52	3/8-in												
0.25	6.35	No.3												
0.187	4.76	No.4	3.0408	9.6623	90.3374	16.8718	40.1327	59.8673	17.7552	37.4345	62.5655	49.6	78.4488	23.5512
Charola			3.0408	9.6623	90.3374	16.8718	40.1327	59.8673	17.7552	37.4345	62.5655	49.6	78.4488	23.5512
Suma														
0.075	2.00	No. 10	3.6122	12.1137	78.2238	6.6985	20.691	39.1763	7.3526	15.4049	47.1606	0.3421	14.388	8.1522
0.053	0.84	No. 20	3.5911	11.4321	68.7915	6.5848	15.6634	23.5129	5.6083	11.893	35.1676	3.1013	4.7605	4.3717
0.0185	0.42	No.40	7.0807	22.4998	44.2951	6.3204	15.0342	8.4797	8.6018	18.5576	18.61	1.5683	2.4172	1.9545
0.0098	0.25	No.80	1.0136	5.1274	39.1843	0.8323	1.8656	6.5131	2.1004	4.4284	12.1816	0.2508	0.4327	1.5218
0.0066	0.149	No.100	9.938	31.5697	7.5948	1.8863	4.4815	2.0215	3.938	8.3027	3.8798	0.6507	1.0029	0.5189
0.0029	0.074	No.200	1.6538	5.8908	1.704	0.6378	1.5168	0.5049	1.3035	2.7893	1.1096	0.2288	0.3523	0.1668
Charola			0.3817	1.2128	0.4911	0.1174	0.2792	0.2257	0.2978	0.6277	0.4818	0.0605	0.0832	0.0734
Suma			28.3881	88.8462	26.1794	26.1794	89.8416	29.4027	62.0637	18.2023	33.4778	18.2023	33.4778	0.1668
Suma total			31.3089	99.8687	42.9512	99.7743	47.1679	99.8162	84.8823	99.9286				

Peso total en gramos de la muestra, W _s			W _s = 49,9000			W _s = 102,8			W _s = 67,2		
Abertura de tamiz		Tamaño o número de tamiz	Porcentaje			Porcentaje			Porcentaje		
Pulgadas	Milímetros		Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa
3.00		3-in									
2.00		2-in									
1.50		1-1/2-in									
1.00	25.4	1-in									
0.750	19.1	3/4-in									
0.500	12.7	1/2-in									
0.375	9.52	3/8-in									
0.25	6.35	No.3									
0.187	4.76	No.4	17.38	34.8296	65.1704	0.2614	0.2547	99.7453	0.7188	1.0696	98.9304
Charola			17.38	34.8296	65.1704	0.2614	0.2547	99.7453	0.7188	1.0696	98.9304
Suma											
0.075	2.00	No. 10	6.8528	13.833	51.2374	1.3813	1.3462	98.3991	0.1873	0.2767	98.6517
0.053	0.84	No. 20	4.8398	8.9989	41.5385	1.0816	1.0346	97.3646	0.2606	0.3729	98.2789
0.0166	0.42	No.40	5.2243	10.4698	31.069	2.2293	2.1728	95.1917	0.2628	0.391	97.6876
0.0098	0.25	No.80	1.6387	3.2799	27.7891	2.2802	2.2224	92.9693	0.4083	0.6075	97.2603
0.0059	0.149	No.100	9.8998	6.3707	18.4164	67.2	84.99025	7.97905	50.27	74.6065	22.4738
0.0029	0.074	No.200	3.03	6.1983	2.1724	6.8953	6.5256	1.456345	14.1274	21.0228	1.4509
Charola			0.7923	1.5877	0.8847	0.2755	0.2685	1.18495	0.2903	0.4171	1.0338
Suma			32.1666	63.638	101.1232	101.1232	98.88636	66.7867	97.8966		
Suma total			49.8466	88.3674	101.3848	101.3848	98.81688	66.8068	98.6682		

Anexo 5 (continuación). Análisis de tamaño de partícula por tamices de los perfiles de suelo del Sitio 1

Origen: Sitio 1 Perfil S1b			Muestra S1b Profundidad: 0-8 cm			Muestra S1b Profundidad: 8-28,5 cm			Muestra S1b Profundidad: 20,5-46 cm		
Peso total en gramos de la muestra, Ws			Ws = 21,35			Ws = 97,87			Ws = 100,44		
Abertura de tamiz		Tamaño o número de tamiz	Peso retenido (g)	Porcentaje		Peso retenido (g)	Porcentaje		Peso retenido (g)	Porcentaje	
Pulgadas	Milímetros	Parcial retenido		Que pasa	Parcial retenido		Que pasa	Parcial retenido		Que pasa	
3.00		3-in									
2.00		2-in									
1.50		1-1/2-in									
1.00	25.4	1-in									
0.750	19.1	3/4-in									
0.500	12.7	1/2-in									
0.375	9.52	3/8-in									
0.25	6.35	No.3									
0.187	4.76	No.4	8.8687	41.5395	58.4605	8.8549	9.0476	90.9524	44.84	44.6435	55.3565
Charola			8.8687	41.5395	58.4605	8.8549	9.0476	90.9524	44.84	44.6435	55.3565
Suma											
0.075	2.00	No. 10	3.2956	15.436	43.0245	6.3	6.43711	84.5152	24.8028	24.6941	30.6624
0.033	0.84	No. 20	2.2754	10.6576	32.3669	13.5818	13.8773	70.6379	10.5945	10.548	20.1144
0.0165	0.42	No.40	2.4122	11.2983	21.0686	23.2877	23.7945	46.8434	9.1219	9.0819	11.0325
0.0098	0.25	No.60	0.8289	3.8824	17.1862	6.8611	7.0104	39.833	3.092	3.0784	7.9541
0.0059	0.149	No.100	2.1944	10.2782	6.908	28.3253	28.9417	10.8913	4.3017	4.2828	3.6413
0.0029	0.074	No.200	1.0015	4.6908	2.2172	7.96	8.1332	2.7581	2.5723	2.561	1.1103
Charola			0.3143	1.4721	0.7451	2.4083	2.4607	0.2974	0.8519	0.8481	0.2621
Suma			12.3223	57.7154		88.7242	90.65491		55.3371	55.0943	
Suma total			21.191	99.2549		97.5791	99.70251		100.1771	99.7378	

Anexo 6. Análisis de tamaño de partícula por tamices de los perfiles de suelo del Sitio 2

Perfil 82a			Perfil 82b			Perfil 82c			Perfil 82d			Perfil 82e			
Peso total en gramos de la muestra, Ws			Ws = 54,1800			Ws = 10,7532			Ws = 19,3500			Ws = 50,7700			
Abertura de tamiz			Porcentaje			Porcentaje			Porcentaje			Porcentaje			
Pulgadas	Milímetros	Tamaño o número de tamiz	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	
3.00		3-in													
2.00		2-in													
1.50		1-1/2-in													
1.00	25.4	1-in													
0.750	19.1	3/4-in													
0.500	12.7	1/2-in													
0.375	9.52	3/8-in													
0.25	6.35	No.3													
0.187	4.75	No.4	0	0	100	6.8432	63.6367	36.3613	0	0	100	0.566	1.1542	98.8458	
Cherola			6	6	100	6.8432	63.6367	36.3613	6	6	100	6.866	1.1843	98.8156	
Suma															
0.075	2.00	No. 10	0.4745	0.8813	99.1167	2.3425	21.7842	14.5771	6.1666	42.2019	57.7981	12.6281	25.267	73.5768	
0.033	0.84	No. 20	0.9033	1.6712	97.4475	0.8664	8.2672	9.3099	5.7853	29.7855	28.0126	20.8453	41.0583	32.5205	
0.0165	0.42	No. 40	0.6248	16.2664	81.1611	0.3987	3.717	5.5929	3.8371	19.8236	8.1668	11.6825	23.0106	8.5099	
0.0098	0.25	No. 60	13.3407	24.6229	56.5392	0.1252	1.1643	4.4267	0.9982	5.0993	3.0005	1.9807	3.9013	5.8066	
0.0069	0.149	No. 100	25.1904	48.4339	10.1043	0.3308	3.0782	1.3524	0.8357	4.3175	0.7809	2.4321	4.7904	0.8182	
0.0029	0.074	No. 200	4.3719	8.0621	5.7324	0.1089	1.0127	0.3397	0.0502	0.2593	0.5215	0.3411	0.6718	0.1464	
Charola			0.8679	1.6387	4.0937	0.0365	0.3394	0.0003	0.1009	0.5212	0.0003	0.0742	0.1461	0.0003	
Suma			63.9987	99.6968		3.91	36.361		19.366	99.9997		80.184	98.8466		
Suma total			63.9987	99.6968		10.7832	99.9997		19.366	99.9997		80.77	99.9997		

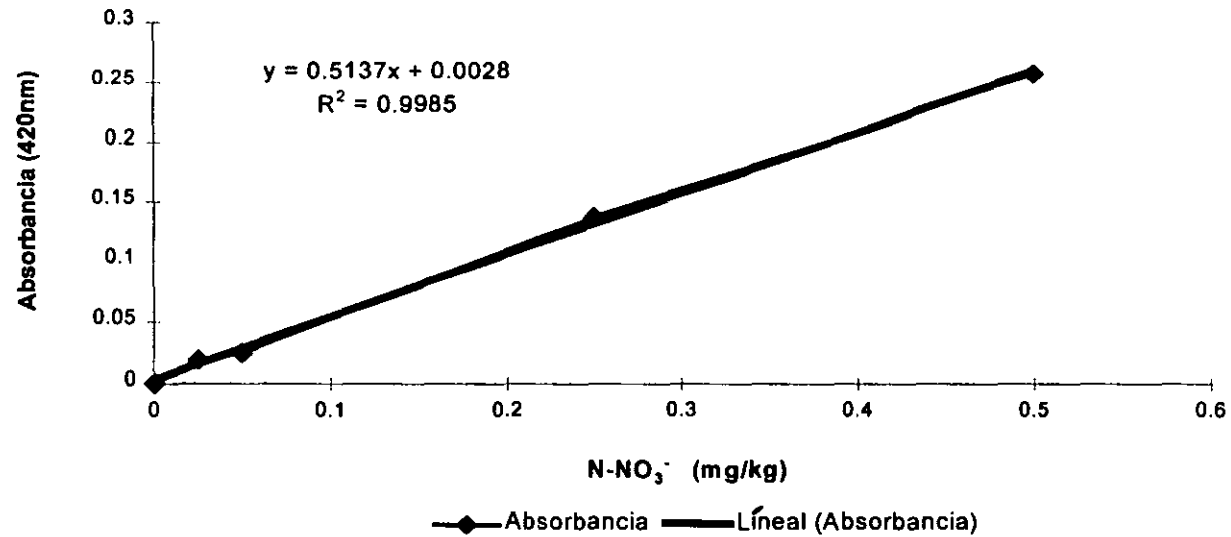
Perfil 82f			Perfil 82g			Perfil 82h			Perfil 82i			Perfil 82j			
Peso total en gramos de la muestra, Ws			Ws = 26,4100			Ws = 26,5684			Ws = 81,68			Ws = 79,37			
Abertura de tamiz			Porcentaje			Porcentaje			Porcentaje			Porcentaje			
Pulgadas	Milímetros	Tamaño o número de tamiz	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	Peso retenido (g)	Parcial retenido	Que pasa	
3.00		3-in													
2.00		2-in													
1.50		1-1/2-in													
1.00	25.4	1-in													
0.750	19.1	3/4-in													
0.500	12.7	1/2-in													
0.375	9.52	3/8-in													
0.25	6.35	No.3													
0.187	4.75	No.4	7.4165	28.0897	71.9103	0.3898	1.4664	98.5336	1.1368	1.2387	98.7613	41.68	52.7655	47.2345	
Cherola			7.4166	28.0897	71.9103	0.3898	1.4664	98.5336	1.1368	1.2387	98.7613	41.68	52.7666	47.2346	
Suma															
0.075	2.00	No. 10	5.8629	22.1995	49.7108	3.8936	13.8645	84.8891	30.8468	33.8424	65.1189	23.42	29.5073	17.7272	
0.033	0.84	No. 20	0.5229	24.6985	25.0123	7.8955	29.8434	54.7257	32.7012	36.7303	29.3886	7.4192	9.3476	6.3796	
0.0165	0.42	No. 40	4.8411	18.3305	8.6616	0.377	31.5299	23.1958	19.416	21.1757	8.2129	3.4723	4.3748	4.0048	
0.0098	0.25	No. 60	0.7048	2.6688	4.0132	2.1987	8.2793	14.9168	3.022	3.3724	4.8405	0.6626	0.86	3.1448	
0.0069	0.149	No. 100	0.7557	2.8614	1.1518	2.9798	11.2144	3.7021	3.063	3.3624	1.4781	1.1271	1.42	1.7248	
0.0029	0.074	No. 200	0.1815	0.6972	0.4648	0.5714	2.1508	1.5515	0.7833	0.8542	0.6239	0.7475	0.9417	0.7831	
Cherola			0.0817	0.3472	0.1174	0.17	0.6396	0.9117	0.34	0.3708	0.2131	0.5081	0.6401	0.143	
Suma			18.9866	71.7928		26.9367	97.6219		90.2823	98.6082		37.3768	47.0816		
Suma total			26.3791	99.8824		26.3263	99.9883		91.3881	99.7469		79.2868	99.887		

Anexo 6 (continuación). Análisis de tamaño de partícula por tamices de los perfiles de suelo del Sitio 2

Origen		Sitio 2		Muestra No. 20			Muestra No. 21			Muestra No. 22		
		Perfil 1		Perfil 2			Perfil 3			Perfil 4		
Peso total en gramos de la muestra, Ws		Ws = 142,85		Ws = 43,64			Ws = 40,42					
Abertura de tamiz		Tamaño o número de tamiz		Peso retenido (g)		Porcentaje		Peso retenido (g)		Porcentaje		
Pulgadas	Milímetros			Parcial retenido	Que pasa	Parcial retenido	Que pasa	Parcial retenido	Que pasa	Parcial retenido	Que pasa	
3.00		3-in										
2.00		2-in										
1.50		1-1/2-in										
1.00	25.4	1-in										
0.750	19.1	3/4-in										
0.500	12.7	1/2-in										
0.375	9.52	3/8-in										
0.25	6.35	No.3										
0.187	4.76	No.4		15.91	11.1375	88.8625	16.5455	37.9136	62.0864	24.664	61.0192	
Charola				15.91	11.1375	88.8625	16.5455	37.9136	62.0864	24.664	61.0192	
Suma												
0.079	2.00	No. 10		11.1202	7.7485	81.114	12.8127	29.3599	32.7265	9.8525	24.3753	
0.033	0.84	No. 20		5.5768	3.9039	77.2101	5.6215	12.8815	19.845	3.0603	7.5712	
0.0165	0.42	No.40		13.6083	9.5448	67.6653	3.5461	8.1258	11.7192	1.4288	3.5348	
0.0098	0.25	No.60		12.9115	9.0385	58.6268	0.7466	1.7108	10.0084	0.2147	0.5311	
0.0059	0.149	No.100		68.08	47.6583	10.9685	1.6142	3.6989	6.3095	0.3621	0.8958	
0.0029	0.074	No.200		13.9328	9.7534	1.2151	1.8209	4.1725	2.137	0.2876	0.7115	
Charola				0.4167	0.2857	0.9294	0.879	2.0142	0.1228	0.4657	1.1521	
Suma				125.6443	87.9331		27.041	61.9636		15.6717	38.7718	
Suma total				141.5643	99.0706		43.5865	99.8772		40.3357	99.791	

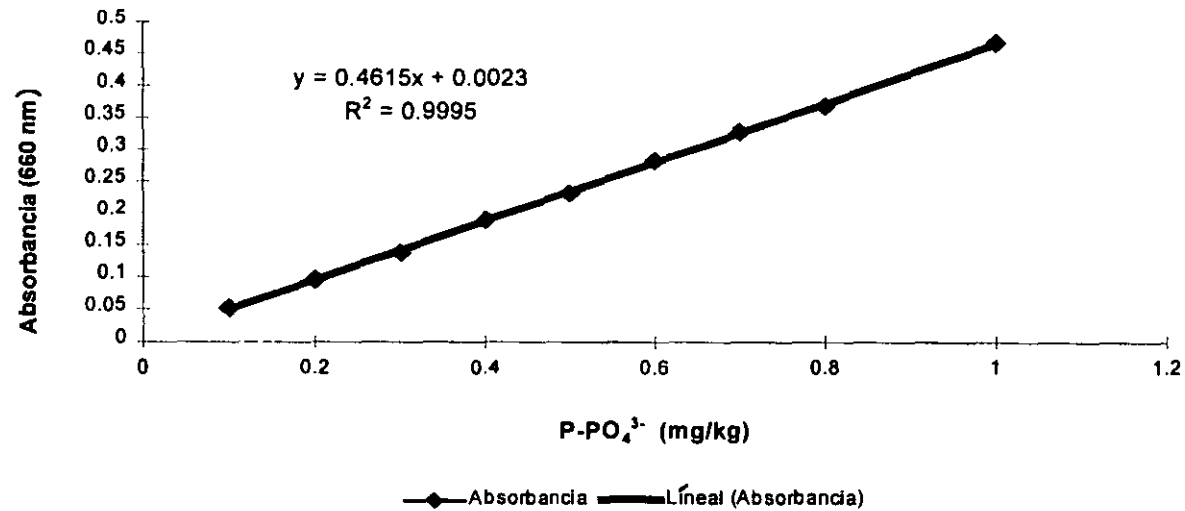
Anexo 7. Curva de calibración para la cuantificación de nitrógeno como nitratos (N-NO₃⁻)

N-NO ₃ ⁻ mg/kg	Absorbancia 420 nm
0	0
0.025	0.019
0.05	0.025
0.25	0.137
0.5	0.257



Anexo 8. Curva de calibración para la cuantificación de fósforo como fosfatos (P-PO₄³⁺)

P-PO ₄ ³⁺ mg/kg	Absorbancia 660 nm
0.1	0.0515
0.2	0.095
0.3	0.1365
0.4	0.1875
0.5	0.2305
0.6	0.2825
0.7	0.327
0.8	0.3675
1	0.466



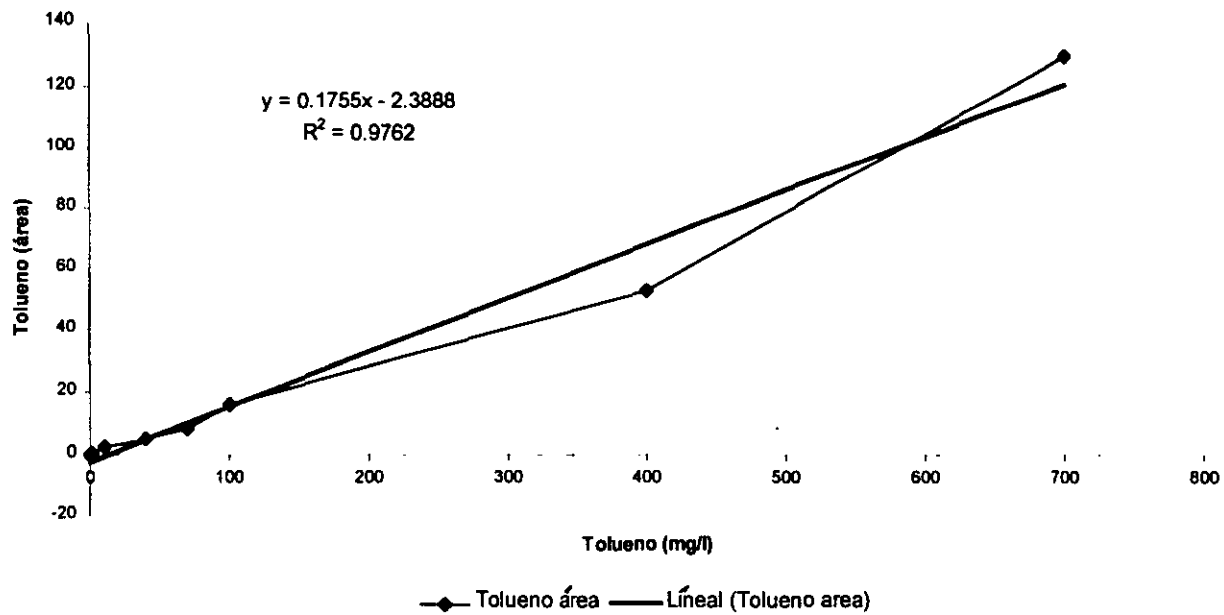
Anexo 9. Condiciones para el análisis cromatográfico

- Cromatógrafo de Gase, marca Varian modelo 3350
- Detector de ionización de flama (FID), alimentado co una mezcla de aire e hidrógeno
- Columna capilar J&W, DB-1 de 60 m de longitud y 0.25 mm de diámetro. Fase estacionaria 100 % metilsilicona con 1µm de grosor
- Gas acarreador: helio
- Gas auxiliar: nitrógeno
- Condiciones específicas programadas:

Temperatura inicial de la columna	40°C
Tiempo de duración de temperatura inicial	5 min
Temperatura final de la columna	110°C
Incremento de temperatura	6°C/min
Tiempo de duración de temperatura final	12 min
Temperatura de inyector	250°C
Temperatura de detector	300°C
Atenuación	4

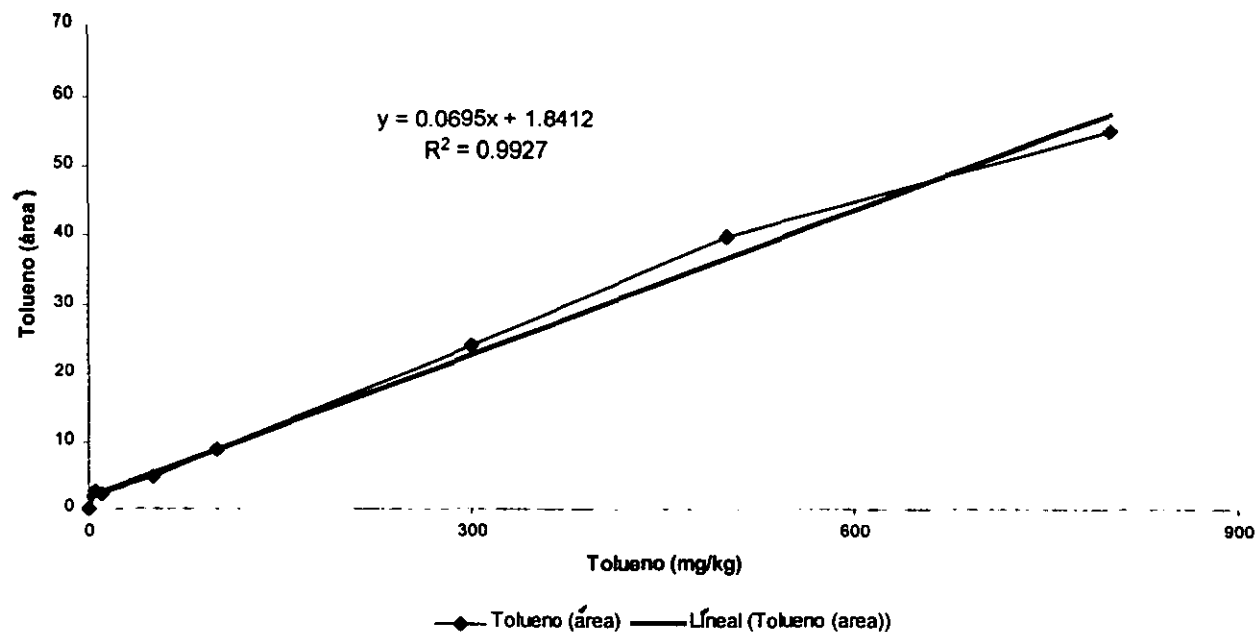
Anexo 10. Curva de calibración para tolueno en medio líquido

Tolueno mg/l	Tolueno área	CV %
0	0	0
1	0.2160442	76.97
10	2.2197297	21.14
40	4.8036943	10.79
70	8.0521604	8.08
100	15.637183	10.3
400	52.467964	1.39
700	129.27236	14.5



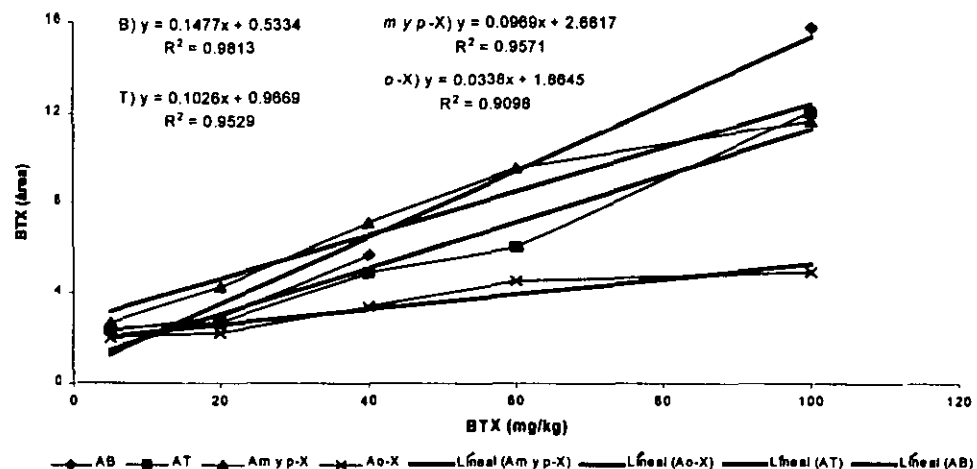
Anexo 11. Curva de calibración para tolueno a partir del suelo del Sitio 1

Tolueno mg/l	Tolueno área	CV %
0	0	0
5	2.68918005	33.32
10	2.31442851	9.38
50	4.83810346	4.71
100	8.8093571	12.86
300	23.9974841	7.03
500	39.7553	42.27
800	55.0189	40.01

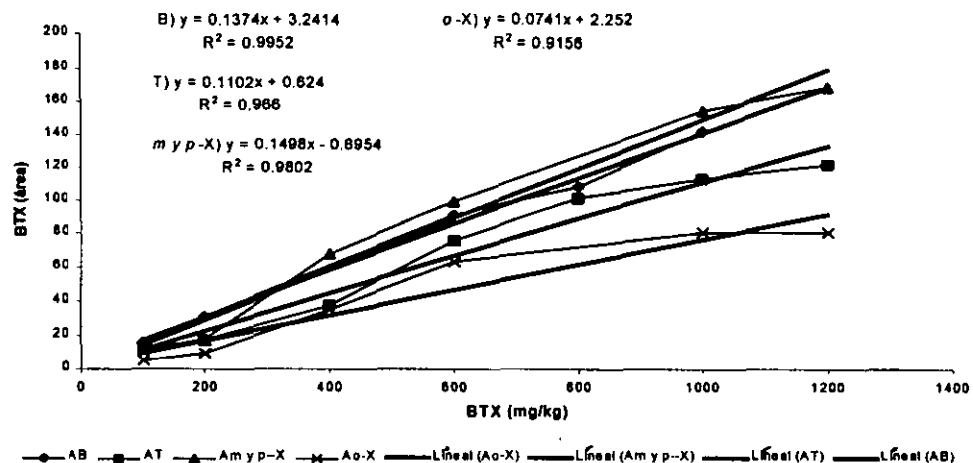


Anexo 12. Curvas de calibración para mezclas de BTX en suelo del Sitio 1 (5 a 100 mg/kg y 100 a 1200 mg/kg)

BTX mg/kg	Benceno area	Tolueno area	m y p-Xileno area	o-Xileno area
5	2.2856	2.378	2.6717	1.9991
20	2.87345	2.8667	4.2234	2.1944
40	5.6537	4.8681	7.0971	3.3221
60		5.9911	9.5093	4.5031
100	15.6883	12.008	11.6006	4.9022

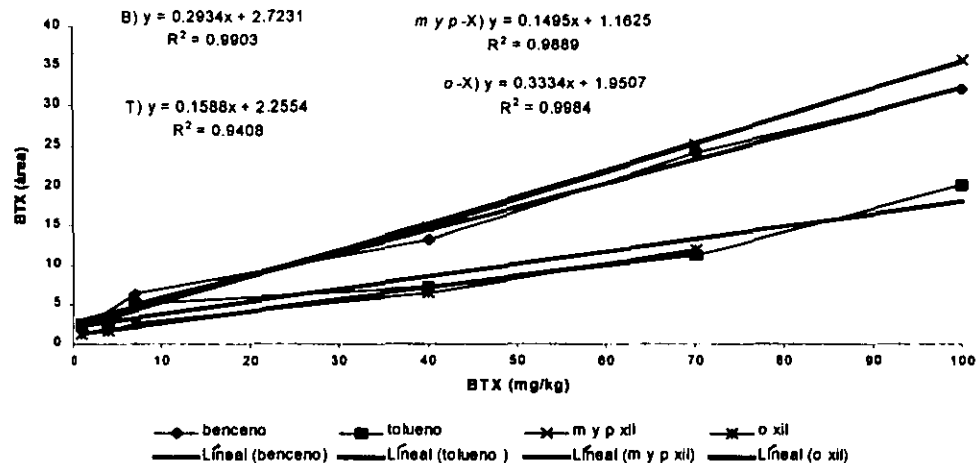


BTX mg/kg	Benceno area	Tolueno area	m y p-Xileno area	o-Xileno area
100	15.6883	12.008	11.6006	4.9022
200	30.879	17.5074	17.8628	9.3094
400		37.4688	67.8915	34.94
600	90.7584	75.397	98.7995	62.9077
800	108.114	101.113		
1000	141.679	112.807	154.3491	80.4679
1200		121.8531	168.557	80.2777

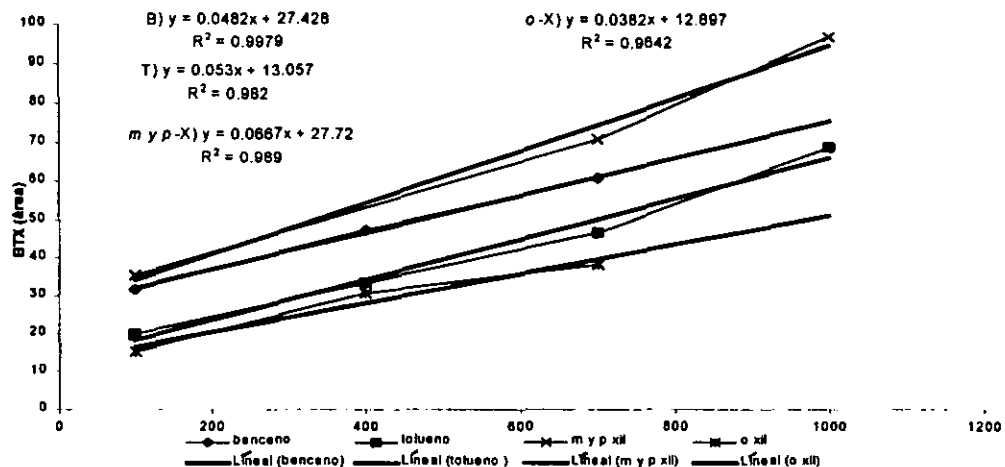


Anexo 13. Curvas de calibración para mezclas de BTX en el suelo del Sitio 2 (1 a 100 mg/kg y 100 a 1000 mg/kg)

BTX mg/kg	Benceno area	Tolueno area	m y p-Xileno area	o-Xileno area
1	1.99419	2.54709	2.51541	1.26014
4		2.68123	2.61765	1.70182
7	6.38592	5.02449	5.10085	2.67627
40	13.2274	7.24258	14.8213	6.40998
70	24.1072	11.1942	25.0811	12.0039
100	31.8583	20.0967	35.6057	15.4438

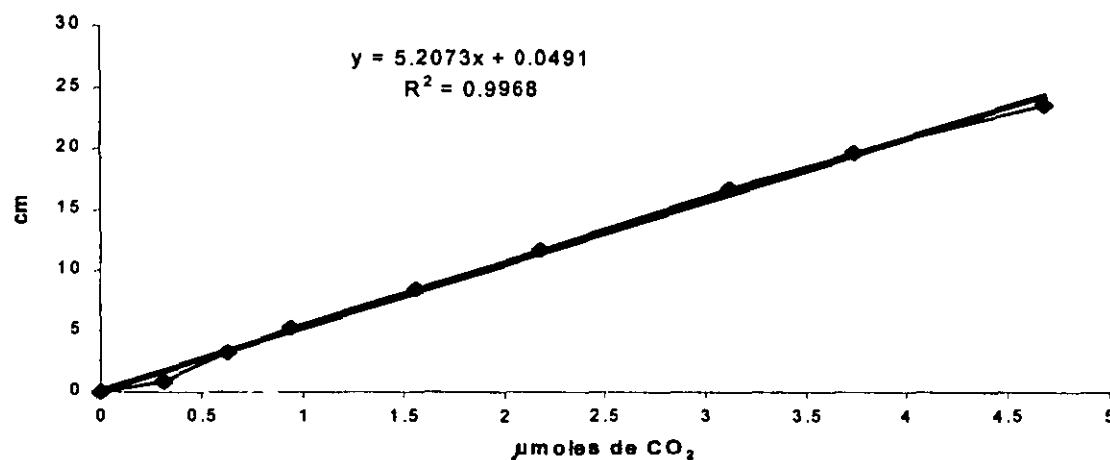


BTX mg/kg	Benceno area	Tolueno area	m y p-Xileno area	o-Xileno area
100	31.8583	20.0967	35.6057	15.4438
400	47.4585	33.4235		30.7298
700	60.7504	46.631	70.7599	38.3694
1000		68.7097	96.8472	



Anexo 14. Curva de calibración para la cuantificación de CO₂

CO ₂ μmoles	cm
0	0
0.3116	0.85
0.6233	3.25
0.9349	5.25
1.5583	8.5
2.1816	11.7
3.1166	16.8
3.7399	19.7
4.6749	23.65



Anexo 15. Curva de calibración para la cuantificación de O₂

O ₂ μmoles	cm
0	0
0.3137	0.5
0.6274	1.5333333
1.5687	4.5333333
3.1374	9.1666667
4.7061	14.6
6.2749	18.366667
7.8436	21.566667

