

Biorremediación de un suelo contaminado con petróleo mediante el empleo de bagazo de caña con diferentes tamaños de partícula

Juana Antonio Ordaz¹, Ángeles Martínez Toledo²,
Fernando Rafael Ramos Morales³, Luis Felipe Sánchez Díaz¹,
Armando Jesús Martínez⁴, José Alfredo Tenorio López¹
y María del Carmen Cuevas-Díaz¹

¹Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana. Veracruz, México.

²Facultad de Ingeniería, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

³Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica. ⁴Instituto de Neuroetología. Universidad Veracruzana. Campus Xalapa. Veracruz, México.

juanabanana66@hotmail.com; angeles.martinez@uaslp.mx; framos@uv.mx;
luisfels@hotmail.com; armartinez@uv.mx; marycarm81@hotmail.com

Resumen

Se realizaron pruebas de biorremediación a nivel microcosmos a un suelo arcilloso, contaminado con petróleo crudo, del sureste de México con una concentración inicial de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de 16000 ppm. Se utilizó como texturizante y enmienda al bagazo de caña. Se utilizó suelo con 2% de bagazo (98/2, %/%), con un ajuste de nutrientes (carbono, nitrógeno y fósforo) a una relación de 100/10/1. Se empleó un diseño experimental factorial fraccionado (por triplicado) en cultivo sólido, los factores fueron (a dos niveles, + y -): bagazo (tamaño de partícula de 0,84 mm y 4,76 mm), el contenido de humedad (60% y 90%) y la temperatura de incubación (28°C y 33°C). La máxima remoción de HTP (30%), después de 20 días, se logró con un tamaño de partícula de 4,76 mm, con una humedad de 60% y 28°C. Con esas condiciones se realizó una cinética de remoción de HTP en cultivo sólido durante 20 días, la toma de muestras se realizó cada cinco días, finalmente la máxima remoción de HTP (28%) se obtuvo al día 20. En este estudio se observó que a mayor tamaño de partícula se mejora la remoción de HTP del suelo.

Palabras clave: diseño factorial fraccionado, cinética, hidrocarburos totales del petróleo (HTP), residuos agroindustriales.

Bioremediation of Oil-Contaminated Soil Using Sugarcane Bagasse Pith in Different Particulate Sizes

Abstract

Bioremediation tests were performed on the microcosmic level on clay soil from south-east Mexico contaminated with crude oil, with an initial concentration of total petroleum hydrocarbons (TPH) of 16000 ppm. Sugarcane bagasse pith was used as a texturizing and correction agent. Soil had a 2% (98/2, %/%) sugarcane bagasse pith ratio; nutrients (carbon, nitrogen and phosphorous) were adjusted to a 100/10/1 ratio. The fractional factorial experimental design was employed (in triplicate) in a solid state culture. Independent variables (at two levels +, -) were; sugarcane bagasse pith (particulate sizes 0.84 mm and 4.76 mm), moisture content (60% and 90%), and incubation temperature (28°C and 33°C). The best TPH removal (30%) after 20 days, was obtained with a particulate size of 4.76 mm with 60% moisture content at 28°C. Under these conditions, a kinetic removal was performed for 20 days. Samples were taken every 5 days; the best TPH removal (28%) was attained on the 20th day. It was observed that the higher particulate size increased TPH removal from the soil.

Key words: fractional factorial design, kinetics, total petroleum hydrocarbons (TPH), agroindustrial waste.

Introducción

En México, para el 2008, se tenían identificados 333 sitios contaminados registrados con materiales o residuos peligrosos. De éstos, 119 se encontraban caracterizados, es decir, clasificados y priorizados de acuerdo al grado de riesgo que representaban para la salud y el ambiente, sólo 12 sitios se consideraban rehabilitados o en proceso de rehabilitación.

Dentro de la amplitud de contaminantes encontrados predominan los hidrocarburos del petróleo, escorias, aceites gastados, disolventes, metales pesados y residuos biológico-infecciosos [32]. Los hidrocarburos del petróleo crudo se clasifican como alcanos (lineales y ramificados), cicloalcanos, aromáticos, policíclicos aromáticos, asfaltenos y resinas. Estos compuestos presentan variaciones en la longitud de la cadena, en las ramificaciones, en condensaciones del anillo aromático, en combinación entre moléculas y en la presencia de moléculas de oxígeno, nitrógeno y azufre [4]. Su biodegradabilidad varía en amplia medida por su coeficiente de partición octanol/agua (solubilidad en agua), por su estructura molecular, la cual está relacionada con su nivel de toxicidad, y por la matriz en la que se

encuentre, junto con una gran variedad de condiciones ambientales (temperatura, humedad, pH, etc.).

Puesto que el petróleo es una mezcla compleja, su degradación en suelo, a través de tecnologías de biorremediación, se favorece por la acción metabólica de una población variada de microorganismos con distintas capacidades enzimáticas. Con frecuencia la degradación inicial de los hidrocarburos del petróleo requiere de la acción de enzimas oxigenasas que provienen de los microorganismos (de bacterias principalmente) y que al mismo tiempo, la actividad de esta enzima depende de la presencia de oxígeno molecular. Por consiguiente, las condiciones aerobias son necesarias al inicio de su transformación para romper los enlaces de las moléculas de los hidrocarburos [4, 5].

En la presente investigación se utilizó bagazo de caña (residuo que queda después de la extrusión y extracción de jugo de los tallos fibrosos de la caña de azúcar) como texturizante y enmienda a emplear en el proceso de biorremediación, por la disponibilidad del mismo, considerando que en el estado de Veracruz (mayor productor a nivel nacional) anualmente se produce el 35,5% de caña de azúcar de todo el país. En México se reporta que de cada tonelada

de caña de azúcar cosechada, el 34% corresponde a bagazo y se estima que con esquemas térmicos eficientes un ingenio puede autoabastecerse energéticamente, y utilizarse hasta el 50% de este residuo [16].

Investigaciones recientes sobre restauración de sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo, reportan resultados satisfactorios al aplicar tecnologías de biorremediación. En específico el cultivo sólido, que emplea la estrategia del composteo, en el cual se han empleado residuos agroindustriales, tales como bagazo de caña, rastrojo de maíz, paja de avena, cascara de naranja, aserrín de madera, etc., como enmiendas y texturizantes, debido a que incrementan la porosidad del medio y por lo tanto la aerobiosis del sistema que funcionan como una buena fuente de carbono y como aporte de microorganismos ligninolíticos [11, 14, 23]. Sin embargo, no existen reportes que indiquen el efecto del tamaño de partícula del residuo sobre la remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de suelo. Por lo que, el objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del tamaño de partícula del bagazo de caña sobre la remoción de HTP durante el cultivo sólido de un suelo contaminado por un derrame de petróleo crudo.

Materiales y métodos

El suelo de estudio proviene de la comunidad Congregación de Juan Díaz Covarrubias, municipio de Hueyapan de Ocampo, en el estado de Veracruz. Se ubica en la zona sur del estado, a una altitud de 20 m sobre el nivel del mar. El clima es cálido-húmedo con una temperatura promedio de 25°C y la precipitación pluvial media anual es de 1500 mm. El suelo es de tipo cambisol, luvisol, y vertisol que se caracteriza por tener cualquier tipo de vegetación condicionado por el clima, además de mostrar acumulación de arcilla en el subsuelo, susceptible a la erosión [17].

El muestreo fue aleatorio por las condiciones topográficas del sitio, se obtuvieron muestras de cuatro puntos a una profundidad de 30 cm y se homogenizaron para obtener una mezcla representativa del suelo contaminado tal como lo sugiere Cline [7]. Se secó a temperatura ambiente (22°C ± 2°C), se trituró en mortero y se tamizó a través de una malla de 22 mm y almacenó en frascos de vidrio ámbar con tapas de neopreno y sellos de teflón a 4°C, hasta su análisis.

El bagazo de caña fue donado por el Ingenio Azucarero Cuatotolapan, del Estado de Veracruz, México. Residuo que se secó a temperatura ambiente (22°C ± 2°C), se molió en licuadora y posteriormente se tamizó usando una malla de 46,2% de área abierta (no. de registro 20, marca

Monti-Lat.) y una malla de 65,2% (no. de registro 4, marca Monti-Lat.). Cada uno de los tamices por separado se homogenizaron y de una muestra representativa de cada uno se verificó el tamaño de partícula (TP) mediante una regla milimétrica, auxiliándose de una lupa. Con la primera malla se obtuvo un TP de 0,84 mm, y con la segunda de 4,76 mm.

La humedad del suelo y la capacidad de campo se determinaron con el método gravimétrico desarrollado por la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 [13]. El método micro - Kjeldahl [22] se empleó para las determinaciones de nitrógeno (N) total, y para fósforo (P) asimilable se utilizó el método reportado por Bray y Kurtz en 1945, con modificaciones [29]. La materia orgánica (MO) se determinó por oxidación con $K_2Cr_2O_7$ y H_2SO_4 desarrollado por Walkley y Black [22].

Para determinar el pH se utilizó un potenciómetro marca OAKTON PC510 pesaron 5 g de suelo y se adicionaron 12,5 mL de agua destilada desionizada, se mezclaron en un Vortex y al decantado se le tomó la lectura con un potenciómetro OAKTON PC510. La textura se determinó como lo indica Bouyoucos [22] y la densidad por el método de Beaver [12].

La técnica para la extracción de los hidrocarburos del petróleo del suelo se basó en el método reportado por Schwab *et al.* [31], y modificado por Arce-Ortega *et al.* [2] de acuerdo a lo siguiente: en un tubo para centrifuga de teflón de 10 mL se colocó 1 g de suelo (seco y tamizado por malla no. 60) con 2 g de Na_2SO_4 anhidro, además se agregaron 5 mL de CH_2Cl_2 y se agitaron durante 60 s en Vortex a alta velocidad. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 20 min a 4°C. Seguidamente se decantó el sobrenadante en un frasco de vidrio ámbar de 20 mL y se repitieron los pasos desde la adición de 5 mL de CH_2Cl_2 .

Para la cuantificación de los HTP se empleó el método EPA-1664 [33], con algunas modificaciones. Brevemente, se evaporó el disolvente a los extractos orgánicos del suelo, mediante el uso de un rotavapor a 60°C con 740 ± 50 bars de presión. El extracto se re-suspendió en 2 mL de CH_3CN los cuales se vertieron en frascos de vidrio color ámbar con tapas con cubiertas de teflón (material a peso constante). Para desecar las muestras el disolvente se evaporó de los frascos utilizando una corriente de gas nitrógeno. La concentración de los HTP se determinó por diferencia entre el inicial y final de los frascos. Este valor se afectó por el factor de corrección que involucró el peso del suelo y su humedad.

Se monitoreo la actividad heterotrófica (hongos y bacterias) de las unidades experimentales mediante el método de cuenta en placa desarrollado por Clark [6], 1 g de

suelo, se diluyó en 9 mL de solución de NaCl al 0,09% y se agitó vigorosamente por 10 min, y se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-6} .

Para el crecimiento bacteriano se utilizó agar nutritivo y para hongos agar dextrosa papa. El crecimiento de hongos fue cuantificado a partir de una muestra de 0,1mL de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} ; en tanto que para bacterias se tomaron de las diluciones: 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} y la inoculación se realizó por triplicado empleando cajas de Petri estériles. La temperatura empleada para la incubación de los hongos fue de 28°C y para las bacterias de 37°C. La cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) para las bacterias se realizó a las 24 horas después de la siembra y de 72 horas para los hongos.

Se empleó un diseño factorial 2^3 que indicó ocho tratamientos y se utilizó un control (todo por triplicado). Los viales (microcosmos) previamente se lavaron con ácido nítrico al 5% y se esterilizaron en autoclave durante 15 min a 121°C y 15 psi, en todas las unidades experimentales se utilizaron 20 g de la mezcla de suelo con 2% de bagazo y los nutrientes carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) se ajustaron a la relación C/N/P de 100/10/1. Como fuente de N se empleó NH_4NO_3 y para el P se utilizó K_2HPO_4 . Los tratamientos se establecieron con base al diseño factorial 2^3 el cual se presenta en la Tabla 1.

Las unidades experimentales se incubaron durante 20 días, se les proporcionó aireación (en condiciones asépticas) por 30 min en flujo de aire continuo cada tercer día, para evitar las condiciones de anaerobiosis. Después de la aireación se sellaron en condiciones asépticas y se homogenizaron mediante agitación en Vortex por 3 min.

Los controles abióticos (grupos control) fueron: suelo estéril, y combinaciones de suelo estéril con residuo estéril y no estéril. Para lograr la esterilidad del suelo y del residuo se utilizó el método reportado por Molina-Barohona *et al.* [20] el cuál consistió en someterlos al autoclave a 15

psi y 121°C por 15 min (tres veces) cada tercer día. Los parámetros monitoreados fueron concentración de HTP y de N.

Para realizar la cinética de remoción se utilizaron las condiciones del diseño experimental que aportaron la mayor remoción de HTP, la cual consistió en colocar microcosmos con 20 g de la misma relación suelo y bagazo de caña (2% de bagazo), con un TP de 4,76 mm, con la humedad al 60% de la capacidad de campo y una temperatura de 28°C. El control abiótico consistió en 20 g de suelo contaminado el cual previamente fue esterilizado con una solución de NaN_3 al 5% con el objetivo de inactivar la actividad microbiana.

La cinética se condujo por 20 días, se retiraron microcosmos (por triplicado) cada 5 días utilizando para la toma de muestras la técnica de sacrificio de viales. La aireación de los microcosmos (durante el tiempo experimental) se realizó cada tercer día (en condiciones asépticas), durante 30 min. Posteriormente, ya sellados, se agitaron vigorosamente en Vortex. Los parámetros medidos fueron: concentración de HTP, de N, de P y de MO, además de la cuenta de microorganismos, la humedad y el pH. El grupo control recibió el mismo tratamiento que las unidades experimentales. Es importante indicar que después de hacer la mezcla de suelo con bagazo de caña, el ajuste de nutrientes y de humedad, se determinaron los valores iniciales de los parámetros analizados, tanto para el diseño experimental como para la cinética.

El análisis estadístico se realizó utilizando modelos lineales generalizados (GLM) con un diseño de un factor con nueve niveles y con ajustes de las variables de respuesta para distribución gama [21], debido a que no cumplían con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Se realizaron los contrastes ortogonales para comparación de promedios con un α de 0,05. Además se realizó un análisis en donde se conjuntaron los tratamientos en

Tabla 1. Formulación de las unidades experimentales de acuerdo al diseño factorial 2^3 .

Tratamiento	Suelo (g)	Bagazo (g)	Tamaño de partícula (mm)	K_2HPO_4 (g)	NH_4NO_3 (g)	Humedad (%)	Agua (mL)	T (°C)
1	19,6	0,4	0,84	0,0428	0,02033	60	4,2	28
2	19,6	0,4	4,76	0,0428	0,02033	60	4,2	28
3	19,6	0,4	0,84	0,0428	0,02033	60	4,2	33
4	19,6	0,4	4,76	0,0428	0,02033	60	4,2	33
5	19,6	0,4	0,84	0,0428	0,02033	90	6,3	28
6	19,6	0,4	4,76	0,0428	0,02033	90	6,3	28
7	19,6	0,4	0,84	0,0428	0,02033	90	6,3	33
8	19,6	0,4	4,76	0,0428	0,02033	90	6,3	33

dos grupos en relación al TP de 0,84 mm y 4,76 mm, para probar el efecto de tamaño sobre la remoción de HTP aplicando un ajuste de error tipo Poisson a la variable de respuesta. El software utilizado para las pruebas estadísticas fue el Statistica 7 Stat Sof, Inc. 2004.

Resultados y discusión

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la caracterización fisicoquímica realizada al suelo contaminado y al bagazo de caña. En donde se observa que el suelo tiene un valor de pH, contenido de MO, N y P, que lo ubican dentro del intervalo de los suelos medianamente pobres; condición factible para aplicar la técnica de biorremediación [8, 12]. El bagazo de caña es un residuo con concentraciones de N y de P que lo hacen un sustrato accesible para la flora microbiana. Los cambios de pH durante el proceso experimental se podrían atribuir al crecimiento de hongos, tal como se registró en una investigación similar [9], ya que estos cambios están fuertemente ligados a efecto microbiano aeróbico y Vallejo *et al.* [34] acreditó este tipo de respuesta sólo cuando hay combinación de HTP y nutrientes.

El contenido de N en las ocho pruebas y el grupo control con respecto a la remoción de HTP en el diseño experimental indicó diferencias significativas ($\chi^2 = 119$; $p < 0.001$, Figura 1A). Puesto que se observó que el mayor consumo de N (0,04%) se registró en el tratamiento 2, el cual tuvo la mejor eficiencia de remoción de HTP (30%). Un resultado similar fue reportado por Xua y Lu [37], quienes utilizaron la cascarilla de cacahuate en polvo como enmienda en un suelo contaminado con petróleo y se lograron remover 30% de HTP de un suelo en doce semanas de una concentración inicial de 18300 mg/kg de HTP.

Gandolfi *et al.* [15] elaboraron una composta a base de residuos orgánicos y la utilizaron como enmienda de un

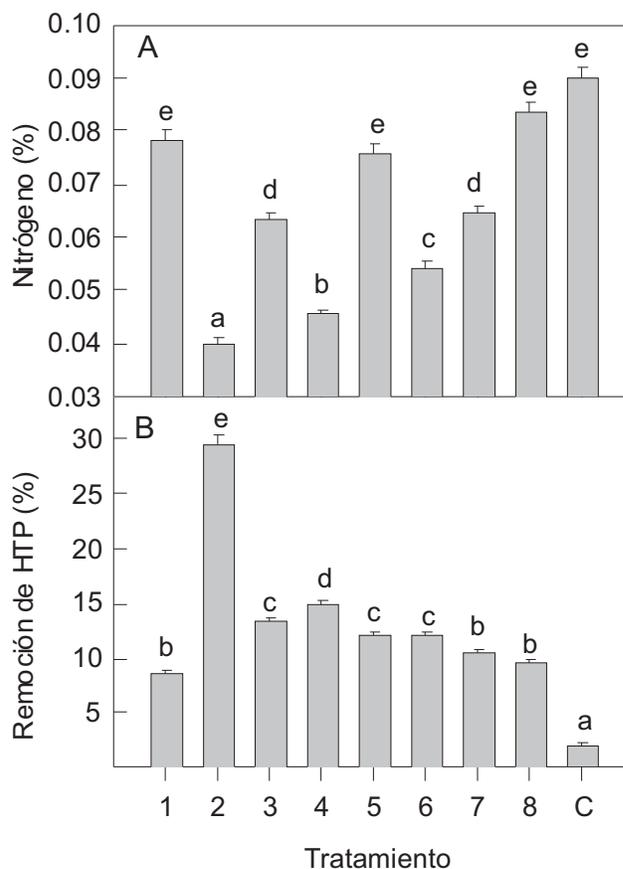


Figura 1. Valores promedios (\pm I.C.*. al 95%; $n = 3$) del consumo de N (A) y remoción de HTP (B) en los tratamientos experimentales y el grupo control. Letras distintas indican diferencias significativas. * I.C. = Intervalo de confianza.

suelo contaminado con 37681 mg/kg de diesel y lograron reducir la concentración a 3108 mg/kg después de 185 días. Saraya *et al.* [26] también, elaboraron diferentes compostas a partir de residuos orgánicos y lograron remover hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) de un suelo,

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica del suelo contaminado y del bagazo de caña de azúcar empleado.

Parámetro	Suelo	Bagazo de caña	Método
pH	7,88	5,8	Potenciométrico
Humedad (%)		0,96	Gravimétrico
Capacidad de retención de agua (%)	35		Gravimétrico
Materia orgánica (%)	6,5	89,49	Walkley-Black
Nitrógeno (%)	0,09	0,26	Kjeldahl
Fósforo asimilable (mg/kg)	2,8	1,6	Bray - Kurtz
Composición textural	Arcilloso		Bouyoucos
Densidad (g/cm ³)	1,17		
HTP (mg/kg)	29828		

pero solo lograron obtener buenos resultados con algunas de las compostas, atribuyendo esto a su estabilidad la cual relacionan con su concentración de ácidos húmicos y materia orgánica, ya que estas características aumentan la biodisponibilidad de los HAPs hacia los microorganismos mejorando el proceso de degradación. Por lo que las características de las compostas pueden ser similares a las del bagazo de caña, en cuanto a su pH y contenido de MO.

En el tratamiento 2 se observó que la relación final de C/N se modificó a 100/0,53 con respecto a la relación inicial (100/10). Por otro lado, se presentó una correlación negativa entre el contenido de N y el TP ($r = -0,49$, $p < 0,01$) y con la remoción de HTP ($r = -0,94$, $p < 0,001$). En los tratamientos 2 y 4, se registraron los mejores resultados en remoción de HTP (30% y 15%, respectivamente) y la comparación entre tratamientos indicó diferencias significativas en la remoción de HTP ($\chi^2 = 119$, $p < 0,001$). Además el contraste en la efectividad de remoción fue en todos los tratamientos más alto que en el grupo control (Figura 1B).

El TP del bagazo de caña tuvo un efecto significativo en la remoción de HTP ($\chi^2 = 13$, $p < 0,0001$, Figura 2). En este sentido Waskman [35], reportó que al disminuir el TP se aumenta su área superficial, por lo tanto hay mayor área de contacto entre la partícula y los microorganismos, lo que acelera la velocidad de descomposición del material aunque partículas de tamaño pequeño no permiten buena oxigenación del suelo.

En general, cuando se tiene un menor TP del bagazo de caña la eficiencia de remoción es inferior al 13%. Lo anterior es consistente de forma sustancial con otra investigación [25] en donde se reportó que a tamaños más grandes de partícula se logran altos niveles de oxigenación de las unidades experimentales necesarias para los procesos de remoción de HTP. Es así que en los procesos de biorremediación la porosidad es un factor de sustancial importancia, debido a que los contaminantes reducen la porosidad del suelo evitando la oxigenación y la biodisponibilidad de los contaminantes para el microorganismo. En este estudio el uso de TP de bagazo de caña más grande, promueve un consumo de N menor en el suelo, en consecuencia se puede inferir que los microorganismos utilizan primero el N del residuo por ser más accesible y posteriormente el N del suelo. Como se observa en la comparación entre tratamientos, el contenido de N fue una variable que tuvo un efecto sobre la remoción de HTP, puesto que al reducir la concentración de N, la remoción de HTP se incrementó.

El bagazo de caña sirvió como un soporte y sustrato inicial para reactivar a los microorganismos que posterior-

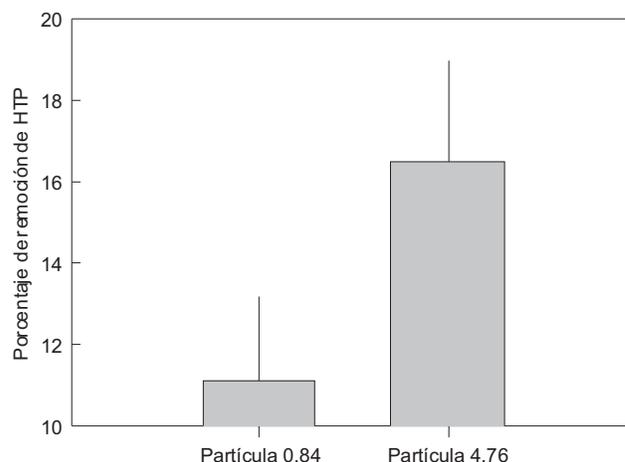


Figura 2. Valores promedio (\pm I.C.* al 95%; $n = 3$) del porcentaje de remoción de HTP y su relación con el TP a 0,84 mm y 4,76 mm del bagazo de caña. * I.C = Intervalo de confianza.

mente utilizaron los hidrocarburos de petróleo como fuente de carbono. Además, se ha reportado que el N favorece el crecimiento de bacterias con la capacidad para transformar los hidrocarburos [3]. Aunado a esto, el P se consumió en bajas concentraciones, este efecto se puede atribuir a que el bagazo de caña tenía un contenido inicial del P (1,6 mg/kg) y que los microorganismos utilizaron inicialmente este compuesto y después el que estaba presente en el suelo (2,8 mg/kg).

Por lo tanto, es posible que el TP de 0,84 mm usado en este estudio, no haya permitido una buena aereación y que los nutrientes presentes en dicha partícula se hayan agotado rápidamente sin permitir la reactivación de los microorganismos autóctonos del suelo. Además de que los microorganismos del bagazo de caña no tuvieron suficiente sustrato para lograr una aclimatación al suelo contaminado. Es así que los residuos agroindustriales utilizados como enmiendas no sólo incrementan en un inicio, la porosidad de suelo, al mismo tiempo que permiten un aumento en la difusión del oxígeno molecular en la matriz del suelo, sino que también, contribuyen con nutrientes y microorganismos al suelo para la reactivación de flora nativa con capacidad metabólica de degradar tóxicos. Por ejemplo se ha reportado que TP del bagazo de caña de 0,84 mm y 0,6 mm tuvieron un efecto en la eliminación de un polímero sintético (70% y 74%, respectivamente) [10, 28].

La comparación en los tratamientos con respecto al TP, indicó que la temperatura y la humedad tiene un efecto significativo ($p < 0,0001$) sobre el proceso de remoción de HTP. Asimismo, el 60% de humedad del suelo permitió la obtención de mejores resultados en la remoción de HTP,

lo cual fue similar con los reportados por Pérez-Armendáriz *et al.* [23] y Roldán-Martín *et al.* [29] quienes informaron que su mejor resultado en remoción de HTP se logró con concentraciones similares de humedad. Además, en este estudio a pH 6,7 y 28°C se favoreció la remoción de 29,4% de HTP después de 15 días de tratamiento, lo cual se puede acreditar a la capacidad metabólica de los microorganismos del suelo, estimulados por dichas condiciones ambientales. En comparación Molina-Barohona *et al.* [20], realizaron pruebas de bioremediación en un suelo contaminado con diesel (40000 mg/kg) utilizando utilizando bagazo de caña a 20°C y 25°C con 20% y 30% de humedad del suelo, respectivamente. La más alta remoción (67%) se logró con las segundas condiciones.

En cuanto a los resultados de la cinética de remoción se observó que los parámetros que se seleccionados dieron como resultado un porcentaje de remoción de 28% de HTP ($C_0 = 29828$ mg/kg y $C_{\text{final}} = 22858$ mg/kg) en los 20 días y el grupo control no presentó cambios importantes. Además, la respuesta de la cinética de remoción que se muestra en la Figura 3 indica que el \emptyset (HTP residual / HTP inicial) decrece con respecto al tiempo, sin que se observe una supresión de esta actividad. Por lo tanto, se requiere de más tiempo de prueba en la cinética para observar con mayor claridad el momento en que la remoción de HTP no presente cambios significativos. En este caso se utilizó una ecuación de primer orden [36]. Donde:

$$C = C_0 e^{-kt} \text{ o } \ln C = \ln C_0 - kt \quad (1)$$

Para este caso se representó como:

$$-\ln C/C_0 = kt \quad (2)$$

donde C es la concentración del hidrocarburo (mg/kg), t es el tiempo de remoción (días), C_0 es la concentración inicial de los hidrocarburos (mg/kg), k es la constante de cambio de los hidrocarburos del suelo (1/día).

La ecuación de la regresión lineal fue $y = 0,0112x + 0,0078$ con una $r^2 = 0,98$ y un valor de $k = 0,112$ de velocidad de degradación. En otros estudios se ha demostrado que la cinética de degradación de hidrocarburos en suelo puede representarse como de primer orden [1, 19, 30]. Resultados similares a los obtenidos en la presente investigación se reportan por Maletix *et al.* [19] el cual obtuvo una correlación de sus resultados de $r = 0,86$, por Ronèviæ, [30] quien reportó una $r = 0,9146$ y por Admon, [1] que encontró una $r^2 = 0,68$ y una $k = 0,214$, este valor es mayor al reportado en este trabajo. Aunque el resultado de k en el presente estudio podría estar relacionado con la recalcitrancia de los hidrocarburos presentes en el suelo intemperizado.

El contenido de P disminuyó en forma gradual durante la cinética (Tabla 3). Por lo que, al final de la cinética la concentración de P fue de 3,14 mg/kg la cual corresponde a una relación de C/P de 100/0,0042. También se presentó una correlación positiva de la concentración de P con contenido de N, y con la humedad ($r = 0,94$, $p < 0,0001$; $r = 0,82$, $p < 0,0001$, respectivamente), así como una correlación negativa con el crecimiento bacteriano, con la remoción de HTP y el contenido de MO ($r = -0,84$, $p < 0,001$; $r = -0,96$, $p < 0,0001$; $r = -0,72$, $p < 0,001$, respectivamente). Los resultados indicaron que la concentración de HTP disminuye en proporciones similares a la disminución de la concentración de P en suelo y se puede inferir que el P del suelo fue el nutriente que favoreció la activación de los microorganismos autóctonos y los del bagazo de caña con capacidad de remoción de los contaminantes. Puesto que en la comparación de los tratamientos estos nutrientes favorecieron el crecimiento de las bacterias y que este crecimiento permitió aumentar la remoción de HTP del suelo.

En otras investigaciones que no utilizaron residuos agroindustriales, observaron que la proporción de nutriente agregado a la matriz del suelo es adecuada para reactivar a la población microbiana [24]. Esta respuesta en el consumo de nutrientes fue similar al observado en nuestro estudio, y en otro trabajo similar [18], en donde se registró que el P fue el macronutriente con mayor efecto sus sistemas de tratamiento, así como lo observado en el presente estudio. Por otro lado, la fluctuación del pH estuvo en los niveles adecuados para promover el crecimiento microbiano y la biodegradabilidad en los sistemas de acuerdo al reporte de Riser-Roberts [27].

La concentración de N disminuyó rápidamente en los primeros días de la cinética, en donde el máximo consumo de N (93%) se presentó a los 15 días, aunque a los diez días el N consumido fue de 84,5% y después se mantuvo sin cambios relevantes hasta el final de la cinética (Tabla 3).

Además durante el proceso de remoción de HTP, el crecimiento de las bacterias y de los hongos fue variable durante la cinética (Tabla 4). Aunque en un inicio se hubo un nulo crecimiento de hongos, y después de cierto tiempo se fueron reactivando. Por lo que el crecimiento máximo de bacterias y hongos se presentó a los 15 días (200×10^5 UFC/g de suelo seco y 6×10^5 UFC/g de suelo seco, respectivamente) y al mismo tiempo que se presentó el máximo consumo de N. Finalmente la actividad bacteriana disminuyó hacia el final de la cinética.

El crecimiento de los hongos tuvo una correlación positiva con el crecimiento de bacterias ($r = 0,89$; $p < 0,0001$), con la remoción de HTP ($r = 0,91$; $p < 0,0001$) y con el con-

Tabla 3. Concentración promedio (\pm DS*) de nutrientes observados durante la cinética.

Tiempo (días)	Fósforo asimilable (mg/kg)	Nitrógeno (%)
0	5,12 \pm 0,025	0,895 \pm 0,065
5	4,83 \pm 0,056	0,699 \pm 0,012
10	4,07 \pm 0,040	0,142 \pm 0,02
15	3,53 \pm 0,122	0,0620 \pm 0,00
20	3,16 \pm 0,027	0,0680 \pm 0,00

*DS = Desviación estándar.

Tabla 4. Crecimiento promedio (\pm DS) de microorganismos y remoción de HTP durante la cinética.

Tiempo (días)	Bacterias CFU 10 ⁵ /g de suelo seco	Hongos CFU 10 ⁵ /g de suelo seco	Remoción de HTP* (%)
0	63 \pm 1,5	0,000 \pm 0,0	4,02 \pm 1,02
5	64 \pm 5,2	0,016 \pm 0,005	11,83 \pm 1,81
10	95 \pm 5,3	1,0 \pm 0,1	16,97 \pm 0,07
15	200 \pm 0,5	6,3 \pm 0,2	20,73 \pm 1,8
20	169,3 \pm 14,2	6,0 \pm 0,2	27,94 \pm 2,47

*DS = Desviación estándar. *Valor ajustado con grupo control.

tenido de MO ($r = 0,64$; $p < 0,0094$), además se presentó una correlación negativa con el contenido de N ($r = -0,92$; $p < 0,0001$), con la concentración de P ($r = -0,91$; $p < 0,0001$) y con el contenido de humedad ($r = -0,73$; $p < 0,0021$).

Estos resultados demuestran que los microorganismos del suelo fueron fundamentales en el proceso de biorremediación, y que de acuerdo al número de microorganismos, las bacterias fueron la población dominante, que consumió más nutrientes y que en sinergia con los hongos usaron como sustrato a los hidrocarburos. El pH durante la cinética se mantuvo en un rango de entre 6,4 y 6,7, el valor de pH en el momento de máximo crecimiento bacteriano fue de 6,7. A los 20 días el pH descendió hasta 6,2. Al inicio el contenido de MO fue de 3,47% y a los quince días de 6,03% finalmente disminuyó a los 20 días 5,08%. El contenido de MO presentó correlación con la humedad ($r = -0,95$, $p < 0,0001$) y con la remoción de HTP ($r = 0,60$, $p < 0,02$).

Consideraciones finales

En el diseño de experimentos el mayor porcentaje de remoción de HTP fue de 30% y se obtuvo bajo las siguientes condiciones: TP de 7,4 mm, 60% de humedad del suelo y 28°C. En la cinética se logró una remoción de 28% de HTP en 20 días de tratamiento, al mismo tiempo que se

presentó el máximo crecimiento de bacterias y hongos, se sugirió que los hongos y las bacterias trabajan en sinergia para biodegradar los contaminantes del suelo. En este estudio el P fue el nutriente con mayor efecto en la remoción de HTP. Finalmente el TP más grande del bagazo de caña no sólo aumentó la oxigenación del suelo, sino también bioestimuló a los microorganismos autóctonos de los suelos con un aporte de nutrientes (especialmente con el N). Para futuras investigaciones se sugiere incrementar el tiempo experimental y optimizar el tamaño de partícula para lograr observar los cambios significativos en los porcentajes de remoción de HTP.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por FOMIXVER-37127-CONACYT. Los autores expresamos nuestra gratitud a PEMEX Refinación Ductos por el suelo proporcionado, y al Ingenio Azucarero Cuatotolapan por el bagazo de caña de azúcar donado.

Referencias

- [1] ADMON, S., GREEN, M., AVNIMELECH, Y. (2001). Biodegradation kinetics of hydrocarbons in soil during land treatment of oily sludge. *Bioremediation Journal*. 5: 193-209.

- [2] ARCE-ORTEGA, J.M.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; ROJAS-AVELIZAPA, N.G. (2004). Identification of recalcitrant hydrocarbons present in drilling waste polluted soil. **J. Environ. Sci. Health, Part A**: A39 (6):1535-1545.
- [3] ATLAS, R.M. (1991). Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. **J. Chem. Techn. Biot.** 52: 149-156.
- [4] ATLAS, R.M. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: and Environmental Perspective. **Microbiol. Rev.** 45 (1): 180-209.
- [5] BARTHA, R. (1986). Biotechnology of petroleum pollutant biodegradation. **Microbiol. Ecol.** 12: 155-172.
- [6] CLARK, E.F. (1982). Agar-plate Methods for Total Microbial Count. In: Page, A.L., et al. (Eds.), **Methods of soil analysis**, Agronomy No. 9 Part 2. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin. Pp.1460-1466.
- [7] CLINE, M. (1994). Principles of soil sampling. **Soil Sci.** 58: 275-288.
- [8] COOKSON, J.T. (1999). **Bioremediation engineering design and application**. Mc Graw Hill, Inc. New York.
- [9] CRUZ-CORDOBA, T.; ROLDÁN, C.T.; DÍAZ, C.D.; ORTEGA, L.J.; SAUCEDO, C.G.; TOMASINI, C.A.; RODRÍGUEZ, V.R. (1999). CO₂ evolution and ligninolytic and proteolytic activities of *Phanerochaete chrysosporium* grown on solid state fermentation. **Resour. Conserv. Recy.** 27: 3-7.
- [10] CUEVAS-DÍAZ, M. (2008). Efecto de la adición un fertilizante y paja de avena en un sistema de biopila para la eliminación de diesel de un suelo. Tesis de maestría en Ingeniería Ambiental. Instituto de Ingeniería. Universidad Veracruzana.
- [11] CUEVAS-DÍAZ, M.; ROJAS-AVELIZAPA, N.; POGGY-VARALDO, H.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. (2005). Remoción de hidrocarburos totales de petróleo utilizando cultivo sólido. XVI Congreso Chileno de Ingeniería Química.
- [12] DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (DOF). (2002). NOM-021-RECNAT-2000, **Norma Oficial Mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis**. México.
- [13] DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (DOF). (2005). NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, **Norma Oficial Mexicana, Límites máximos permisibles en hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación**. México.
- [14] GARCÍA-TORRES, R.; RÍOS-LEAL, E.; MARTINEZ-TOLEDO, A.; RAMOS-MORALES, F.R.; CRUZ-SANCHEZ, J.S.; CUEVAS-DÍAZ, M del C. (2011). Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. **Rev. Int. Contam. Ambie.** 27(1): 31-39.
- [15] GANDOLFI, I.; SICOLO, M.; FRANZETTI, A.; FONTANAROSA, E.; SANTAGOSTINO, A.; BESTETTI, G. (2010). Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. **Bioresource Technology.** 101: 568-575.
- [16] Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). (1998). **Análisis a nivel nacional de la producción de caña de Azúcar**. México. Pp 10-11, 35-38.
- [17] Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal (INAFED). Enciclopedia de los municipios de México. Estado de Veracruz de Ingancio de la Llave. Hueyapan de Ocampo (Documento en línea). Disponible: <http://www.inafed.gob.mx/work/templates/enciclo/veracruz/> (consulta: 2009, diciembre 15).
- [18] LIEBEG, E.W., CUTRIGHT, T.J. (1999). The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micro nutrients in a PAH contaminated soil. **Int. Biode-terior. Biodegrad.** 44: 55-64.
- [19] MALETIĆ, S.; DALMACIJA, B.; RONČEVIĆ, S.; AGBABA, J.; PETROVIĆ, O. (2009) Degradation kinetics of an aged hydrocarbon-contaminated soil. **Water Air Soil Poll.** 202: 149-159.
- [20] MOLINA-BAROHONA, L.; RODRÍGUEZ, V.R.; HERNÁNDEZ, V.M.; VEGA, J. (2004). Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Appl. Soil. Ecol.** 27:165-175.
- [21] CRAWLEY, M. (1993). **GLIM for ecologists** Blackwell Scientific Publications.
- [22] MUÑOZ-INIESTRA, D.J.; MENDOZA-CANTU, A.; LÓPEZ-GALINDO, F.; SOLER-ABURTO, A.; HERNÁNDEZ-MORENO, M.M. (2000). **Manual de métodos de análisis de suelos**. UNAM, México.
- [23] PÉREZ-ARMENDARIZ, B.; LOERA, C.O.; FERNANDEZ-LINARES, L.; ESPARZA-GARCÍA, G.F.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. (2004). Biostimulation of microorganisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. **Lett. Appl. Microbiol.** 38: 373-377.
- [24] RAHMAN, K.S.M.; RHAMAN, T.J.; KOURKOUTAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. (2003). Enhanced bioremediation of n-alkenes in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technol.** 90: 159-168.
- [25] RHYKERD, R.L.; CREWS, B.; MCINNES, K.J.; WEAVER, R.W. (1999). Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. **Bioresource Technol.** 67: 279-285.
- [26] SAYARA, T.; POGNANI, M.; SARRÀ, M.; SÁNCHEZ, A. (2010). Anaerobic degradation of PAHs in soil: Impacts of concentration and amendment stability on the PAHs degradation and biogas production. **Int. Biodeter. Biodegr.** 64, 286-292.
- [27] RISER-ROBERTS, E. (1998). **Remediation of petroleum of contaminated soils. Biological, physical and chemical processes**. Lewis Publisher, Washington, Pp.542.
- [28] ROLDÁN-CARRILLO, T.; RODRÍGUEZ V. R.; DÍAZ-CERVANTES, D.; VÁZQUEZ-TORRES, H.; MANZUR-GUZMÁN, TORRES-DOMÍNGUEZ, A. (2003). Starch-based plastic polymer degradation by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane

- bagasse pith: enzyme production. **Bioresource Technol.** 86(1): 1-5.
- [29] ROLDÁN-MARTÍN, A.; ESPARZA-GARCÍA, F.; CALVA-CALVA, G.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. (2006). Effects of mixing low amounts of orange peel (*Citrus reticulata*) with hydrocarbon-contaminated soil in solid culture to promote remediation. **J. Environ. Sci. Health, Part A:** A41, 1-13.
- [30] RONČEVIĆ, S.; DALMACIJA, B.; IVANČEV-TUMBAS, I.; TRIČKOVIĆ, J.; PETROVIĆ, O.; KLAŠNJA, M.; AGBABA, J. (2005). Kinetics of degradation of hydrocarbons in the contaminated soil layer. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 49: 27-36.
- [31] SCHWAB, A.P.; SU, J.; WETZEL, S.; PEKAREK, S.; BANKS, M.K. (1999). Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. **Environ. Sci. Technol.** 33: 1940-1945.
- [32] SEMARNAT (2008) Informe 2008. Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales (Documento en línea) Disponible: http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_2008/07_residuos/cap_6.html (consulta: 2009, septiembre 5).
- [33] US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 1664. N-Hexane Extractable Material (HEM) and Silica Gel Treated N-Hexane Extractable Material (GT-HEM) by Extraction and Gravimetry (Oil and Grease and Total Petroleum Hydrocarbons) (Documento en línea) Disponible: http://water.epa.gov/scitech/swguidance/methods/oil/upload/2007_07_10_methods_method_oil_1664.pdf (consulta: 2008, octubre, 25).
- [34] VALLEJO, V.; SALGADO, L.; ROLDAN, F. (2005). Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de HTPs en suelos contaminados con petróleo. **Rev. Colomb. Biotecnol.** 7(2): 67-78.
- [35] WASKMAN, S.A. (1952). **Soil microbiology.** John Wiley and Sons. Pp 356. Inc. New York.
- [36] YUDONO, B. (2009). Kinetics of indigenous isolated *Bacillus mycoides* used for ex-situ bioremediation of petroleum contaminated soil in PT Pertamina Sungai Lilin South Sumatera. **Journal of Sustainable Development.** 2: 64-71.
- [37] XUA, Y.; LU, M. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **J. Hazard. Mater.** 183: 395-401.
-