



UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
DIVISIÓN ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



Maestría en Ingeniería y Protección Ambiental

**“REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL
PETRÓLEO DE SUELOS CONTAMINADOS, CON
SUBSTANCIAS HÚMICAS DE LIGNITA Y DE
VERMICOMPOSTA EN EL ESTADO DE TABASCO”**

TRABAJO RECEPCIONAL BAJO LA MODALIDAD DE:

TESIS

PRESENTA:

BIOL. ÁFRICA ÁNGELES PADILLA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA Y PROTECCIÓN

AMBIENTAL

ASESORES:

Dr. MIGUEL ANGEL HERNÁNDEZ RIVERA

M.C. REYNA LOURDES FÓCIL MONTEERRUBIO

VILLAHERMOSA, TABASCO

MAYO 2012

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISION ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MARZO 15 DE 2012

**C. AFRICA ANGELES PADILLA
PAS. DE LA MAESTRIA EN INGENIERIA Y PROTECCION
AMBIENTAL
P R E S E N T E.**

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ingeniería y Protección Ambiental titulado: **"REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO DE SUELOS CONTAMINADOS CON SUSTANCIAS HUMICAS DE LIGNITA Y VERMICOMPOSTEO EN EL ESTADO DE TABASCO"**, asesorado por la M. en c. Reyna Lourdes Focil Monterrubio y Dr. Miguel Ángel Hernández Rivera sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado el M. en C. Carlos Alberto Torres Balcazar, M. en C. Jorge Fco. Fernando Molina Enríquez-Murguía, M. en c. Reyna Lourdes Focil Monterrubio, Miguel Ángel Hernández Rivera y M. I. Marcia Eugenia Ojeda Morales.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E
ESTUDIO EN LA DUDA. ACCION EN LA FE**

**M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA**

C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo



CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO DE SUELOS CONTAMINADOS CON SUSTANCIAS HUMICAS DE LIGNITA Y VERMICOMPOSTEO EN EL ESTADO DE TABASCO”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el día Quince de Marzo del año 2012.

AUTORIZO

AFRICA ANGELES PADILLA

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISION ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Villahermosa, Tab., 15 de Marzo de 2012

ASUNTO: Autorización de Modalidad de Titulación

C. LIC. MARIBEL VALENCIA THOMPSON
JEFE DEL DEPTO. DE CERTIFICACIÓN Y TITULACION
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E

Por este conducto y de acuerdo a la solicitud correspondiente por parte del interesado, informo a usted, que en base al reglamento de titulación vigente en esta Universidad, ésta Dirección a mi cargo, autoriza a la **C. AFRICA ANGELES PADILLA** egresada de la en **INGENIERIA Y PROTECCION AMBIENTAL** de la División Académica de **CIENCIAS BIOLÓGICAS** la opción de titularse bajo la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **"REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS DERIVADOS DEL PETRÓLEO DE SUELOS CONTAMINADOS CON SUSTANCIAS HUMICAS DE LIGNITA Y VERMICOMPOSTEO EN EL ESTADO DE TABASCO"**.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para saludarle afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA DE LA DIVISION ACADEMICA
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UJAT
DIVISION ACADEMICAS
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DIRECCION

C.c.p.- Expediente Alumno de la División Académica
C.c.p.- Interesado

Remoción de hidrocarburos derivados del petróleo de suelos contaminados, con sustancias húmicas de lignita y de vermicomposta en el estado de Tabasco

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	www.natlaw.com Internet	1070 palabras — 4%
2	archivos.ujat.mx Internet	593 palabras — 2%
3	www.researchgate.net Internet	404 palabras — 1%
4	www.scribd.com Internet	335 palabras — 1%
5	rua.ua.es Internet	326 palabras — 1%
6	www.coursehero.com Internet	299 palabras — 1%
7	docplayer.es Internet	252 palabras — 1%
8	repositorio.unsa.edu.pe Internet	214 palabras — 1%
9	vdocumento.com Internet	202 palabras — 1%

10	www.scielo.org.mx Internet	186 palabras — 1%
11	dspace.unitru.edu.pe Internet	182 palabras — 1%
12	dof.gob.mx Internet	161 palabras — 1%
13	repositorio.uaaan.mx Internet	147 palabras — 1%
14	www.cofemermir.gob.mx Internet	139 palabras — 1%
15	es.scribd.com Internet	120 palabras — < 1%
16	doczz.es Internet	97 palabras — < 1%
17	es.slideshare.net Internet	92 palabras — < 1%
18	www.docstoc.com Internet	83 palabras — < 1%
19	cabierta.uchile.cl Internet	70 palabras — < 1%
20	www.paot.org.mx Internet	69 palabras — < 1%
21	docslide.us Internet	61 palabras — < 1%

22	www.larevista.com.mx Internet	53 palabras — < 1%
23	repositorio.unc.edu.pe Internet	50 palabras — < 1%
24	ninive.ismm.edu.cu Internet	31 palabras — < 1%
25	www.librosymanualesdeagronomia.com Internet	29 palabras — < 1%
26	fdocuments.es Internet	28 palabras — < 1%
27	repositorio.ug.edu.ec Internet	27 palabras — < 1%
28	siga.jalisco.gob.mx Internet	27 palabras — < 1%
29	www.buenastareas.com Internet	26 palabras — < 1%
30	repositorio.uaaan.mx:8080 Internet	25 palabras — < 1%
31	hdl.handle.net Internet	21 palabras — < 1%
32	pt.slideshare.net Internet	20 palabras — < 1%
33	recursosbiblio.url.edu.gt Internet	20 palabras — < 1%

www.slideshare.net

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS

< 20 PALABRAS

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi amiga Marcia E. Ojeda Morales quien fue fundamental para la terminación y publicación del presente trabajo, al Doctor Miguel A. Hernández Rivera por sus acertadas revisiones y comentarios, a mis maestros, amigos, colegas, familia y transeúntes en general que pasan por mi vida dejando un cúmulo de conocimientos consciente e inconscientemente. Gracias por darme tanto.

Al Ing. Alfredo Castro quien sin saberlo ha sido fundamental para la culminación del presente trabajo, gracias por darme su apoyo y seguridad.

Por último, quiero hacer tres menciones muy importantes y a la vez determinantes en la finalización del presente trabajo, a mi madre quien aporta ese delicado amor a mi vida, a Luis pues sin su paciencia y amor tampoco hubiera logrado dar este paso y por último pero que siempre es primero, a Dios quien permitió que esto fuera posible.

África Angeles Padilla

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a Camila, Ivana y Sofía, por que despertar su ingenio y la búsqueda permanente del conocimiento, sea su concepto de vida y mi mayor ilusión.

También le dedico el presente trabajo a todo aquel que se encuentra verdaderamente preocupado y ocupado, en la búsqueda de herramientas que estén al alcance de cualquier persona interesada en mejorar las condiciones ambientales de este nuestro hogar llamado tierra.

Africa Angeles Padilla

ÍNDICE

	Página
Lista de figuras	iv
Lista de cuadros	vi
Resumen	ix
I Introducción	x
II Antecedentes	xi
III Objetivo general y específicos	xiv
CAPÍTULO I. GENERALIDADES	
ANTECEDENTES DEL PETRÓLEO	1
1.1 El petróleo	3
1.2 Origen del petróleo	4
1.3 Composición del petróleo	4
1.4 Tipos de hidrocarburos	5
1.4.1 Hidrocarburos saturados	5
1.4.2 Hidrocarburos aromáticos	5
1.4.2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos	5
1.4.3 Fracción polar	5
1.5 Características químicas y físicas del petróleo	6
1.6 Rutas metabólicas de la degradación del petróleo	7
1.7 Fuentes de contaminación por hidrocarburos.	9
1.8 Impacto ambiental en el estado de Tabasco	10
1.9 El suelo	10
1.9.1 Tipos de suelos en Tabasco y sus variaciones	11
1.10 La biorremediación como técnica de restauración de suelos	13
1.11 Las tecnologías de Biorremediación	15

1.11.1 Tecnologías <i>in situ</i>	15
1.11.2 Tecnologías <i>ex situ</i>	16
1.12 Las tecnologías de biorremediación en México	19
1.13 Factores ambientales que afectan la biodegradación	20
1.14 Descripción general de las sustancias húmicas.	23
1.14.1 Composición y estructura.	27
1.15 Mecanismos de acción en el suelo	29
1.16 Sustancias húmicas comerciales.	32
1.17 Sustancias húmicas provenientes de vermicomposteo.	32
1.17.1 Vermicompostaje (ácidos húmicos, fúlvicos y humina)	34
1.17.2 Ácidos húmicos	35
1.18 Usos de las bacterias en la biorremediación	36
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODO	
FASE DE CAMPO	
2.1 Estudio agrológico y ubicación de los perfiles típicos	39
2.2 Caracterización del suelo, colecta y conservación de la muestra	40
2.2.1 Obtención de la muestra para determinar propiedades fisicoquímicas	40
FASE DE LABORATORIO	
2.3 Procesamiento de las muestras de los suelos	40
2.3.1 Determinación de ácidos húmicos (AH) y fúlvicos (AF)	41
2.4 ELABORACIÓN DE LA VERMICOMPOSTA	42
2.5 Selección de la vermicomposta	43
2.6 Caracterización del suelo	43
2.6.1 Análisis físicos y químicos de las muestras de suelos	43
2.7 Establecimiento del experimento en laboratorio	45

2.8	Pretratamiento del petróleo	46
2.8.1.	Estabilización del petróleo crudo	46
2.9.	Contaminación y acondicionamiento del suelo	48
2.9.1.	Tratamiento sin vermicomposta	48
2.9.2	Tratamiento con vermicomposta orgánica	50
2.9.3	Tratamiento sustancias humitas comerciales	53
2.10	Seguimiento del experimento en el laboratorio	54
2.11	Evaluaciones físico-químicas y biológicas en las unidades experimentales.	55
2.11.1.	Medición de propiedades físicas: humedad y temperatura.	55
2.11.2.	Medición de las propiedades químicas: pH y HTP(Fracción pesada)	56
2.11.3.	Medición de propiedades biológicas: conteo de células viables.	57
 CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
3.1	Caracterización del suelo	58
3.2	Medición de pH del suelo	59
3.3	Medición de la temperatura	60
3.4	Adición de la vermicomposta	61
3.5	Determinación de humedad	61
3.6.	Determinación de la conductividad eléctrica (c.e.)	62
3.7.	Determinación de la fracción pesada de HTP	62
3.8.	Medición de las propiedades biológicas: conteo de células viables	68
3.8.1.	Población de bacterias en Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	68
3.9	Análisis costo-beneficios	75
	Conclusión	77
	Recomendaciones	78
	Literatura citada	79
	Glosario	91

Apéndice	93
Anexo	107
Lista de figuras	
Figura 1. Vía metabólica oxidativa de los hidrocarburos alifáticos	8
Figura 2. Vía propuesta para la degradación bacteriana del naftaleno.	9
Figura 3: Horizontes del Suelo.	11
Figura 4. Superficie aproximada de los grupos mayores de los suelos en Tabasco	13
Figura. 5. Esquema de la reacción.	14
Figura 6. Biorestauración <i>ex situ</i> de agua y suelo.	17
Figura 7. Tecnologías de remediación para suelos utilizadas en México.	20
Figura 8. Los componentes de la materia orgánica del suelo.	23
Figura 9. Fraccionamiento de las sustancias húmicas Stevenson (1994).	25
Figura.10. Fraccionamiento de las sustancias húmicas. Propiedades.	26
Figura 11. Estructura del ácido húmico.	29
Figura 12. Zonas afectadas por hidrocarburos.	38
Figura 13. Mapa de los suelos.	39
Figura. 14. Preparación de la vermicomposta.	43
Figura 15. Procedimiento para el conteo de células viables utilizando el método de conteo en placas por diluciones seriadas.	44
Figura 16. Estabilización del petróleo crudo.	46
Figura 17. Contaminación del suelo.	50
Figura 18. Adición de vermicomposta orgánica y humatos.	53
Figura 19. Medición de la humedad.	55

Figura 20. Medición de temperatura.	56
Figura 21. Medición del pH del suelo.	56
Figura 22. Cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo por extracción Soxhlet.	57
Figura 23. Cuantificación de microorganismos presentes en el suelo.	57
Figura 24. HTP en el suelo Arcilloso a) a los 15 días, b) 30 días, c) 45 días d) 60 días	63
Figura 25. HTP en el suelo Arcilloso-Limoso a) a los 15 días, b) 30 días c) 45 días, d) 60 días	64
Figura 26. HTP en el suelo Migajón-Arenoso a) a los 15 días, b) 30 días c) 45 días, d) 60 días	65
Figura 27. Comparación de la degradación en los tres tipos de suelos a los 60 días (medias con letras comunes en barras no difieren significativamente $\alpha \leq 0.05$)	66
Figura 28. UFC en el suelo Arcilloso a) a los 15 días, b) 30 días, c) 45 días d) 60 días	69
Figura 29. UFC en el suelo Arcilloso-Limoso a) a los 15 días, b) 30 días c) 45 días, d) 60 días	70
Figura 30. UFC en el suelo Migajón-Arenoso a) a los 15 días, b) 30 días c) 45 días, d) 60 días	71
Figura 31. Comparación del crecimiento de UFC/gramo de suelo seco $\times 10^4$ en los tres tipos de suelo a los 45 días.	72
Figura 32. Análisis de predicción.	74

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Comparación de propiedades de los tres diferentes tipos de hidrocarburos en México (Olmeca, Istmo y Maya).	6
Cuadro 2. Análisis elemental de las sustancias húmicas.	26
Cuadro 3. Intervalos usuales para la composición elemental de las sustancias húmicas	27
Cuadro 4. Grupos funcionales presentes en las sustancias húmicas.	28
Cuadro 5. Distribución de grupos funcionales oxigenados en sustancias húmicas (meq/100g).	28
Cuadro 6. Bacterias degradadoras.	37
Cuadro 7. Tratamientos y repeticiones para establecer el experimento.	45
Cuadro 8. Características principales de los suelos muestreados en base a los valores de los parámetros de caracterización.	59
Cuadro 9.- Análisis de costo-beneficio.	76
Cuadro 10. Interpretación de resultados de pH	93
Cuadro 11. Interpretación de resultados de Materia orgánica	93
Cuadro 12. Interpretación de resultados de Fósforo.	93
Cuadro 13. Interpretación de resultados de Magnesio y Calcio.	93
Cuadro 14. Interpretación de resultados de Nitrógeno Total.	94
Cuadro 15. Resultados de la determinación de ácidos húmicos y fúlvicos para la selección de la vermicomposta.	94
Cuadro 16. Resultados de la determinación de ácidos húmicos y fúlvicos en las vermicompostas utilizadas.	94

Cuadro 17. Promedio de los análisis de HTP del suelo 1. Arcilloso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.	94
Cuadro 18. Promedio de los análisis de UFC del suelo 1. Arcilloso, a los 0, 15, 30, 45 y 60 días.	95
Cuadro 19. Promedio de los análisis de humedad (%) del suelo 1. Arcilloso, a los 0, 15, 30, 45 y 60 días	95
Cuadro 20. Promedio de los análisis de pH del suelo 1. Arcilloso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.	95
Cuadro 21. Promedio de los análisis de temperatura (°C) del suelo 1. Arcilloso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.	96
Cuadro 22. Promedio de los análisis de Conductividad eléctrica (dS/cm) del suelo 1. Arcilloso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.	96
Cuadro 23. Promedio de los análisis de HTP suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 15, 30, 45 y 60 días.	96
Cuadro 24. Promedio de los análisis de UFC del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 15, 30, 45 y 60 días.	97
Cuadro 25. Promedio de los análisis de humedad (%) del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 15, 30, 45 y 60 días.	97
Cuadro 26. Promedio de los análisis de pH del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.	97
Cuadro 27. Promedio de los análisis de temperatura (°C) del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.	98
Cuadro 28. Promedio de los análisis de Conductividad eléctrica (dS/cm) del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.	98
Cuadro 29. Promedio de los análisis de HTP suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.	98

Cuadro 30. Promedio de los análisis de UFC del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.	99
Cuadro 31. Promedio de los análisis de humedad (%) del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0, 15, 30, 45 y 60 días.	99
Cuadro 32. Promedio de los análisis de pH del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.	99
Cuadro 33. Promedio de los análisis de temperatura (°C) del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.	100
Cuadro 34. Promedio de los análisis de Conductividad eléctrica (dS/cm) del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.	100
Cuadro 35. Análisis de varianza de la degradación de HTP a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 1. Arcilloso.	101
Cuadro 36. Análisis de varianza de la degradación de HTP a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 2. Arcilloso-Limoso.	102
Cuadro 37. Análisis de varianza de la degradación de HTP a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 3. Migajón-Arenoso.	103
Cuadro 38. Análisis de varianza del crecimiento de las UFC/g suelo seco a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 1. Arcilloso.	104
Cuadro 39. Análisis de varianza del crecimiento de las UFC/g suelo seco a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 2. Arcilloso-Limoso.	105
Cuadro 40. Análisis de varianza del crecimiento de las UFC/g suelo seco a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 3. Migajón-Arenoso.	106

Resumen

En el estado de Tabasco la industria petrolera ha generado una gran demanda de tecnologías eficientes para el tratamiento de suelos contaminados. En este contexto las sustancias húmicas se perfilan como una opción técnica y económicamente viable, en la presente investigación se determinó la eficiencia de las mismas para este fin en tres de los principales tipos de suelos del estado de Tabasco, reconociendo que dependiendo de las características de cada uno de ellos se obtendrán diferentes resultados y eficiencias en el tratamiento, en el presente proyecto se probó la eficiencia del tratamiento para suelos tipo arcilloso, arcillo-limoso y migajón-arenoso; comparando las sustancias húmicas (SH) comerciales y las provenientes de vermicomposteo de residuos generados en nuestro Estado. La metodología seguida comprendió básicamente cinco puntos específicos: 1) selección de la vermicomposta; ésta se realizó en función de la vermicomposta que contuvo la mayor cantidad de SH a partir de residuos de caña de azúcar, arroz, cacao, estiércol de vaca y una mezcla de todos. 2) Muestreo del suelo contaminado; que fue en tres tipos (arcilloso-limoso, arcilloso y arenoso). 3) Fase experimental; en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial $3 \times 3 \times 2$ con 3 repeticiones, comparando la respuesta que se obtuvieron de las SH comerciales y de vermicomposteo para los tres diferentes tipos de suelos. 4) Análisis de predicción realizado mediante regresión exponencial (Nakamura, 1997). 5) Análisis costo/beneficio, se realizó extrapolando los gastos obtenidos para efecto de la presente prueba por metro cúbico. Los datos obtenidos se analizaron en un paquete estadístico SAS versión 6.0, mediante un análisis de varianza a través de una prueba de medias (Tuckey, $\alpha \leq 0.05$), los resultados evidenciaron que el mejor tratamiento fue el acondicionado con vermicomposta orgánica con microorganismos (VOCM): suelo arcillo-limoso, con una humedad del 70% de la capacidad de campo, pH entre 6.71 ± 0.102 , temperatura de 28.23 ± 0.5263 y una conductividad eléctrica de 0.921 ± 0.07 ; presentó una tasa de degradación del 84.54% durante 60 días que duró el experimento.

INTRODUCCION.

La sociedad humana y las actividades industriales que conllevan al desarrollo de un país, han generado productos y materiales que al incorporarse en cualquiera de sus formas al medio alteran o modifican su composición natural. En el estado de Tabasco entre otras actividades la industria petrolera ha crecido a un ritmo acelerado a partir de los años 70 y hasta la fecha, y las consecuencias de este crecimiento han sido, por mencionar algunos, contaminación por las actividades de explotación, extracción, refinación, transporte, conducción y almacenamiento del petróleo.

En las últimas décadas los suelos del estado de Tabasco, se han visto alterados por la actividad industrial predominante, que es la industria petrolera; que a la postre, han generado una gran demanda de tecnologías eficientes para el tratamiento, limpieza y rehabilitación ambiental, debido a los problemas de contaminación en suelos.

La presente investigación plantea una propuesta tecnológica para la degradación de los contaminantes originados por la actividad petrolera en el estado de Tabasco. Utilizando la vermicomposta producida en el estado como agente precursor de la degradación, con la cual se puede remediar suelos contaminados bajo los requerimientos legales aplicables y a un bajo costo.

Dado que actualmente existen tecnologías basadas en elementos que pueden ser obtenidos a partir de la vermicomposta y que son adquiridos con altos costos de empresas extranjeras como lo son, las sustancias húmicas comerciales.

II ANTECEDENTES

Los ácidos húmicos fueron reconocidos por el hombre desde hace miles de años, como un factor asociado con la productividad agrícola; sin embargo, los primeros estudios realizados datan de 1761 por Walerius, trabajos más detallados fueron realizados a partir del presente siglo por Kononova, Tyurien, Waksman, Schnitzer y otros. A pesar de conocer la importancia de los ácidos húmicos, no fue posible incorporar su uso en la producción agrícola comercial con éxito, sino hasta recientemente, y se considera que su adopción será muy rápida y que generará grandes cambios en la tecnología de producción (Kononova, 1966).

Stevenson (1982), Al ken *et al.*, (1985), Hayes *et al.*, (1989) han presentado revisiones completas sobre extracción, fraccionamiento y propiedades, comportamiento de la materia orgánica y del humus en suelos y en ambientes naturales.

Los investigadores europeos han formulado una clasificación del humus que se ajusta a las condiciones ambientales variables de ese continente. Esta clasificación está basada en la morfología de los horizontes orgánicos, que es la resultante de los dos procesos fundamentales de la evolución de la materia orgánica: la mineralización y la humificación. Tanto la naturaleza de los productos formados como su grado de interacción con la matriz mineral son elementos importantes de esa clasificación (Duchaufour 1975).

Faust, (1996), pone de manifiesto un incremento del 100% en la producción utilizando el ácido húmico combinados con fertilizantes conteniendo NPK. Estos incrementos fueron obtenidos en el cultivo de patatas, cebada y repollo.

En la investigación "Efecto de los ácidos húmicos sobre la toxicidad del aluminio en plantas de maíz", Tan, citado por Faust, (1996), mostró que los ácidos húmicos pueden proteger las plantas en contra del efecto dañino del aluminio.

En un estudio con patatas, soya y otros cultivos con la aplicación de ácidos húmicos, Senn y Kingman, citados por Faust, (1996), mostraron un incremento en la producción. Algunos autores como Varanini, *et al.*, 1955, Dubbini, 1995, Chukov, *et al.*, 1996; han observado efectos "bioprotectores" por la aplicación de sustancia húmicas sobre cultivos que se desarrollan en condiciones de estrés, entre ellos en salino, Chaminade (1956), ya

muestra que aplicaciones de sustancias húmicas reducen los efectos negativos sobre los cultivos, de dosis elevadas de fertilizantes minerales. Los mecanismos a través de los cuales las sustancias húmicas actúan como bioprotectores no están claramente establecidos, aunque se apunta hacia la presencia en ellas de radicales libres estabilizados y a su actividad paramagnética (Chukov, et al., 1996; Aliev, 1983) como los causantes del papel fisiológico de estos materiales, a través de su intervención en algunas rutas metabólicas del vegetal como la cadena respiratoria, en la cual actuarían como donadores de electrones.

Dicha actividad paramagnética de las sustancias húmicas reside según Flaig (1958-1970), en la presencia de derivados o-quinónicos. Los cuales pueden actuar como deshidratasas en los procesos oxidativos celulares, tomando así mismo parte en la formación de compuestos de tipo auxínico. Por otro lado Piccolo *et al.*, (1990-1992) afirman que la actividad fisiológica de las sustancias húmicas depende del contenido de grupos funcionales carboxílicos e hidroxílicos en su estructura molecular.

Los ácidos húmicos y fúlvicos alteran a los aceites y los convierten en ácidos grasos y azúcares por reacciones químicas y estimulación de las actividades microbianas. Esto lo afirman Morris *et al.*, (1999); y se ha pensado que actúan como un catalizador para las enzimas en el proceso de degradación de aceites. Se ha encontrado que el ácido fúlvico es un agente ionizante muy eficaz ya que remueve los iones metálicos de las moléculas de sal. Ambos materiales, en presencia de un adecuado suministro de nitrógeno, estimula la actividad de microorganismos naturales.

Los humatos por naturaleza contienen carbón disponible y otros estimulantes orgánicos como una fuente de energía para los microbios. Cuando se le agrega nitrógeno, ocurre un mejoramiento en la actividad de los microorganismos naturales este incremento de actividad microbiana genera una biorremediación de hidrocarburos (Kanauf, 1993).

Sin embargo Morris *et al.*, (1999) determinaron que pequeñas cantidades de humatos mejoran la actividad microbiana. Conforme el porcentaje de humato que se incrementa hay un incremento en la actividad de los microorganismos que se pueden salir de control, con estos datos se puede considerar que hay que dosificar la cantidad de humatos tomando en cuenta el incremento de actividad. Experimentos desarrollados por Morris et

al., (1999), utilizando los procedimientos de Kanauf, examinaron los humatos con variaciones en la cantidad de ácido húmico.

Suponiendo un adecuado suministro de nitrógeno en el suelo, los resultados de estas pruebas indican incremento en los niveles de la actividad microbiana, conforme se incrementa la concentración de ácido húmico. Cuando las concentraciones de ácido húmico excedían de 50 %, los niveles de actividad variaron mucho, alternando entre niveles altos y bajos. Para concentraciones debajo del 50 %, los niveles de actividad se mantienen relativamente constantes.

III Objetivo general

Determinar la degradación de hidrocarburos totales del petróleo en diferentes tipos de suelos, utilizando sustancias húmicas en el tratamiento provenientes de lignito y vermicompostaje.

3.1 Objetivos particulares

1. Evaluar la remoción de hidrocarburos totales del petróleo con sustancias húmicas provenientes de vermicomposta y de lignito.
2. Determinar la mayor eficiencia de remoción en función de las sustancias húmicas provenientes de vermicomposta y de lignito, en los diferentes tipos de suelos, como la relación degradación-material-suelo.
3. Contrastar los resultados obtenidos con sustancias húmicas provenientes de vermicomposta y los resultados con sustancias húmicas comerciales.
4. Realizar la caracterización física, química y biológica del suelo seleccionado y del tipo de vermicomposta.
5. Evaluar en los tratamientos la cinética de degradación de hidrocarburos derivados del petróleo y la cinética del crecimiento microbiano en condiciones de laboratorio, bajo tratamientos con SHV y sin tratamiento.
6. Realizar un análisis costo-beneficio acerca del tratamiento.

III. Hipótesis

La velocidad de biodegradación de petróleo crudo en tres tipos de suelos, en condiciones de laboratorio, será mayor en presencia de sustancias húmicas provenientes de vermicomposta que en ausencia de ellas.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

CAPÍTULO I. GENERALIDADES

ANTECEDENTES DEL PETRÓLEO

Del petróleo se dice que es el energético más importante en la historia de la humanidad; un recurso natural no renovable que aporta el mayor porcentaje del total de la energía que se consume en el mundo. Aunque se conoce de su existencia y utilización desde épocas milenarias, la historia del petróleo como elemento vital y factor estratégico de desarrollo es relativamente reciente, de menos de 200 años.

Las primeras referencias que se tienen del petróleo en la antigüedad es la presencia de emanaciones de gases espontáneamente inflamadas desde el suelo. En otras oportunidades, el petróleo se manifestaba en corrientes de agua, siendo recogido y empleado en diversos usos como unguento para curar las heridas, enfermedades de la piel o dar masaje a los músculos reumáticos.

Fueron los egipcios los primeros en darle uso medicinal, ocupándolo también en embalsamamientos y como aceite para las ruedas de sus carruajes (Pemex, 1988).

En Babilonia fue utilizado como combustible y para unir mosaicos y piedras en sus construcciones. De igual modo, el historiador Plinio mencionó el manantial de Agrigento, que suministraba el aceite mineral de Sicilia para lámparas y Marco Polo, en la narración de sus viajes, describió el empleo del petróleo para el alumbrado, que era transportado en camellos hasta Bagdad.

En el año 100 antes de Cristo, los chinos se convirtieron en los primeros exploradores de petróleo. Buscaban en el lugar que les parecía adecuado y perforaban con taladros de bambú.

Muchos siglos después, En 1850 Samuel Kier, un boticario de Pittsburg, Pennsylvania (EE.UU.), lo comercializó por vez primera bajo el nombre de "aceite de roca" o "petróleo".

En 1859, un empresario norteamericano de apellido Drake, mandó perforar un pozo en Oil Creek, poblado cercano a Titusville, Pennsylvania, del cual extrajo petróleo por metros cúbicos. De este modo comenzó la llamada "fiebre del oro negro", período en que al petróleo bruto no se le pedía más que su aceite para el alumbrado y un poco de lubricante para ser refinado de manera muy rudimentaria.

A partir de entonces se puede decir que comenzó el desarrollo de la industria del petróleo y el verdadero aprovechamiento de un recurso que indudablemente ha contribuido a la formación del mundo actual. Luego se descubrieron también yacimientos en Rumania, Polonia, Rusia, las Islas de Sonda y en gran parte de los Estados Unidos.

La alta dependencia que el mundo tiene del petróleo y la inestabilidad que caracteriza el mercado internacional y los precios de este producto, han llevado a que se investiguen energéticos alternativos sin que hasta el momento se haya logrado una opción que realmente lo sustituya, aunque se han dado importantes pasos en ese sentido.

En nuestro país, la existencia de la *piedra aceitosa*, petróleo de base asfáltica, era ya conocida por los pobladores del México prehispánico; diversas culturas usaban el asfalto como pegamento, como medicina y como sacrificio religioso, ya que lo quemaban delante de sus ídolos. El *chapopote*, palabra que se deriva de los vocablos *popochithi*, que quiere decir perfume, y *zaucatl*, pegamento, era mercancía común en los mercados aztecas (IMP, 1985).

Aunque ya existían antecedentes de la explotación del petróleo en México, fue hasta 1882 cuando se inician en Tampico, Tamaulipas trabajos de exploración en forma sistemática. En el año de 1900 se llevaron a cabo las primeras perforaciones en San Luis Potosí y ocho años después inició operaciones la primera refinería, de la casa Pearson, en Minatitlán, Veracruz.

La Revolución Mexicana de 1910 poco afectó al desarrollo de la industria petrolera en nuestro país. En 1916 brotó el que en su tiempo fue considerado el pozo petrolero de mayor producción en el mundo, Cerro azul 4, situado a 237 kilómetros al sur de Tampico, Tamaulipas (IMP, 1985).

Se calcula en más de un millón y medio de metros cúbicos de gases los que salieron antes de que apareciera el petróleo. La altura del combustible que salió alcanzó 180 metros.

Para 1938, cuando el presidente Lázaro Cárdenas declaró la nacionalización de la industria petrolera, existían casi 400 compañías explotadoras y se habían perforado poco más de 200 pozos en el país. A partir de entonces, Petróleos Mexicanos (PEMEX) ha sido la empresa encargada de administrar todo lo relativo a los hidrocarburos en México. Esta

empresa paraestatal se ha constituido como la sexta petrolera en el mundo por su tamaño.

Los petróleos de mejor calidad son aquellos que se clasifican como "livianos" y/o "suaves" y "dulces". Los llamados "livianos" son aquellos que tienen más de 26 grados API. Los "intermedios" se sitúan entre 20° y 26° API, y los "pesados" por debajo de 20° API. El hallazgo y utilización del petróleo, la tecnología que soporta su proceso industrial y el desarrollo socioeconómico que se deriva de su explotación, son algunos de los temas que se presentan en este recorrido didáctico y educativo por el mundo del petróleo (IMP, 1985).

1.1 El petróleo

La palabra petróleo proviene del latín *petroleum* (*Petra*-piedra y *oleum*-aceite), que significa aceite de piedra (Pemex, 1988). El petróleo está compuesto fundamentalmente por una mezcla de hidrocarburos de distintos números de átomos de carbono. Las moléculas de estos hidrocarburos pueden ser cerradas formando anillos (compuestos aromáticos) o abiertas, con ramificaciones o no (compuestos alifáticos). La proporción de estos distintos compuestos varía según la región en la que se encuentre el petróleo haciendo que el mismo pueda cambiar en su color, desde negro hasta el verde amarillento y el rojizo. Del mismo modo varían sus propiedades físicas tales como densidad, viscosidad, índice de refracción, punto de ebullición, etc (Pemex, 1988).

Son miles los compuestos químicos que constituyen el petróleo, y entre muchas otras propiedades, estos compuestos se diferencian por su volatilidad. La composición elemental del petróleo normalmente está comprendida dentro de los siguientes intervalos en % peso: carbón 84-87%, hidrógeno: 11-14%, azufre: 0-2 %, nitrógeno: 0.2%.

El petróleo es una sustancia combustible negra y viscosa, líquida a temperatura y presión normales. Hay hidrocarburos con presencia de azufre, nitrógeno y oxígeno formando familias bien caracterizadas y un contenido menor de otros elementos (IMP. 1985).

Cada año se extraen cerca de un millón de toneladas de petróleo de yacimientos subterráneos, algunos de ellos en mar abierto. La mayor parte se utiliza como combustible en forma de gasolina, diesel, turbosina, etc., y algunas fracciones volátiles (metano, propano y butano) son nuestra principal fuente de energía, tanto industrial como

doméstica. El resto del petróleo, las fracciones más pesadas y menos valiosas llamados asfaltenos, se utilizan como pavimento (IMP. 1985).

1.2 Origen del petróleo

Existen varias teorías sobre los orígenes del petróleo que pueden ser clasificadas en dos: la de formación inorgánica y la de formación orgánica. La primera explica la formación del petróleo como resultados de reacciones geoquímicas entre el agua y el bióxido de carbono, además de otras sustancias inorgánicas como carburos y carbonatos metales.

Esta teoría fue de gran aceptación durante muchos años, pero a medida que se perfeccionaron las técnicas del análisis geológico y se acumuló información al respecto, se ha dado paso a teorías de formación orgánica que determinan que el petróleo es producto de la descomposición de organismos vegetales y animales que existieron en ciertos periodos del tiempo geológico y que fueron sometidos a enormes presiones y elevadas temperaturas (IMP. 1985).

1.3 Composición del petróleo

Químicamente, el petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos, es decir, de compuestos ricos en carbono e hidrógeno, aunque contiene otros elementos minoritarios como azufre, oxígeno y nitrógeno, así como trazas de metales. Es compleja porque dada la capacidad del átomo de carbono de formar cuatro enlaces con otros átomos de carbono, se pueden organizar como cadenas o como ciclos. Las cadenas se conocen como compuestos alifáticos, y consisten en sucesiones de átomos de carbono unidos entre sí por enlaces sencillos (alcanos), dobles (alquenos) o triples (alquinos) mientras que el resto de las valencias son ocupadas por hidrógenos. Los alcanos son la familia más numerosa en el petróleo crudo y se conocen como parafinas, pueden ser lineales o ramificados y su longitud varía de 1 a 40 carbonos, aunque se ha logrado detectar cadenas de 60 carbonos. Los alquenos son conocidos como olefinas y son una fuente valiosa de reactantes para la industria sintética. Los ciclos pueden ser saturados, donde varios carbonos se unen entre sí por medio de enlaces sencillos, ó pueden ser aromáticos, donde algunos carbonos del ciclo están unidos por enlaces dobles. Los ciclos saturados se conocen como ciclo-alcanos, ciclo-parafinas o naftenos y son un componente minoritario del petróleo crudo. Los compuestos aromáticos son derivados del benceno, un anillo de seis carbonos unidos por tres enlaces sencillos y tres enlaces

dobles alternados. Los anillos pueden encontrarse fusionados entre ellos o sustituidos con cadenas alifáticas. Los HAP's (polinúcleo-aromáticos) comprenden del 10 al 25 % del petróleo crudo y son las fracciones más pesada (Huesemann, 1994).

1.4 Tipos de hidrocarburos

1.4.1 Hidrocarburos saturados

Estos hidrocarburos son alcanos lineales y ramificados (parafinas) y cicloalcanos (naftalenos). Los primeros cuatro n-alcanos son gases (metano, etano, propano y butano), los 13 siguientes (C5-C17) son líquidos, y todos aquellos con 18 o más átomos de carbono en su molécula son sólidos. Son solubles en disolventes no polares como benceno, éter y cloroformo; insolubles en agua y en otros disolventes con alta polaridad y también actúan como disolventes de compuestos de baja polaridad (Botello, 1996).

1.4.2 Hidrocarburos aromáticos

Los hidrocarburos aromáticos son compuestos cíclicos mono, di y polinuclearomáticos, basados en anillos bencénicos fusionados en arreglos lineales, angulares o agrupados. Algunos hidrógenos pueden reemplazarse por grupos alquilos, tienen al menos seis átomos de hidrógeno por anillo. Todos los hidrocarburos aromáticos policíclicos están integrados por la unión de dos o más anillos aromáticos y/o por arreglo lineal pentacíclicos, angulares y en racimos, incluyen el naftaleno, antraceno, fenantreno, benzo(a)antraceno, criseno, acenafteno, fluoranteno, pireno y benzo(a)pireno (Leahy, 1990).

1.4.2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Estos hidrocarburos están constituidos por grupos de anillos aromáticos que contienen carbono e hidrógeno al menos están formados por dos o más anillos de benceno fusionados entre sí con al menos dos carbonos (Leahy, 1990).

1.4.3 Fracción polar

La fracción polar consta de compuestos que contienen nitrógeno(N), azufre(S) y oxígeno(O) adicionados al carbono y al hidrógeno en su estructura molecular, son clasificados en asfaltenos y resinas, dependiendo del método de separación. Los asfaltenos son compuestos presentes en el petróleo crudo, poseen peso molecular

grande (1,000-10,000), tienen de 10 a 20 anillos, poseen cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos y nafténicos, por ejemplo: ácidos nafténicos, sulfidas, fenoles, ácidos grasos y metaloporfirinas. Las resinas son agregados con una gran cantidad de estructuras policíclicas de alto peso molecular, tales como piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y aminas (Leahy,1990).

1.5 Características químicas y físicas del petróleo

México produce tres tipos de crudo: el Maya-22 pesado, que constituye casi la mitad del total de la producción; el Istmo-34, ligero, bajo en azufre, que representa casi un tercio del total de la producción; y el Olmeca-39, extra ligero, aproximadamente la quinta parte del total de la producción.

Estos son los principales crudos producidos y comercializados por nuestro país en el mercado internacional, ver cuadro 1, aunque en realidad se extraen del subsuelo aproximadamente 17 tipos, por tanto, la producción de los 14 remanentes es pequeña comparada con los anteriores (IMP, 1985).

Cuadro 1. Comparación de propiedades de los tres diferentes tipos de hidrocarburos en México (Olmeca, Istmo y Maya). (PEMEX, Exploración y Producción, 1988).

PROPIEDADES	OLMECA	ISTMO	MAYA
Peso específico a 20/4 °C	0.8261	0.8535	0.9199
Grado API	39.16	33.74	21.85
Viscosidad SSU			
15.6 °C	43.3	65.6	2156
21.1 °C	40.3	57.8	1054
25.0 °C	39	54.5	696
Factor de caracterización K	12	11.85	11.63
Azufre total, % peso	0.81	1.45	3.7
Carbón Ramsbottom, % peso	1.62	3.92	10.57
Cenizas, % peso	0.006	0.007	0.074
Insolubles en nC5, % peso	1	3	15.3
Insolubles en nC7, % peso	1	2.09	11.2
Aceites, % peso	89.2	89.2	72
Parafinas, % peso	13.4	8.1	3.6
Aceite desparafinado, % peso	75.8	81.1	68.4
Resinas, % peso	10.8	7.8	12.7

1.6 Rutas metabólicas de la degradación del petróleo

La degradación de moléculas orgánicas es el proceso de descomposición de la materia por medios físicos, químicos o biológicos. Los microorganismos del suelo intervienen en la descomposición biológica, en la oxidación de la estructura molecular de los componentes orgánicos, transformándolos a metabólicos intermedios o en el mejor de los casos se mineralizan a dióxido de carbono y agua y compuestos inorgánicos, los cuales se incorporan a la estructura de los microorganismos (LaGrega, 1997).

Algunos microorganismos pueden oxidar hidrocarburos y utilizarlos como fuente de energía. La capacidad de crecer sobre los hidrocarburos la ostentan representantes de muchos de los grupos principales de microbios, entre ellos bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Además, los hidrocarburos utilizados son muy variados, aunque no se posee una detallada información sobre las reacciones que intervienen en el proceso de su oxidación más que para los hidrocarburos alifáticos más sencillos y para el alcanfor, hidrocarburo alicíclico. La oxidación de los n-alcenos se realiza de ordinario por la oxidación de un grupo terminal metilo para formar el correspondiente alcohol primario. Este producto se oxida a ácido orgánico, el cual, a su vez, se oxida en el ciclo de la β -oxidación lo cual conduce a la formación de ATP a partir de la oxidación de la acetyl-CoA, (Madigan *et al.*, 2003). Ver figura 1.

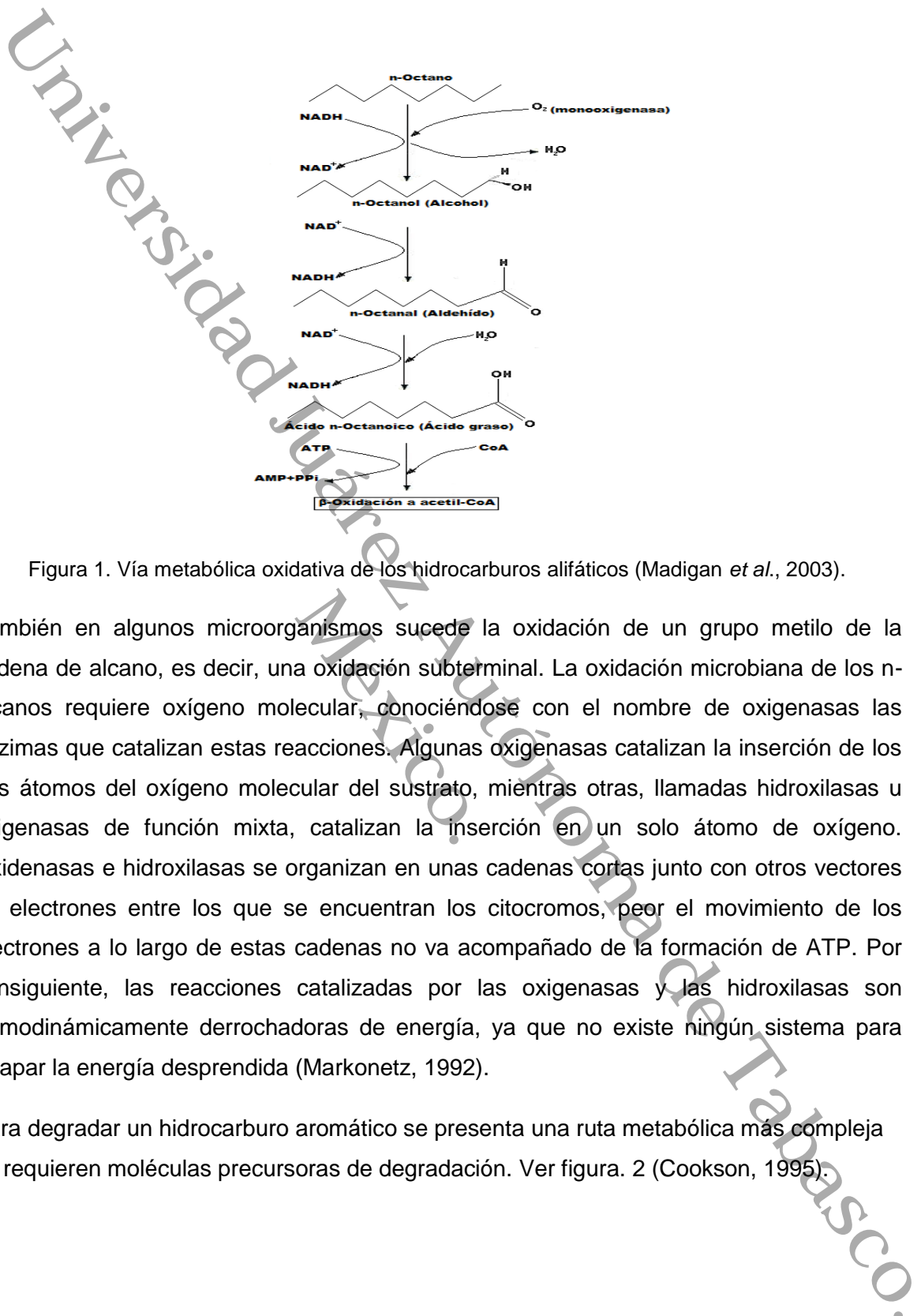


Figura 1. Vía metabólica oxidativa de los hidrocarburos alifáticos (Madigan *et al.*, 2003).

También en algunos microorganismos sucede la oxidación de un grupo metilo de la cadena de alcano, es decir, una oxidación subterminal. La oxidación microbiana de los n-alcános requiere oxígeno molecular, conociéndose con el nombre de oxigenasas las enzimas que catalizan estas reacciones. Algunas oxigenasas catalizan la inserción de los dos átomos del oxígeno molecular del sustrato, mientras otras, llamadas hidroxilasas u oxigenasas de función mixta, catalizan la inserción en un solo átomo de oxígeno. Oxidasas e hidroxilasas se organizan en unas cadenas cortas junto con otros vectores de electrones entre los que se encuentran los citocromos, pero el movimiento de los electrones a lo largo de estas cadenas no va acompañado de la formación de ATP. Por consiguiente, las reacciones catalizadas por las oxigenasas y las hidroxilasas son termodinámicamente derrochadoras de energía, ya que no existe ningún sistema para atrapar la energía desprendida (Markonetz, 1992).

Para degradar un hidrocarburo aromático se presenta una ruta metabólica más compleja se requieren moléculas precursoras de degradación. Ver figura. 2 (Cookson, 1995).

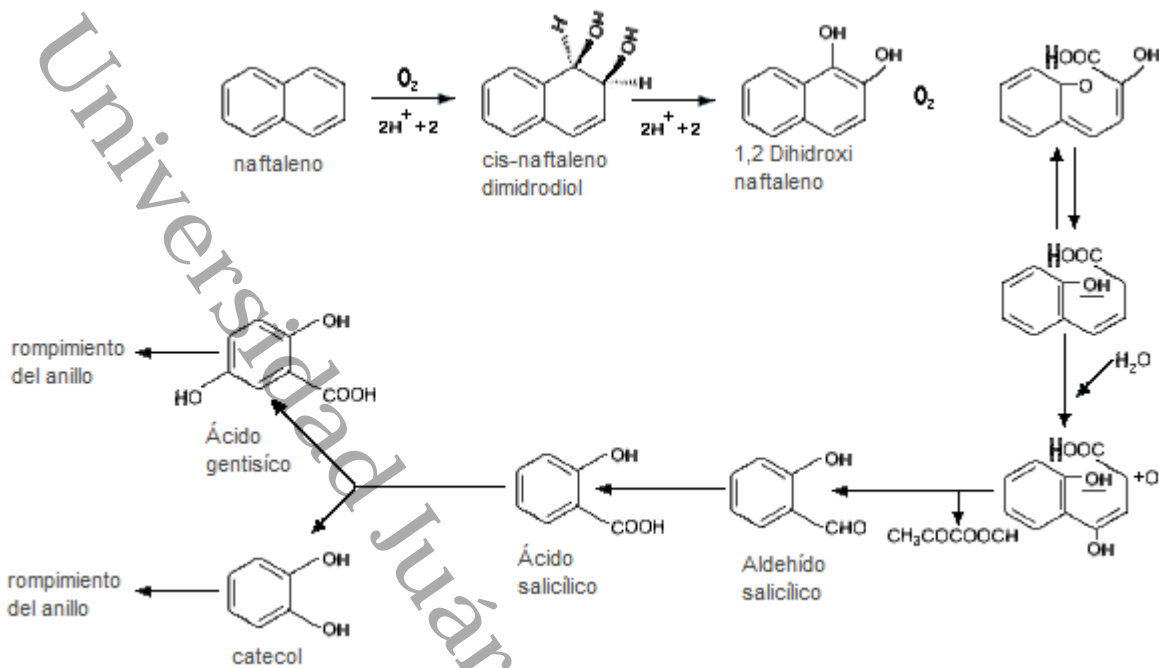


Figura 2. Vía propuesta para la degradación bacteriana del naftaleno (Cookson, 1995).

1.7 Fuentes de contaminación por hidrocarburos.

Las fuentes de contaminación más comunes que impactan grandemente al medio ambiente son:

a) *Lodos de perforación de tipo inverso y recorte.* Estos desechos incluyen recortes contaminados, este material se deposita en presas. La política de la industria petrolera es de confinar estos desechos en presas hechas con materiales más impermeables y la mayoría de ellas no tienen techo para prevenir desbordes. Periódicamente los desechos son recolectados para tratamiento. (Vinalay, 1998).

b) *Tiraderos de desechos semisólidos.* Se han usado presas de pozos petroleros para confinamiento debido a la generación de grandes cantidades de desechos aceitosos (lodos de perforación, vegetación pantanosa y suelos contaminados por derrames, y lodos de sistemas para el tratamiento de agua residual en petroquímicas y refinerías), los distritos petroleros usan la presa principal de desechos de un pozo petrolero que nunca produjo petróleo, o un pozo antiguo que no produce y que está tapado.

c) *Por derrames de tuberías corroídas.* Este tipo de contaminación se da principalmente por tuberías corroídas en campos petroleros con muchos años de antigüedad.

Cuando se instalaron los ductos conectados a los pozos individuales y a las baterías de separación, y posteriormente a las petroquímicas y refinerías, no se apreciaba la corrosión anaerobia debida principalmente a baterías reductoras de sulfato, resultando que muchos ductos se dañaran derramando los hidrocarburos (Atlas *et al.*, 2002).

1.8 Impacto ambiental en el estado de Tabasco

En el estado de Tabasco se producen cerca de 48.7 mil barriles por día de petróleo crudo. Nuestro estado es el segundo productor de hidrocarburos a nivel nacional, cuenta con dos unidades Petroquímicas, 28 instalaciones de almacenamiento y bombeo y las actividades petroleras tienen presencia en doce municipios del estado. Tabasco cuenta con 1000 pozos petroleros distribuidos en 10 campos (Zavala *et al.*, 1996).

Beltrán, 1997: Reporta que hay aproximadamente 7,200 hectáreas (ha) afectadas; de ellas más del 90% está en pantanos o zonas inundables. PEMEX con apoyo del (Instituto Mexicano del Petróleo) IMP, ha identificado aproximadamente 300 ha contaminadas en el estado y 178 presas contaminadas con desechos aceitosos que están proyectadas para restauración (Lajous, 1997).

1.9 El suelo

El suelo es un recurso natural definido generalmente como la capa superior de la corteza terrestre, está formado por partículas de minerales, materia orgánica, agua y aire; allí nacen y se desarrollan miles de seres vivos, desde microorganismos hasta plantas y animales superiores (COM, 2002). Los suelos se clasifican en distintos tipos de acuerdo al porcentaje de cada uno de los componentes mencionados y están constituidos en capas, llamadas horizontes, los cuales difieren en una o más características uno del otro. En la Figura 3, se muestran los cinco tipos de horizontes más comunes (Castro, 2004).

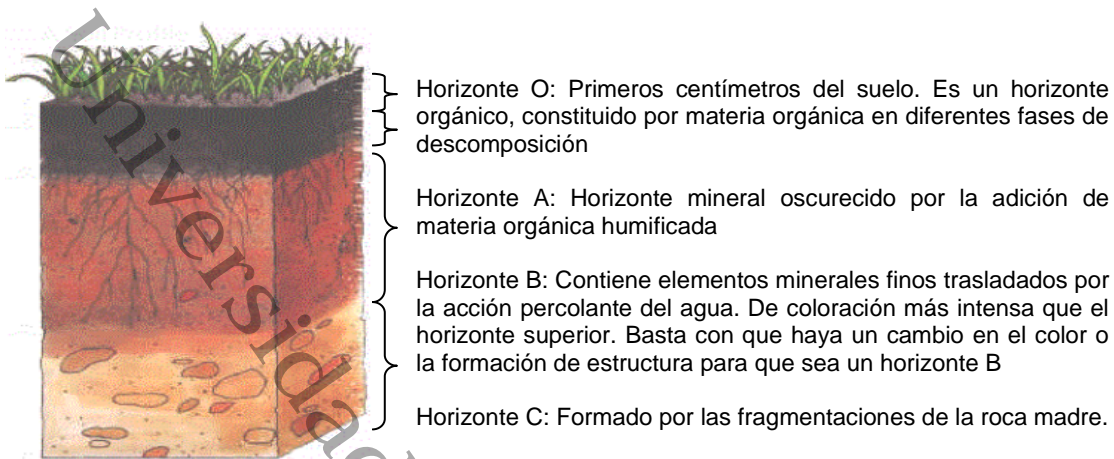


Figura 3: Horizontes del Suelo. (NRCS, USDA)

1.9.1 Tipos de suelos en Tabasco y sus variaciones

La clasificación taxonómica de los suelos orgánicos predominantes del estado de Tabasco es la siguiente: *Acrisol*, *Arenosol*, *Fluvisol*, *Gleysol*, *Histosol*, *Leptosol*, *Luvisol* y *Vertisol*. (Palma, et al., 2002). Ver figura 4.

Acrisoles: Son suelos muy intemperizados, lixiviados y ácidos de Tabasco. En general presentan características que lo identifican fácilmente, como son: los colores oscuros sobre amarillentos a rojizos fuerte acidez sobre todo en el horizonte B, la presencia de un horizonte B de acumulación aluvial de arcilla, altas cantidades de hierro y aluminio en forma de sesquióxidos, alta fijación de fósforo y propensión a la erosión debido a situarse en lomeríos con pendientes variables.

Arenosoles: Suelo de textura más gruesa que franco arenosa hasta una profundidad de al menos 100 cm da la superficie, excluyendo materiales que muestran propiedades flúvicas o ándicas; no tienen otros horizontes de diagnóstico que un A ócrico o un E álbico.

Fluvisoles Eútricos: suelos que presentan propiedades flúvicas, es decir, que se derivan de sedimentos fluviales, lacustre o marinos y que reciben materiales nuevos a intervalos regulares. Tienen una saturación de bases igual o mayor al 50%, al menos entre los 20 y 50 cm de profundidad, además no tienen horizontes sulfúricos, ni materiales sulfídicos dentro de los 125 cm de profundidad, tampoco presentan propiedades sálicas. Los

fluvisoles eútricos son suelos con buena permeabilidad , profundos, textura medias o medias sobre gruesas, de poco desarrollo (presentan únicamente horizontes A y C diferenciados por el grosor del sedimento aluvial) suficientemente ricos en nutrimentos y materia orgánica, con buena agregación, muy buena actividad biológica y buen drenaje superficial, por ello se consideran como los mejores suelos del estado . Estos suelos presentan el uso agrícola más extenso en el estado, encontrándose cultivos como cacao, plátano, hortalizas, cítricos, mango, caña de azúcar, maíz, frijol, arroz y frutales en general. El uso de pastos de buena calidad nutritiva es también un manejo muy extendido para estos suelos. La vegetación natural es de selva alta perennifolia, aunque actualmente existe en localidades muy reducidas.

Gleysoles Eútricos: Suelos formados sobre materiales no consolidados (excluyendo materiales de textura gruesas y depósitos aluviales que tengan propiedades flúvicas), que presentan propiedades gléyicas (saturación con agua durante ciertos periodos del año o todo el año). Tienen una saturación de bases igual o superior al 50%, al menos entre los 20 y 50 cm de profundidad. Se distribuyen principalmente en los bajos de las regiones de los Ríos y la Sierra, en zonas cercanas a los cauces de los ríos y arroyos.

Histosoles: Estos suelos tienen como característica principal una fuerte acumulación de materia orgánica en diferentes estados de descomposición. Geográficamente se localizan en la parte norte del municipio de Huimanguillo y noroeste de Cárdenas. Son suelos extremadamente ricos en material orgánico también poseen nutrimentos en cantidades elevadas, sin embargo, su uso agropecuario se ve restringido por los problemas de inundación y/o anegamiento que presentan. Sobre este tipo de suelos se encuentra también una gran cantidad de pozos petroleros.

Leptosoles: Son suelos que están limitados en la profundidad por una roca dura y continua o un material muy calcáreo (contienen un equivalente de carbonato de calcio superiores a 40 %). Se ubican en geoforma de cerros con pendientes superiores al 100%. No es apto para uso agrícola, ni pecuario y la vegetación predominantemente es selva alta perennifolia.

Luvisoles Gléyicos: Son suelos imperfectamente drenados, lo que provoca gleyzacion en el horizonte B; el manto freático se encuentra muy cerca de la superficie en la época de

lluvias, en la época de seca el manto freático no se detecta. Esta alternancia de humedad se manifiesta por la presencia de fenómenos de oxido-reducción, evidenciado por los colores grises y rojizos. El pH de estos suelos de moderado a fuertemente ácido con la profundidad. La materia orgánica y los nutrientes son de moderados a pobres, el fósforo asimilable es muy pobre debido a su fijación por el hierro y aluminio.

Vertisoles Eútricos: Se caracterizan por ser suelos arcillosos (que localmente reciben el nombre de “barriles” o “atascaderos”) con agrietamiento en la época de secas y colores oscuros en todo el perfil, tienen un porcentaje de saturación de bases (PSB¹) determinada por acetato de amonio, de 50% o más, al menos entre 20 y 50 cm de profundidad; no presentan horizontes calcálicos. Son suelos ricos en nutrientes pero con deficiencia en drenaje debido a la textura pesada del perfil. Estos suelos son representativos de la planicie ya que ocupan aproximadamente el 60 % de la superficie total del estado. Su uso es agrícola constituido por arroz, frijol, maíz y frutales. La vegetación natural es selva alta perennifolia, actualmente casi extinguida, el manejo de pastos mejorados es algo común en estos suelos (Palma, 2007).

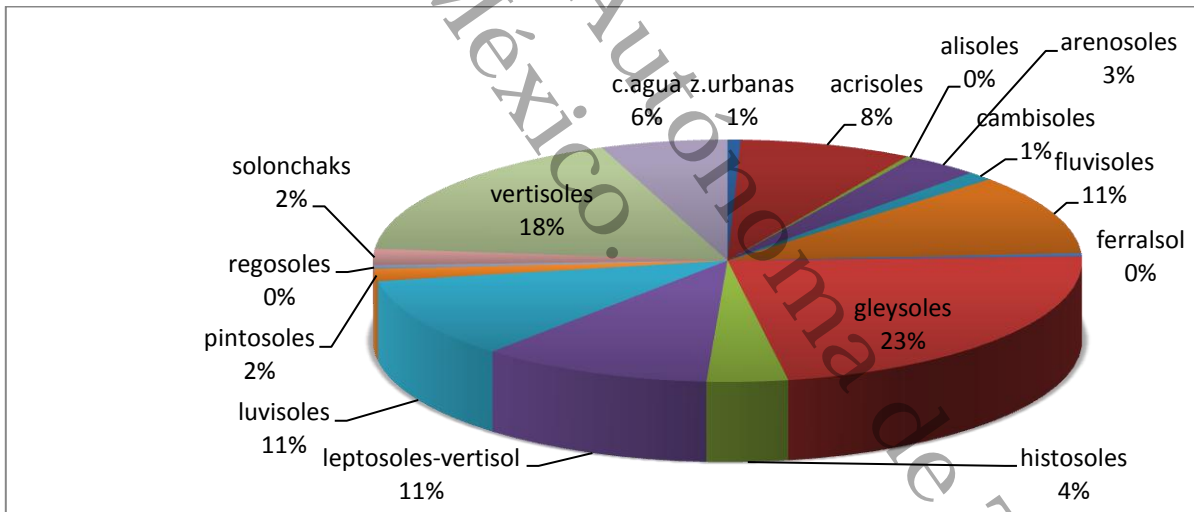


Figura 4. Superficie aproximada de los grupos mayores de los suelos en Tabasco (Palma et al., 2007).

1.10 La biorremediación como técnica de restauración de suelos

La Biorremediación consiste en una variedad de sistemas que utilizan organismos vivos (plantas, hongos, bacterias, entre otros), para remover (extraer), degradar (biodegradar) o transformar (biotransformar) compuestos orgánicos tóxicos en productos metabólicos menos tóxicos o inocuos (Van Deuren et al., 1997). Los procesos biológicos que

involucran enzimas como catalizadores pueden modificar moléculas orgánicas produciendo cambios en su estructura así como en sus propiedades toxicológicas, alcanzando así la meta final de la biorremediación, que es la mineralización del contaminante, es decir, la completa degradación de una molécula orgánica hasta compuestos inorgánicos como dióxido de carbono (CO₂), agua y formas inorgánicas de nitrógeno, fósforo y azufre además de componentes celulares (Eweis et al., 1998).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria o transportadora de electrones de las células, se van a producir una serie de reacciones de óxido-reducción cuyo fin es la obtención de energía, como se puede apreciar en la figura 5, la cadena la inicia un sustrato orgánico externo a la célula, que actúa como dador de electrones, por lo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia (Maroto *et al.*, 2004).

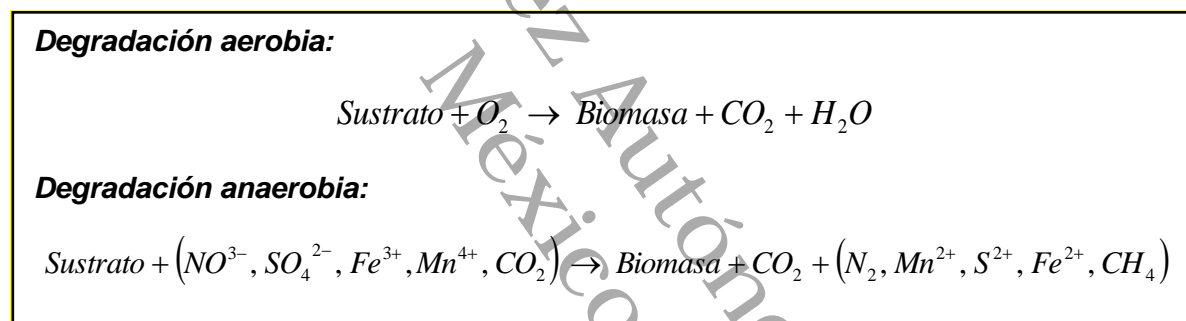


Figura. 5. Esquema de la reacción.

La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio (autóctonos) o ajenos a este (exógenos), y llevarse a cabo en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno). Al igual que otras tecnologías de remediación, ésta puede realizarse en el mismo sitio sin necesidad de excavar el material contaminado (*in situ*), o bien excavándolo para tratarlo en el sitio (*on site*) o fuera de él (*ex situ*). Aunque no todos los compuestos orgánicos son susceptibles a la biodegradación, los procesos de biodegradación se han usado con éxito para tratar suelos, lodos y sedimentos contaminados por hidrocarburos derivados del petróleo, solventes, explosivos, clorofenoles, pesticidas y HAP. Su aceptación como una estrategia de limpieza viable, en muchos casos, depende de sus costos. Sin embargo, muchas de las estrategias de

biorremediación son competitivas en términos de costos y del impacto sobre la matriz contaminada (Semple *et al.*, 2001).

1.11 Las tecnologías de Biorremediación

El uso de tecnologías de biorremediación para el tratamiento de sitios contaminados, es relativamente reciente y presenta algunas ventajas tales como: bajos costos de instalación y operación, es una tecnología simple y de fácil aplicación, es un tratamiento tecnológicamente efectivo, respecto de los métodos físico-químicos tradicionales (Eweis *et al.*, 1998).

De acuerdo con estudios realizados en los Estados Unidos de América y el Reino Unido, el mercado de la biorremediación para el tratamiento de suelos contaminados se ha incrementado debido a que los costos pueden reducirse entre 65 % y 80 %, respecto de los métodos físico-químicos (Zechendorf, 1999). A las tecnologías de biorremediación podemos clasificarlas según el lugar en que se realiza el proceso de remediación y el tipo de tratamiento, teniendo así Tecnología *in situ* y *ex situ*.

1.11.1 Tecnologías *in situ*

Las técnicas *in situ* buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes. Este objetivo generalmente puede lograrse con el suministro de aire u oxígeno (bioventeo), nutrientes (bioestimulación), microorganismos (bioaumentación) y/o humedad, además del control de temperatura y pH (U.S. EPA., 2001).

a) Bioventeo

Consiste en estimular la biodegradación aerobia de un contaminante por medio del suministro de aire en el sitio contaminado (Van Deuren *et al.*, 1997).

b) Bioestimulación

Implica la adición de oxígeno y/o nutrientes al suelo contaminado con el fin de estimular la actividad de los microorganismos autóctonos y con ello la biodegradación de los contaminantes (Van Deuren *et al.*, 1997).

c) Bioaumentación

Consiste en la adición de microorganismos vivos que tienen la capacidad de degradar el contaminante en cuestión y así promover su biodegradación o biotransformación (Riser, 1998).

1.11.2 Tecnologías *ex situ*

Los procesos de biorremediación *ex situ*, incluyen: (I) procesos de biodegradación en fase de lodos, en donde el suelo se mezcla con agua (para formar un lodo), microorganismos y nutrientes; y (II) de biodegradación en fase sólida, en donde los suelos se colocan en una celda de tratamiento (composteo) o sobre membranas impermeables (biolabranza), en donde se agrega agua y nutrientes (U.S. EPA., 2001).

a) Biolabranza

El suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, se remueve (labra) periódicamente para favorecer su aireación. Durante la biolabranza, el suelo contaminado se mezcla con suelo limpio (Van Deuren, 1997).

b) Fitorremediación

Es un proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos sedimentados. (Van Deuren, 1997).

c) Biorreactores

Es la tecnología más adecuada para casos en que los peligros potenciales de descargas y emisiones sean necesarios. Permite la combinación controlada y eficiente de procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoran y aceleran la biodegradación (Riser, 1998).

d) Composteo

Es un proceso biooxidativo de transformaciones microbianas en condiciones controladas cuando en el proceso participan lombrices se llama vermicomposteo

en ambos casos ocurren actividades fisicoquímicas y biológicas que producen cambios en el material orgánico en un tiempo determinado.

e) Biorremediación

La biorremediación emplea el uso de los microorganismos que se encuentran naturalmente en el suelo. Los microorganismos deben de estar vivos, y en buen estado de salud para efectos de una conveniente biodegradación. En este aspecto la biorremediación en “land farm” se asemeja al cultivo de plantas. Ambos son organismos vivos, esto es importante entender para hacer la relación entre el ambiente en el suelo y los microbios en disposición para optimizar el proceso de biorremediación. (Van Deuren, 1997).



Figura. 6. Biorestauración *ex situ* de agua y suelo

Ventajas y desventajas de la biorremediación

Una ventaja importante de la biorremediación es su bajo costo en relación con otros tratamientos. Es difícil hacer una comparación de costos, porque es necesario conocer las características de cada sitio en particular, pero en términos generales se puede decir que la biorremediación es por lo menos diez veces más económica que la incineración y tres veces más económica que algunas tecnologías fisicoquímicas de inmovilización. Este bajo costo se debe a varios factores, como un menor gasto de energía, bajo costo de los nutrientes y la operación bajo condiciones ambientales, que hace que su uso sea muy atractivo para los países en vías de desarrollo como el nuestro. La biorremediación es una tecnología limpia, ya que los contaminantes pueden ser transformados hasta compuestos inocuos como el bióxido de carbono. Además de que cuando los nutrientes se agotan,

incluyendo los contaminantes empleados como fuente de carbono, los microorganismos mueren. (Van Deuren, 1997).

La versatilidad de la biorremediación se basa en que puede adaptarse a las necesidades de cada sitio. Así, puede aplicarse bioestimulación si únicamente se requiere la adición de nutrientes para la actividad metabólica de la flora degradadora autóctona; bioincremento, cuando la proporción de la flora degradadora autóctona es muy reducida y se hace necesaria la adición de microorganismos degradadores exógenos; o bien, bioventeo cuando es imprescindible el suministro de aire para estimular la actividad microbiana degradadora presente en el lugar. En cualquiera de las opciones anteriores, puede realizarse fuera del sitio si la contaminación está en el suelo superficial pero necesariamente in situ cuando los contaminantes han alcanzado el manto freático. Cuando el tratamiento se hace fuera del sitio, pueden utilizarse bioceldas o biopilas sobre superficies impermeables que permitan la colección de lixiviados, de manera que no se contamine el espacio limpio. Además, después de la biorremediación el suelo se puede destinar al cultivo de especies vegetales para reincorporarlo a sus funciones biológicas más conocidas. (Van Deuren, 1997).

En el caso de aguas subterráneas, la biorremediación se aplica a través del bombeo-tratamiento-recarga que consiste en extraer el agua subterránea, promover la biodegradación de los contaminantes en reactores instalados en la superficie y posteriormente devolverla al acuífero, o bien, inyectar nutrientes y bacterias, de tal forma que se establece una recirculación y el sitio mismo se convierte en un bioreactor.

A pesar de ser la tecnología más empleada a nivel mundial, existen ciertos aspectos que determinan el éxito de su aplicación por ejemplo: los contaminantes pueden estar fuertemente adsorbidos al material geológico, o bien, estar presentes en zonas de baja permeabilidad, lo que ocasiona limitaciones en la transferencia de masa.

Por otro lado, la biorremediación no puede aplicarse en campo cuando: Se tienen compuestos radioactivos, ya que los compuestos orgánicos contaminantes son altamente halogenados, y existen metales pesados en concentraciones tales, que inhiben la actividad microbiana y las condiciones microambientales son desfavorables. Debido a que cada microorganismo tiene sus propias características, la tolerancia que presentan a cada situación es muy particular. Puede ocurrir que cuando las concentraciones de los

contaminantes orgánicos son muy altas, se observan fenómenos de inhibición de la actividad microbiana. (Van Deuren, 1997).

1.12 Las tecnologías de biorremediación en México

En el mercado ambiental de nuestro país existe actualmente una cantidad considerable de empresas nacionales e internacionales que ofrecen diferentes tipos de tecnologías para la remediación de sitios contaminados. Asimismo, con el propósito de establecer un control a cerca de las tecnologías que se ofrecen y conocer sus posibilidades reales de éxito, se inició en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México el 18 de Agosto de 1997 la aplicación obligatoria de la Licencia Ambiental Única (LAU) para todas aquellas empresas que realizan trabajos de remediación de suelos. Ello de conformidad con el acuerdo sectorial publicado por el Diario Oficial de la Federación (DOF) del 11 de Abril de 1997. Posteriormente, se publicó el acuerdo delegatorio respectivo en el DOF del 3 de Diciembre de 1998, y a partir del 4 de Enero de 1999 la LAU es emitida por las delegaciones federales de la SEMARNAT en los estados de Aguascalientes, Baja California, Coahuila, Chihuahua, México, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Nuevo León, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz. Para el resto de los estados, el trámite de la licencia está centralizado.

Todas las tecnologías que ofrecen las empresas que cuentan con permisos para remediar suelos contaminados están enfocadas exclusivamente a la remediación de sitios contaminados por compuestos orgánicos biodegradables y que no sean persistentes o halogenados. Dentro de los contaminantes tratados con mayor frecuencia se encuentran los HTP y los HAP's, lodos aceitosos, lodos de perforación y recortes de perforación. De un total de 57 empresas autorizadas ninguna ofrece servicios para la restauración de suelos contaminados por metales (SEMARNAT, 2002).

De acuerdo con datos proporcionados por 40 empresas autorizadas para remediar suelos contaminados por diferentes tipos de contaminantes, dentro de las tecnologías mas comúnmente empleadas se encuentran las biológicas, como se observa en la figura 7, la biorremediación es la más empleada, con 48 %, siendo las más utilizadas el composteo y la biolabranza. El lavado de suelos, la oxidación química y la separación física constituyen otra parte importante de las tecnologías más empleadas en México.

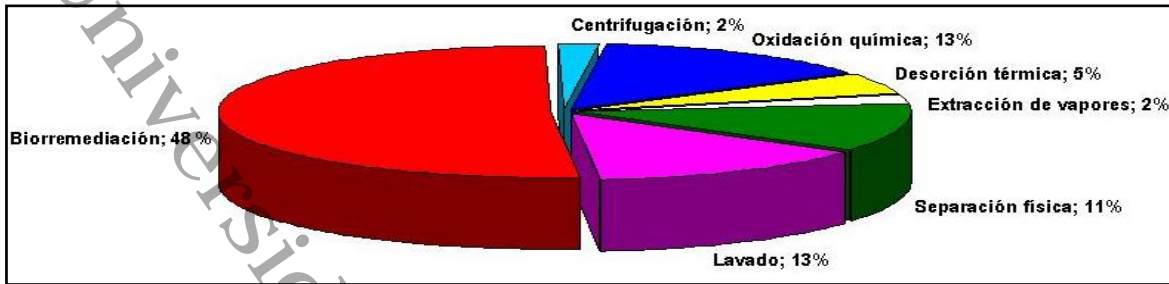


Figura 7. Tecnologías de remediación para suelos utilizadas en México

A pesar de que existe información acerca de las tecnologías de biorremediación que se emplean en México, se aprecian ciertas deficiencias en el manejo y conocimientos de estos procesos por algunas de las empresas dedicadas a esta actividad. Este hecho se debe, en parte, a que muchas de ellas no cuentan con profesionales en microbiología y/o biotecnología, debido a que su principal actividad para realizar los trabajos de biorremediación consiste en importar formulaciones (concentrados bacterianos o enzimáticos, agentes tensoactivos y mezclas de nutrientes, entre otros) para venderlas en México. Muchos de estos productos, además, carecen de información acerca del contenido y su eficiencia no se ha demostrado por las condiciones climáticas de nuestro país (Saval, 1998).

Algunas de las empresas venden el servicio de biorremediación completo, en el que se incluye la excavación del suelo contaminado, el suministro de productos y su aplicación. En estos casos, los contratistas siguen las instrucciones del fabricante para la aplicación de los productos, sin entender las bondades y limitaciones de estos procesos a los que llaman "tecnología". Afortunadamente, no todo el panorama es negativo, ya que también existen empresas responsables que cuentan con personal calificado y capacitado para realizar trabajos de biorremediación (Saval, 1998).

1.13 Factores ambientales que afectan la biodegradación

a) *Temperatura*: Toda criatura viviente tiene temperaturas en las cuales operan óptimamente y un rango sobre el cual pueden funcionar bien. Las bacterias son usualmente clasificadas dentro de las *psicrófilas* (amantes del frío), *mesófilas* (amantes de las temperaturas medias) y *termófilas* (amantes de altas temperaturas). Los microbios

de los cuales depende en su mayoría el proyecto de biorremediación del sitio de interés son las mesófilas. Estas bacterias son generalmente capaces de trabajar entre un rango de temperatura alrededor de 7 a 32 °C, pero se desempeñan mejor en un rango de temperatura de alrededor de 15 a 30°C. Su actividad mínima puede ser encontrada cerca de los 7°C o arriba de los 35°C. Por esta razón no se operan las celdas de tratamiento cuando el promedio de temperaturas se decrementa por debajo de su mínimo permisible. Cuando se excede el máximo de temperatura como en días muy calurosos, ocurre sobre la superficie de la celda la minimización de humedad y esto entorpecería el mezclado. Para evitar esta situación se agrega un poco más de agua a la celda durante estos días (Dragun, 1998).

b) pH (acidez y alcalinidad): Las bacterias tienen rangos de pH en las cuales ellas tienen un buen funcionamiento. Este rango es cerca de 6.0-8.0 para la mayoría de ellas pero frecuentemente se encuentran algunas que trabajan un poco arriba de su rango estándar, alrededor de un pH de 8.5 y también por debajo de este en un pH de 4.5 La mayoría de los suelos son buenos amortiguadores y están dentro de estos rangos, sobre todo los que contienen altas cantidades de materia orgánica y los de tipo arcilloso. Durante el programa de monitoreo en campo, los suelos serán muestreados por su pH. Si se descubre que este es extremo (muy ácido o muy básico), al suelo se le agregan agentes para nivelar su pH y corregirlo. (Leahy, 1990).

c) Humedad: Tales como las plantas, las bacterias son esencialmente organismos que viven en presencia de agua, en el ambiente de los suelos las bacterias serán encontradas en suelos con alto contenido de humedad. Si los suelos llegan a secarse, habrá una masiva mortandad y una correspondiente disminución del funcionamiento del tratamiento. Por esta razón, los suelos en tratamientos son frecuentemente humedecidos, la acumulación de agua en el suelo no puede ser menor que el 50% de su capacidad de campo (capacidad que tienen los suelos para mantener la humedad) (Trinidad, et al., 2002).

d) Oxígeno: La mayoría de las bacterias en el suelo, como otras criaturas vivientes, requieren de oxígeno para sobrevivir. La adición de demasiada agua al suelo podría reducir el contenido de oxígeno en el suelo. Por lo anterior el agua no debe de exceder el 50% de su capacidad de campo. Frecuentemente manteniendo un contenido de humedad apropiado se tiene un buen control de la cantidad de oxígeno disuelto. Si la comunidad

de bacterias es muy alta, ellas podrían agotar el oxígeno del suelo cuando se encharca. Este mecanismo llevaría a una deficiencia de este sí en poco días esto no es corregido. El mantenimiento de una celda de biorremediación bien oxigenada es mediante un mezclado realizado con maquinaria adecuada (Trinidade, *et al.*, 2002).

e) *Nutrientes*: Toda criatura necesita nutrientes esenciales, tales como carbón, nitrógeno, fósforo, potasio, etc., para sobrevivir. El hidrocarburo en el suelo contaminado provee el carbón para los microorganismos. Aunque esto puede ser suplementado con nutrientes inorgánicos, principalmente nitrógeno, que provee la propiedad de balance para el metabolismo de los microbios. Sí el contenido de nutrientes llega a ser limitado o exagerado, el funcionamiento de la biorremediación declinaría. Por esta razón la concentración de los nutrientes serán monitoreados el tiempo que dure la investigación y ajustados si es necesario.

f) *Microorganismos*: La biorremediación requiere de la presencia de bacterias que degraden el petróleo. Muchos suelos que han sido expuestos a hidrocarburos del petróleo por largos periodos de tiempo, contienen tales bacterias, solo se necesita estimularlas para efectos del tratamiento. Los suelos contenidos en la celda pueden presentar tales microorganismos. Para asegurar que están presentes en buena medida, se toman muestras periódicamente y se analizan para determinar su actividad microbiana. Esto demostraría si existe la presencia de muchos o pocas bacterias e indicaría su actividad. Según la cantidad y actividad de microbios encontrados los suelos pueden ser suplementados por inoculación comercial.

g) *Tipos de contaminantes*: Hay diferentes tipos de compuestos en el petróleo crudo, algunos son más o menos manejables para la biorremediación. En general, la composición molecular en especial la de los n-alcanos, gasolina, diesel, combustible para aviación así como petróleo crudo ligero son fáciles de degradar. Pero las moléculas más complejas, tales como los alcanos ramificados (los cuales pueden ser encontrados en algunos fluidos hidráulicas) e hidrocarburos poliaromáticos polinucleares (HPAs, como los que se encuentran en muchos de los aceites pesados o hidrocarburos intemperizados) son más difíciles de degradar, especialmente en suelos (Fernández, 2002).

1.14 Descripción general de las sustancias húmicas.

Antes de entrar a consideraciones profundas sobre el significado de las sustancias húmicas y el papel que juegan en el ambiente, se debe definir y acotar en lo posible que es la materia orgánica del suelo, de acuerdo con Stevenson (1994) la materia orgánica del suelo (MOS) está conformada por la totalidad de las sustancias de tipo orgánico presentes en los suelos, incluyendo los restos de tejidos vegetales y animales inalterados, sus productos de descomposición parcial, que algunos autores (Drozd *et al.*, 1996) excluyen de la totalidad de la materia orgánica, la fracción orgánica soluble en agua y la materia orgánica estabilizada: el humus. Sobre esta última fracción se centrará el interés de este trabajo. Así, este término incluye:

- A. Materiales orgánicos identificables, de peso molecular elevado tales como polisacáridos y proteínas,
- B. sustancias más simples tales como azúcares, aminoácidos, y otras moléculas mas pequeñas,
- C. sustancias húmicas.

La distribución MOS se muestra en la siguiente figura:

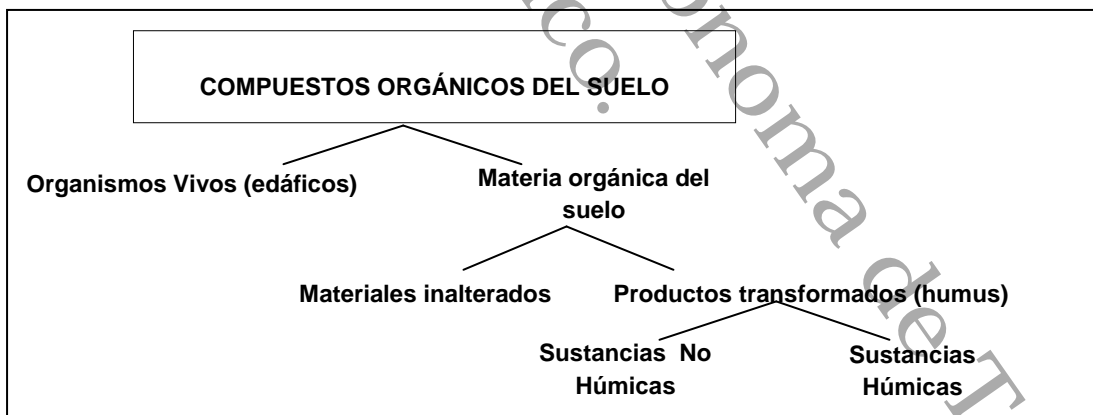


Figura 8. Los componentes de la materia orgánica del suelo. Drozd *et al.*, (1996)

El término humus se utilizó en la antigüedad para hacer referencia a la totalidad del suelo. Posteriormente se ha empleado como sinónimo de materia orgánica, mientras que en la actualidad es la fracción de dicha materia orgánica que engloba a un grupo de sustancias

difícilmente clasificables, de color oscuro, muy resistentes al ataque microbiano, de alto peso molecular, de naturaleza coloidal y propiedades ácidas (Stevenson, 1994).

Las sustancias húmicas, que se encuentran en el medio natural, en suelos, sedimentos y aguas (MacCarthy *et al.*, 1990) son residuos de la descomposición de plantas y animales, unidos a los productos sintetizados por los microorganismos del suelo y ciertos intermedios de dicha síntesis (Ayuso, 1995). Esta descomposición no es estable sino que presenta gran dinamismo, por lo que más que ante un grupo de sustancias estamos ante un estado de la materia orgánica diferente, según las condiciones de su formación. Entre 60 % y un 90 % de la materia orgánica del suelo está constituida por estos materiales de naturaleza lignoproteica (Gallardo, 1980).

Pero las sustancias húmicas (SH) en el suelo se encuentran asociadas principalmente mediante uniones de carácter débil (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, etc.) y en algunos casos mediante uniones de tipo covalente, a otra fracción orgánica constituida por productos de composición química definida y de alto peso molecular: polisacáridos y proteínas, sustancias simples como azúcares y aminoácidos y otras pequeñas moléculas. Todo este heterogéneo grupo de materiales se engloba bajo el término de sustancias no húmicas. En conclusión, el humus está formado por sustancias húmicas y no húmicas, aunque los términos son empleados como sinónimos por algunos autores (Stevenson, 1994).

Actualmente se conoce, dentro de ciertos intervalos la composición elemental de las sustancias húmicas. Sin embargo la complejidad intrínseca de estos materiales es debida a la variabilidad de factores que intervienen en su formación (material de origen, microorganismos del suelo, condiciones ambientales, etc.), y hace que el estudio de las estructuras químicas que las conforman y sus efectos sobre el ambiente sea realmente complicado. Por consiguiente, la incapacidad para definir las sustancias húmicas en términos químicos específicos nos fuerza a usar definiciones imprecisas, con base únicamente en las características observadas en los procesos de su fraccionamiento. En este sentido, es posible realizar un fraccionamiento de las sustancias húmicas a distintos componentes que presentan propiedades físicas y químicas diversas (ver figura 8 y 9). La técnica de fraccionamiento más común y aceptada es la basada en las tres diferentes solubilidades en agua a varios valores de pH. Así, Alken *et al.*,(1985) distingue:

Ácidos húmicos: Como la fracción insoluble en agua en condiciones ácidas ($\text{pH} < 2$), pero soluble a valores mayores de pH .

Ácidos fúlvicos: A la fracción soluble en agua en todo el intervalo de pH .

Humina: Fracción insoluble a cualquier valor de pH .

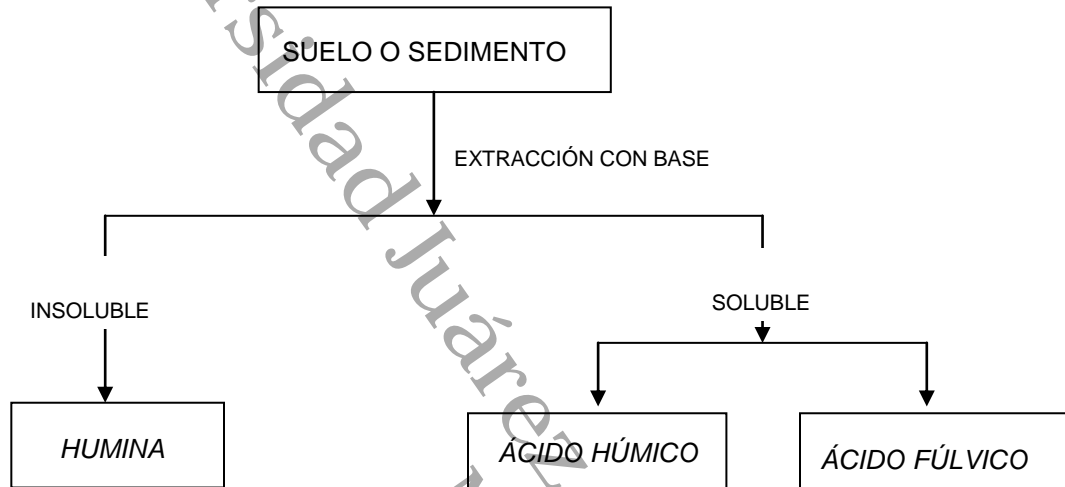


Figura 9. Fraccionamiento de las sustancias húmicas Stevenson (1994).

Las sustancias húmicas o bioactivadores, son ácidos orgánicos complejos muy estables, que una vez activados químicamente poseen una alta capacidad de absorción e intercambio iónico. Las sustancias húmicas, bioactivadores o “ácidos húmicos” como se conoce comúnmente, incluyen el ácido húmico, ácido fúlvico y huminas, todos ellos presentes en el humus natural procedente de la degradación de la materia orgánica. Estas sustancias, son moléculas que presentan grupos carboxilo, hidroxilo, fenólicos y otros que les permiten retener, quelatar, y aumentar la eficiencia de penetración de nutrimentos en las plantas (De Brito, 1972).

Guatemala, (1996), indica que los ácidos húmicos se caracterizan por poseer una molécula orgánica de alto peso molecular de 10.000 a 30.000 g/mol, formada por la degradación de la materia orgánica. Sus estructuras exactas son desconocidas y son extremadamente variables. Su capacidad de intercambio catiónico es alta, y puede ir de 200 a 500 meq/100 g. a un pH de 7. El análisis elemental indica que son cinco los elementos principales que forman parte de su estructura: Carbono, hidrógeno, nitrógeno azufre y oxígeno.

Cuadro 2. Análisis elemental de las sustancias húmicas. Promotora Técnica Agrícola

ANÁLISIS ELEMENTAL DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS		
Elemento	Acido Húmico %	Acido Fúlvico %
C	56.2	45.7
H	4.7	5.4
N	3.2	2.1
S	0.8	1.9
O	35.1	44.9
TOTAL	100.0	100.0

Muchos investigadores ahora coinciden en que todas las sustancias húmicas oscuras son parte de un sistema de estrechamente relacionado, pero no completamente idéntico, polímeros con alto peso molecular. Según este concepto, las diferencias entre los ácidos húmicos y ácidos fúlvicos pueden ser explicados por variaciones en peso molecular, número de los grupos funcionales (Carboxil, fenolico y OH) y la magnitud de polimerización. Las relaciones postuladas se representan en el esquema de la figura 10, puede verse que el carbono y los volúmenes de oxígenos, el pH y grado de polimerización, cambia sistemáticamente al aumentar el peso molecular (Drozd, et. al. 1997).

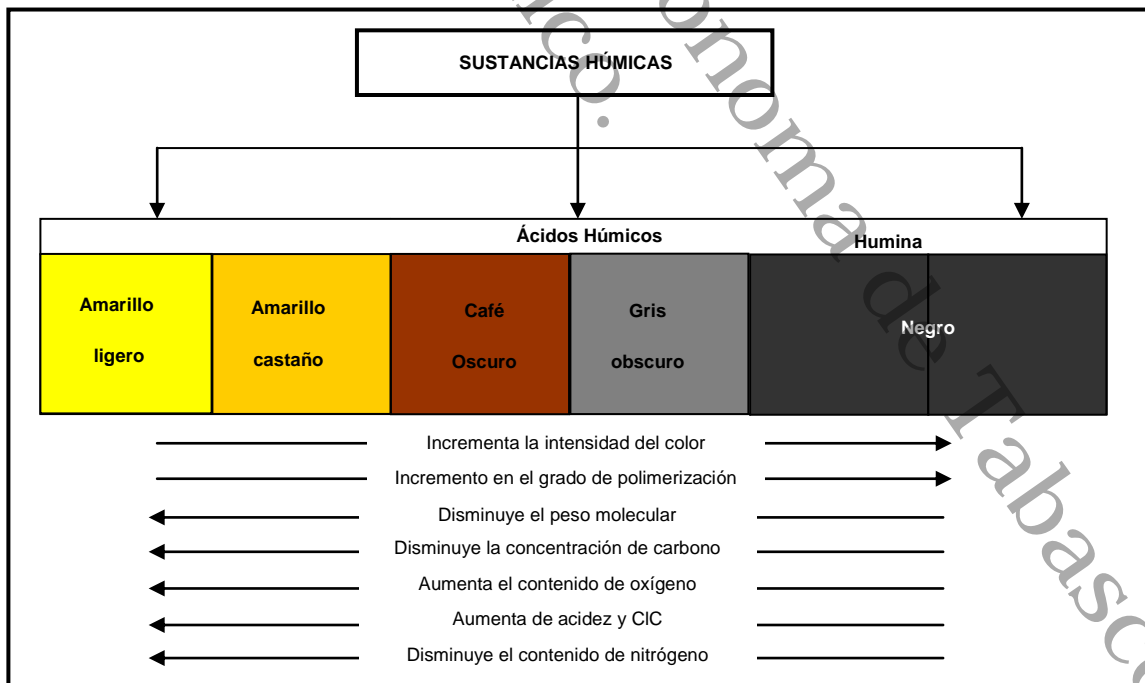


Figura.10. Fraccionamiento De Las Sustancias Húmicas. Propiedades. (Stevenson , 1982).

1.14.1. Composición y estructura.

La gran complejidad que presentan las sustancias húmicas, en cuanto a su composición y estructura, ha hecho necesario grandes esfuerzos para conocer dicha composición. Esta varía dependiendo de su origen, método de extracción y otros parámetros. Sin embargo, las similitudes entre diversas sustancias húmicas son más numerosas que sus diferencias. Dichas analogías son las que han hecho que estos productos sean identificados como un grupo de sustancias. Además, los resultados de las mediciones de las propiedades de las sustancias húmicas suelen ser valores medios debido precisamente a esa heterogeneidad (MacCarthy *et al.*, 1990).

Los análisis elementales de estos compuestos muestran que en general, del 98 al 100% de sus elementos (libres de cenizas) son C, H, O, N, S y P. La distribución se puede ver en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Intervalos usuales para la composición elemental de las sustancias húmicas. (Steelink, 1985).

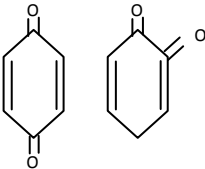
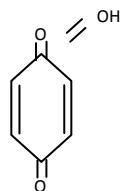
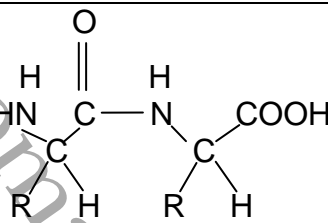
Elemento	Ácidos húmicos (%)	Ácidos fúlvicos (%)
Carbono	53.8-58.7	40.7-50.6
Oxígeno	32.8-38.3	39.7-49.8
Hidrógeno	3.2-6.2	3.8-7.0
Nitrógeno	0.8-4.3	0.9-3.3
Azufre	0.1-1.5	0.1-3.6

La reactividad de las sustancias húmicas y por tanto, sus efectos sobre el suelo y las plantas están estrechamente relacionados con el tipo y concentración de grupos funcionales de las mismas. La mayor parte (cuadro 2) son de tipo oxigenado; carboxilos, alcoholes, hidroxilos fenólicos y carbonilos. Además, la presencia de grupos nitrogenados está ampliamente demostrada (Varanini *et al.*, 1995). Aunque también nos podemos encontrar con éteres, hidroxiquinonas, lactonas. (Stevenson 1994).

Los ácidos fúlvicos contienen un mayor número de grupos funcionales de carácter ácido que los ácidos húmicos (Stevenson, 1994; Schnitzer, 1990), particularmente carboxilos y fenoles. Además, en los húmicos la mayor parte del oxígeno se encuentra formando parte del núcleo o estructura central, en uniones éter o éster, mientras que para los ácidos fúlvicos está como COOH, OHOC=O. Aunque los datos del cuadro 4 muestran cierta

variabilidad, sí se puede decir que los ácidos fúlvicos presentan mayor acidez total que los húmicos, debido a esa mayor presencia de grupos carboxilo e hidroxilo.

Cuadro 4. Grupos funcionales presentes en las sustancias húmicas. (Stevenson, 1994).

Amino	-NH ₂	Anhídrido	R-CO-O-CO-R'
Amina	R-CH ₂ -NH ₂	Imina	R-CHNH
Amida	R-CO-NH ₂	Imino	=NH
Alcohol	R-CH ₂ -OH	Eter	R-CH ₂ -O-CH ₂ -R'
Aldehído	R-CHO	Ester	R-COOR'
Carboxilo	R-COOH	Quinona	
Carboxilato	R-COO		
Enol	R-CH=CH-OH		
Cetona	R=CO-R'	Hidroxiquinona	
Ceto-ácido	R-CO-COOH		
Carbonilo Insaturado	-CH=CH-CHO	Péptido	

Cuadro 5. Distribución de grupos funcionales oxigenados en sustancias húmicas (meq/100g).

	ÁCIDOS HÚMICOS	ÁCIDOS FÚLVICOS
Acidez total	560-890	640-1420
COOH	150-570	520-1120
OH Acidico	210-570	30-570
OH Alcohólicos y débilmente ácidos	20-490	260-950
C-O cetónicos y de quinonas	30-140	120-420
OCH₃	30-80	30-120

La problemática de la definición de una estructura para las sustancias húmicas ha sido afrontada por muchos investigadores, que han propuesto diversos modelos, aunque en muchos casos con poco éxito. Posteriormente, el empleo de modernas técnicas analíticas como la RMN ^{13}C , la resonancia de espín electrónico, la pirólisis – espectrometría de masas y la extracción con gases en estado supercrítico, han proporcionado más información acerca de las complejas estructuras de las sustancias húmicas (Schnitzer, 1990). La mayoría de los datos obtenidos indican que estos materiales están constituidos, en gran medida, por anillos aromáticos unidos entre sí y a otras estructuras de carácter alifático. Estas unidades formarían el esqueleto central o núcleo de las sustancias húmicas (Varanini *et al.*, 1995). La unión desordenada de estas estructuras genera la formación de complejas macromoléculas, cuyas dimensiones pueden variar desde unos pocos cientos a varios miles de Da para los ácidos fúlvicos (Linehan, 1977) hasta varios cientos de miles para los ácidos húmicos (Swift *et al.*, 1971). Un ejemplo de estas estructuras se puede ver en la figura 11. (Hatcher *et al.*, 1994).

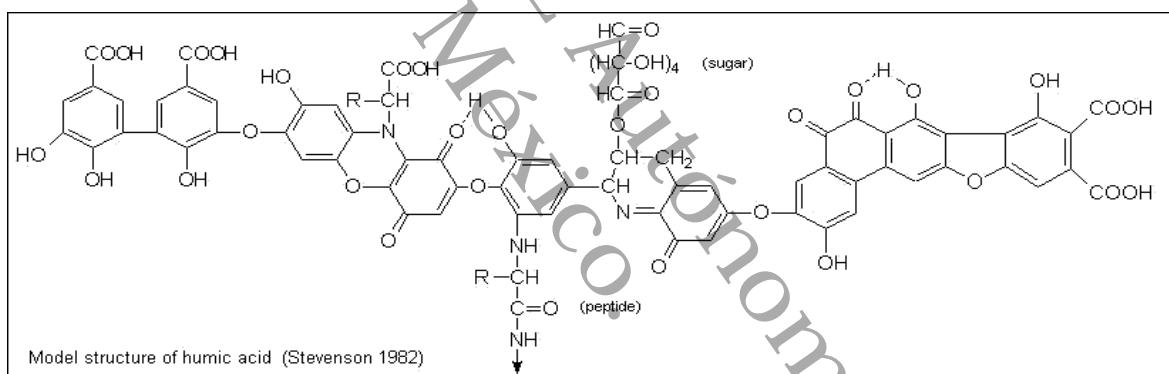


Figura 11. Estructura del ácido húmico (Stevenson, 1982).

1.15 Mecanismos de acción en el suelo:

Los mecanismos de acción mediante los cuales las sustancias húmicas actúan sobre las características físicas, químicas y biológicas del suelo, con el fin de ejercer sus efectos positivos son (Paz, 1999)

- a. **Superficie Específica:** Las sustancias húmicas, por ser partículas coloidales, presentan una gran superficie específica, la cual se relaciona con todas las características y procesos agrícolas de los suelos.

b. **Estructura:** El efecto físico de mayor importancia de los ácidos húmicos en los suelos, es la formación y estabilización de agregados estructurales que influyen directamente en la porosidad, flujo de agua, desarrollo de raíces y absorción de agua de las plantas. Se incrementa la capacidad de reacción de los ácidos húmicos con los minerales del suelo.

En combinación con arcillas, las partículas de humus actúan como cementantes, ya que varias fuerzas de enlace intermolecular están involucradas y se incluyen los puentes de hidrógeno, enlaces éster y fuerzas de Van Der Waals.

c. **Formación de costras y agrietamientos:** En suelos arcillosos, especialmente de arcillas expandibles, los ácidos húmicos generan reducciones en la formación de costras y dan estabilidad a los agregados que se forman en la capa superior del suelo.

El fenómeno de expansión contracción disminuye, con lo cual reduce el agrietamiento del suelo.

d. **Retención de humedad aprovechable por las plantas:** Tanto el contenido como la disponibilidad de agua en el suelo aumentan al incrementarse el contenido de ácidos húmicos, principalmente en suelos minerales.

e. **Capacidad de intercambio catiónico:** La capacidad de intercambio catiónico (CIC), responde al contenido de materia orgánica debido a la composición del humus, que es el causante directo de la alta capacidad de intercambio catiónico en los suelos, ya que sus partículas que forman el complejo órgano - mineral tiene valores desde 101 hasta 470 me/100 g. dentro de un amplio rango de suelos.

f. **Quelatante:** Los ácidos húmicos poseen un notable poder secuestrante de cationes del suelo. Forma complejos estables Cu^{+2} , Mn^{+2} , Zn^{+2} y otros cationes polivalentes, como Fe y Co; desbloqueando sus formas insolubles, poniéndolos a disposición de las plantas.

g. **Inmovilización y mineralización:** Mediante la aplicación de ácidos húmicos, se realiza la inmovilización de N y otros nutrimentos existentes en el suelo en menor tiempo, ya que los ácidos húmicos estimulan el crecimiento de la microflora del suelo y en consecuencia, la descomposición de la materia orgánica y contaminantes orgánicos es

más rápida así mismo la mineralización y el aprovechamiento de los elementos inmovilizados.

Al descomponerse la materia orgánica se produce CO_2 , NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , Y SO_4^{2-} . La materia orgánica es fuente de nutrimentos para las plantas.

h. **Densidad aparente:** La densidad aparente se reduce por acción directa de la adición de ácidos húmicos y por el efecto sobre la formación de agregados y de la estructura del suelo.

i. **Reacción del suelo:** Los residuos orgánicos afectan el potencial hidrógeno (pH) en base a la cantidad de humus que se aporta al suelo y el tiempo de descomposición de éstos. El humus formado actúa como ácido débil asociado y tiene como principales componentes a los ácidos húmicos y fúlvicos, los cuales acidifican en grado bajo el medio y disminuyen el pH.

La materia orgánica exhibe poder amortiguador en rangos ligeramente ácidos, neutros y alcalinos. Ayuda a mantener una reacción (pH) uniforme en el suelo.

j. **Porcentaje de sodio intercambiable (PSI):** El PSI de los suelos disminuye al agregarle ácidos húmicos o materia orgánica ya que la capacidad de intercambio catiónico del suelo aumenta; el sodio soluble también se reduce. El humus mejora la estructura de los suelos defloculados por exceso de sodio y remueve a éste de las micelas del suelo, mediante quelatación y donación de electrones en sustitución de los mismos.

k. **Combinación con moléculas orgánicas:** Los ácidos húmicos afectan la bioactividad, persistencia y biodegradabilidad de los pesticidas.

l. **Reacciones con el nitrógeno:** Actúan como fijador del amoníaco, disminuye el proceso de desnitrificación, con lo cual aumenta la capacidad de fijación y utilización del nitrógeno del suelo.

m. **Reacciones con el fósforo:** Desbloquea compuestos insolubles de fósforos y pone éste elemento a disposición de la planta. La fijación de fósforos por aluminio y calcio en suelos ácidos y alcalinos, se minimiza por acción del ácido húmico, y se favorece la disponibilidad del fósforo y de los cationes con los que reacciona, principalmente hierro, zinc y calcio.

n. **Microflora benéfica:** Con la aplicación de ácidos húmicos se tienen efectos estimulantes en el crecimiento de microorganismos aeróbicos, especialmente los que descomponen celulosa, almidón y proteínas; el número de microorganismos existentes por gramo de suelo aumenta en forma descomunal, lo que favorece la fertilidad del suelo.

1.16. Sustancias húmicas comerciales.

Bajo la denominación de sustancias húmicas, ácidos húmicos o enmiendas húmicas se han venido comercializando en México y en el extranjero una gran cantidad de productos a los que se les ha atribuido propiedades muy diversas (Cahadia, 1997). Mejorar la estructura de los suelos, aumentando su capacidad de retención de agua. Evitar la retención de los cationes de los suelos desbloqueándolos. Fijar fertilizantes, disminuyendo las pérdidas por lixiviación. Activar la flora microbiana, estimular la germinación. Facilitar la absorción de nutrientes al aumentar la permeabilidad celular. Aconsejándose su utilización tanto en agricultura como en actividades con implicaciones ambientales.

En el mercado pueden encontrar marcas comerciales de sustancias húmicas sólidas y líquidas (De Liñan, 1998). Sus orígenes son diversos. Para las sólidas predominan las leonardita y estiércoles de ovino combinado con diferentes residuos orgánicos, así como turbas y otros productos. Las sustancias húmicas comerciales líquidas proceden fundamentalmente de tres orígenes; leonardita, restos vegetales y turbas.

En las sustancias húmicas procedentes de lignitos predominan las fracciones húmicas de mayor o menor nivel de policondensación según sea el estado de degradación del material, pero normalmente es demasiado inerte. Una materia prima bastante degradada y oxidada, junto a un método extractivo agresivo, con pretratamiento ácido y utilización de KOH en alta concentración puede provocar una disminución de los valores de la relación húmicos/fúlvicos de los extractos, dando lugar a productos agrónomicamente más interesantes.

1.17. Sustancias húmicas provenientes de vermicomposteo.

Se denomina vermicomposteo (humus de lombriz) o lombricomposta al excremento de las lombrices obtenido mediante la cría intensiva de ciertas variedades de lombrices alimentadas con desechos orgánicos (Cacciamani, 1998).

En las últimas décadas el desarrollo biotecnológico del manejo de las lombrices de tierra para la transformación de residuos orgánicos de diferente naturaleza en vermicomposta como una alternativa para revalorar esos recursos, se ha extendido tanto a nivel mundial, como en México, empleando paquetes tecnológicos importados y otros desarrollados en el país para la transformación de los residuos de la industria de la caña de azúcar., residuos de café, de estiércoles, pajas, etc. Esto a su vez a despertado el interés de comprobar los mecanismos por los cuales se obtienen respuestas muy favorables al someter los residuos orgánicos a la actividad biológica de estos organismos (García, 1999).

Así al tomar en cuenta la actividad de las lombrices de tierra para aumentar el crecimiento de cultivos, mejorar las propiedades físicas de los suelos, mezclar mejor el suelo aumentar las tasas de infiltración del agua y la asimilabilidad de los nutrimentos, se extrapola que la adición de la vermicomposta al suelo favorecerá estos efectos. Sin embargo en la lombricultura el efecto más importante va a ser el resultado de sus actividades en el proceso de humificación de los materiales (García, 1999).

Al moler y mezclar los constituyentes orgánicos e inorgánicos de los residuos con las sustancias excretadas por su tracto digestivo, las lombrices estimulan la actividad biológica en el medio, modifican la composición de las comunidades de microorganismos y favorecen la velocidad de transformación de estos residuos para mineralizarse en parte los compuestos orgánicos más sencillos y en forma simultánea favorecer el proceso de humificación durante su metabolismo, ya que buena parte de los compuestos orgánicos que se producen son de naturaleza mas compleja y por lo tanto más estables que los componentes originales de los materiales orgánicos que descomponen (García, 1999).

Estos compuestos mas estables corresponden a sustancias húmicas conforme su comportamiento en las metodologías empleadas para la caracterización del humus de los suelos. Su presencia es de suma importancia ya que desde la primera mitad de este siglo se ha documentado ampliamente las interacciones favorables de las sustancias húmicas en el suelos particularmente en las plantas, (Burk et al., 1933, Rerabeck, 1960, Aso y Sakai, 1963, citados por García, 1999). Algunas revisiones al respecto Varanni y Pinton, 1995, Citados por García, 1999; resumen los efectos positivos de las sustancias húmicas como fuente y reserva de nutrimentos sobre todo de N,P,S, y micronutrimentos.

1.17.1 El vermicompostaje y los ácidos húmicos, fúlvicos y humina

El vermicompostaje es una técnica modificada del compostaje convencional para acelerar aún más la biotransformación de los residuos orgánicos por el fraccionamiento del material y la aireación provocada por las lombrices. Durante este proceso, los desperdicios orgánicos se transforman al ser ingeridos, digeridos y excretados por las lombrices (Wong *et al.*, 1991).

La vermicomposta es llamada también abono, lombricompuesto o *humus* de lombriz y es de color negruzco, granulado, homogéneo y con un olor agradable, enriquecido de microorganismos y enzimas con carácter nitrogenado (urea, mucoproteínas, ácido úrico, hipúrico y creatina), además de ser rica en fósforo, potasio y una gran cantidad de micronutrientes. Es utilizado como fertilizante orgánico para mejorar y recuperar el suelo, su característica fundamental es la bioestabilidad, pues no da lugar a fermentación o putrefacción, contiene cuatro veces más nitrógeno, veinticinco veces más fósforo, y dos veces y media más potasio que el mismo peso del estiércol de bovino, contiene un elevado porcentaje de ácidos húmicos y fúlvicos producidos por la actividad microbiana que ocurre durante el período de reposo dentro del lecho, en la preparación de la misma.

La participación de las lombrices en la biotransformación de la materia orgánica está en estrecha relación con los grupos microbianos presentes en los residuos. Debido a esto se establecen cuatro principales mecanismos de acción (Zulueta *et al.* 1995).

Las principales ventajas que presentan: a) Las lombrices incrementan el área superficial del sustrato, al fraccionar los materiales orgánicos, con lo que mayor número de microorganismos pueden participar en la mineralización y aumenta la retención de agua e incrementa el contenido de *humus* del suelo y microorganismos y fijadores de nitrógeno, en la capacidad de intercambio catiónico y corrector de la acidez del suelo. b) Estimulan la descomposición del material por la actividad microbiana intracorporal por medio de una relación de simbiosis intestinal. c) Favorecen la digestión microbiana extracorporal, ya que las lombrices forman una membrana peritrófica mucoproteica en sus excretas que estimula la actividad microbiana. d) Producen compuestos bioactivos que se generan por las relaciones anteriores, encontrándose: enzimas, antibióticos, vitaminas, hormonas, que contribuyen a mejorar la fertilidad de los suelos donde se aplique la vermicomposta y por las aportaciones de material orgánico influye positivamente en las propiedades físicas y

químicas del suelo. e) En las evaluaciones de la madurez de compostas y vermicompostas se tiende con frecuencia a fraccionar el material orgánico con la intención de separar diferentes compuestos húmicos (ácidos húmicos, fúlvicos y huminas). Las vermicompostas se obtienen en un período aproximado de cuatro meses este tiempo puede disminuir dependiendo de las condiciones ambientales y del número de lombrices empleado (Paul, et al., 1996).

1.17.2 Ácidos húmicos

Los ácidos húmicos son macromoléculas orgánicas de aspecto coloidal y características polielectrolíticas, provenientes de la descomposición microbiológica de animales y vegetales. Son solubles en una disolución alcalina, pero precipitan cuando se acidifica el extracto, son de color café oscuro, de altos pesos moleculares, altamente polimerizados, íntimamente ligados a arcillas y resistentes a la degradación. Contienen de 50 a 62% de carbono. Los ácidos fúlvicos se encuentran en la fracción húmica que permanece en la solución acuosa acidificada; solubles en ácidos y bases, son de color pardo-amarillento y de bajo peso molecular y poseen de 43 a 52% de carbono (Hoitink t al., 2004).

Posibles mejoras

a) Físicas

- Favorece la formación de suelos estables, actuando con arcillas y humus; mejorando la estructura del suelo.
- El *humus* aumenta la capacidad de retención de humedad al suelo. Mejora y regula la velocidad de infiltración del agua, evitando la erosión producida por el escurrimiento superficial.

b) Químicas

- Las sustancias húmicas elevan la capacidad de intercambio catiónico de los suelos al unirse con las arcillas para formar el complejo arcillo-húmico.
- Mantiene el fósforo en un estado asimilable por la planta.
- El *humus* es la fuente de gas carbónico que constituye a solubilizar algunos elementos minerales, con lo que facilita se absorción por las plantas.

- El *humus* aporta elementos minerales en bajas cantidades y es una importante fuente de carbono.

c) Biológicas

- El *humus* es una importante fuente de hidratos de carbono para los microorganismos del suelo.
- Favorece el desarrollo de cadenas nutritivas en el suelo.

d) Plantas

- Los ácidos húmicos estimulan el desarrollo de raíces y tallos.
- El tratamiento de semillas y estratos con ácidos húmicos promueve el desarrollo de la raíz.
- Mejora la absorción de micronutrientes como Fe, Cu y Zn, en maíz y trigo.
- Estimula y aumenta la absorción de nitrógeno. (Schneider *et al.*, 1990).

1.18. Usos de las bacterias en la biorremediación

Las bacterias son las más importantes en cuanto a la degradación de hidrocarburos, entre las que destacan *Pseudomonas*, *Brevibacterium*, *Arthrobacter*, además de cianobacterias y algas con la capacidad de oxidar hidrocarburos (Cerniglia, 1992).

La inoculación óptima permite un tratamiento favorable de sitios contaminados por hidrocarburos sobre todo de los suelos contaminados.

Las bacterias que han demostrado capacidad de degradación de hidrocarburos son numerosas. (Daubaras *et al.*, 1992). Los géneros de bacterias degradadoras de hidrocarburos en el suelo son *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Nocardis*, *Proteus* y *Pseudomona*. (Rosenberg *et al.*, 1996). Los géneros de bacterias presentes en diferentes suelos contaminados con petróleo crudo, gasolina y queroseno, las más abundantes fueron *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium* y *Vibrio* (Chaneac *et al.*, 1995). Ver Cuadro 6. La biodegradación de diferentes compuestos poliaromáticos de 2 hasta 4 anillos, entre

ellos naftaleno, fenantreno, pireno y fluoranteno con porcentajes de degradación de 59.5, 50.9, 63.0 y 89.7 % respectivamente, en un tiempo de 10 días (Okpokwasili *et al.*, 1995).

Cuadro 6. Bacterias degradadoras (Hecker *et al.*, 1994).

Géneros bacterianas	
<i>Achromobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>
<i>Actinomyces</i>	<i>Aeromonas</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Methyobacterium</i>	<i>Methylosinus</i>
<i>Mycobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>Vibrio</i>	<i>Arthrobacter</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Beneckea</i>
<i>Brevibacterium</i>	<i>Corynebacterium</i>
<i>Methylobacter</i>	<i>Micromonospora</i>
<i>Nocardia</i>	<i>Spirillum</i>
<i>Methylococcus</i>	<i>Mthylomonas</i>

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODO

FASE DE CAMPO

Se determinaron los sitios de muestreo en función de la elección previa en cada una de las áreas identificadas como zonas afectadas por hidrocarburos totales del petróleo de acuerdo al CIMADES (1997) reportando que existen aproximadamente 7 200 hectáreas afectadas; de ellos más del 90% se encuentran en pantanos o zonas inundables. Más recientemente PEMEX, con apoyo del IMP ha identificado aproximadamente 300 hectáreas contaminadas en el estado y 178 presas contaminadas con desechos aceitosos, en base a esto se ha proyectado para restauración en suelos arenosos, pegado a la línea de costa de Paraíso, uno más en suelo arcilloso-limoso hacia la zona de Jalpa de Méndez y Nacajuca, en donde se encuentra una alta cantidad de materia orgánica, y uno más en la zona de Huimanguillo, con características arcillosas. Lo anterior servirá para identificar el mejor rendimiento de las sustancias húmicas para remediación de hidrocarburos totales del petróleo en los diferentes suelos encontrados en la región y en donde existe la mayor problemática de pasivos ambientales. Ver figura 12.

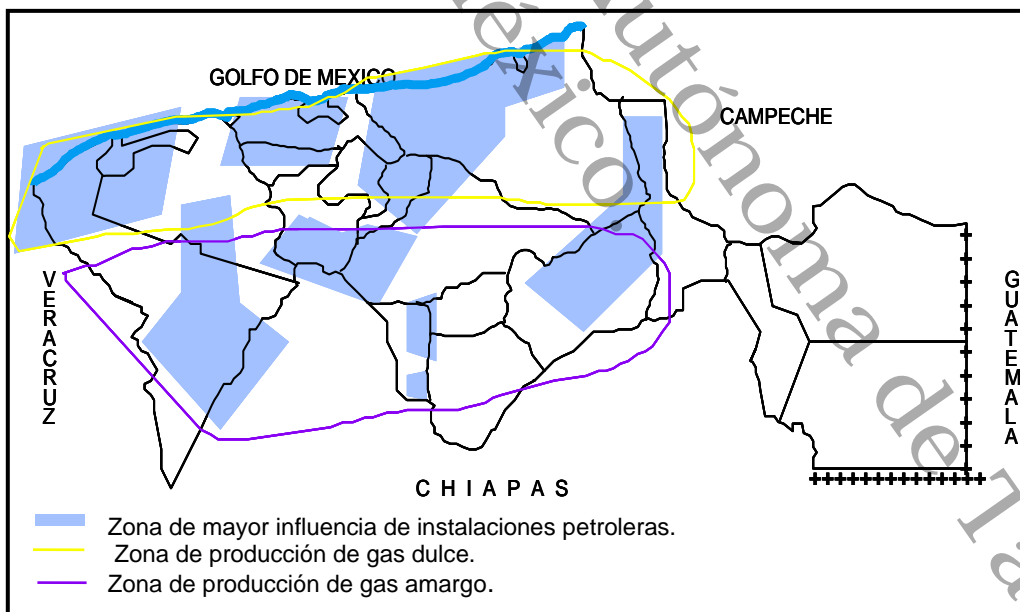


Figura 12. Zonas afectadas por hidrocarburos. (PROFEPA, 1999).

2.1 Estudio agrológico y ubicación de los perfiles típicos

Tabasco tiene una extensión territorial de 2,475,100.00 ha, todo este espacio está formado por diversos tipos de suelo. El estudio agrológico se realizó en tres sitios, de los cuales fueron: el suelo *arcilloso* ubicado en un punto localizado en: 18°10'35" latitud norte y 94°04'25" longitud Oeste, tomadas en el Ejido Tres Bocas, cerca de Villa La Venta, Huimanguillo; el suelo *arcilloso-limoso*. Las muestras de este suelo se obtuvieron en un sitio localizado en: 18°14'59" latitud Norte y 93°00'48" longitud Oeste, en la localidad Tierra Adentro 3ra. Sección Jalpa de Méndez colindando con la localidad Oxiacaque, Nacajuca, Tabasco. El suelo *migajón-arenoso*. Ubicando las muestras en: 18°42'41" latitud norte y 93°19'14" longitud Oeste; rumbo al puerto Dos Bocas; Paraíso, Tabasco. Tal como se muestra en la figura 13. Para trazar una rejilla de 50x50 cm, se barrenó hasta dos metros de profundidad en las intersecciones. Se caracterizó en campo la textura, color (tabla de colores Munsell), pH (potenciómetro manual) y conductividad eléctrica (CE) (conductímetro de campo). Esta información fue la base para identificar la distribución de la heterogeneidad del suelo.

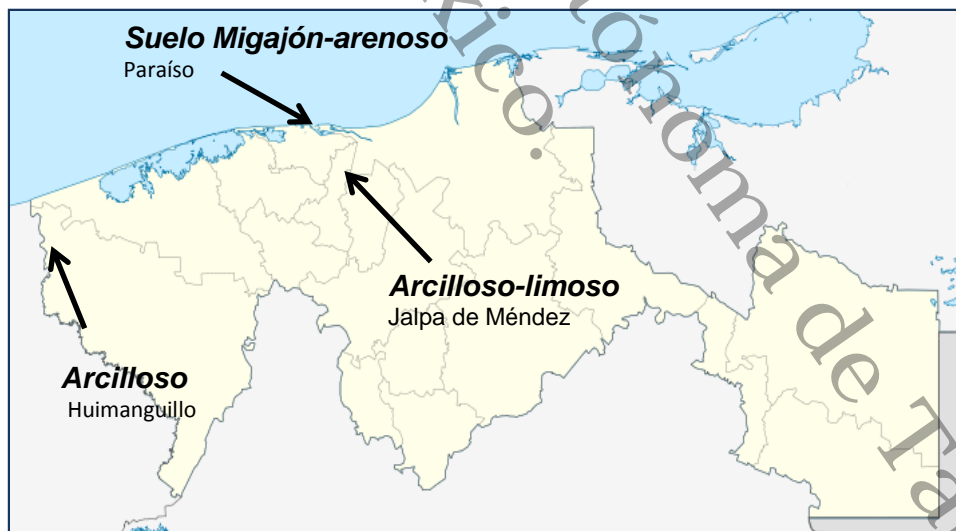


Figura 13. Mapa de los suelos (Palma, 2002).

2.2. Caracterización del suelo, colecta y conservación de la muestra

Se colectaron en bolsas de plástico cinco submuestras de un kg cada una, tomadas de la parte central de los horizontes o capas, se utilizaron para el análisis de las propiedades físicas y químicas de acuerdo con el manual de campo Cuanalo (1981).

La colecta del suelo para su posterior Análisis de Hidrocarburos Totales del Petróleo se realizó tomando 0.1 Kg de suelo, se introdujeron en frascos de vidrio ámbar estériles, se conservaron en hielera con hielo durante el trabajo de campo, y después en refrigeración a 4°C, para inhibir la actividad microbiana. Las bolsas y los frascos se identificaron con fecha de muestreo, lugar y horizonte o capa (Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT-2003. Apartado A.3. Determinación de hidrocarburos de la fracción pesada. Noviembre 2004)

2.2.1. Obtención de la muestra para determinar propiedades fisicoquímicas

Se colectaron muestras de los suelos seleccionados según la norma oficial mexicana NOM-021-RECNACT-2000. Apartado 6.1 (Anexo 1), para esto se obtuvieron muestras simples a una profundidad de 30 cm, cada 30 m, utilizándose la técnica del zig-zag, obteniendo un total de 60 Kg de suelo de 30 puntos de muestreo, se guardaron en bolsas de polietileno, que fueron selladas y etiquetadas con la siguiente información, nombre de la persona que tomó la muestra, fecha y hora de muestreo, nombre de la institución, lugar de muestreo y número de la muestra, para posteriormente ser llevadas al laboratorio para su procesamiento y realizarle los análisis correspondientes.

FASE DE LABORATORIO

La fase de laboratorio implica todos los análisis realizados durante la investigación, desde el procesamiento de la muestra, la caracterización del suelo, determinación de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, pretratamiento y esterilización del crudo, selección de microorganismos, contaminación y acondicionamiento del suelo; hasta el seguimiento en el laboratorio.

2.3. Procesamiento de las muestras de los suelos

En este apartado se aplicaron los procedimientos de acuerdo a la NOM-021-RECNACT-2000 Apartado 7.1.1 (Anexo 2), siguientes: desecación, trituración, molienda y tamizado.

Desecación: Las muestras se secaron parcialmente al aire a temperatura ambiente en una superficie de polietileno cubierta con papel, con el fin de eliminar el exceso de humedad presente en el suelo.

Trituración: La muestra se sometió a una trituración con rodillo de madera para la reducción de tamaño, para eliminar los residuos orgánicos visibles que pueda contener la muestra.

Molienda: Consistió en moler la tierra con el fin de disgregar las partículas mas finas.

Tamizado: El suelo molido se hizo pasar por un tamiz con una abertura de 2mm (malla # 10) de acero inoxidable, una vez tamizado la muestra, se depositaron en un recipiente de plástico para su almacenamiento.

2.3.1. Determinación de ácidos húmicos (AH) y fúlvicos (AF)

La separación de las fracciones de AH y AF a partir de las muestras de composta y vermicomposta, se hicieron por medio del método Kononova y Belchikova (1961). En este procedimiento se utilizan álcalis y ácidos diluidos como NaOH 0.1 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0.1 M (pirofosfato de sodio). Los pasos son los siguientes:

Se pesan 10 g de composta o vermicomposta y se colocan en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se agrega la solución extractora de NaOH 0.1 M y $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0.1 M (200 mL de cada uno) en relación 1:1, hasta completar una relación de 1:10 (40 g/mL). Se agita durante 24 h en una atmósfera, de preferencia, exenta de oxígeno.

Se deja reposar para decantar el sobrenadante en el cual va la fracción húmica de las compostas y vermicompostas. Se centrifuga por 10 a 15 min a 3500 rpm. Se recoge el líquido de la centrifugación y se lleva a un pH 2. La regulación del pH se hace con HCl 10 M y se deja reposar a este pH durante 24 h y en condiciones de refrigeración.

A las 24 h se deben distinguir las dos partes. Puede presentarse una dispersión. Si éste fuera el caso se hace a pH de 1.5 se sifonea y se recoge (se obtienen AH y AF). Al precipitado se le agrega NaOH 0.1 M hasta alcalinizar. Se agita y otra vez se lleva a pH 2 con HCl 10 M. Se deja reposar otras 24 h y se vuelve a decantar los AF. Se centrifuga el precipitado (AH) hasta lavar y obtener una reacción negativa de cloruros. El precipitado se traspasa a un tubo de diálisis con paso no mayor de resolución de 6000 de peso

molecular, marca Spectrapor y diámetro de 14.6 mm. Se lavan con agua destilada en un recipiente de plástico hasta la reacción negativa de cloruros. Constantemente se cambia el agua, conforme la reacción del medio con AgNO_3 (a 1%). Una vez que se confirmó la reacción negativa, se liofilizaron y cuantificaron las cantidades producidas de AH.

2.4. Elaboración de la vermicomposta

Se seleccionó un sitio adecuado para hacer la cama de lombrices, *Roja Californiana* (*Eisenia foetida*), que estuviera sombreado, con buen drenaje y abastecimiento de agua para proporcionarle la humedad necesaria, protegido de animales que pudieran causar daño. Se prepararon las camas colocando una capa de 15-20 cm de alto del material a procesar, ya listo se monitoreó el pH (de 6.8 a 7.7). Antes de agregarle las lombrices se colocó en el fondo tiras de periódico o cartón, para formar un colchón con la finalidad de proporcionarles refugio a las lombrices en el caso de sufrir cambios medio ambientales en su medio de crianza. Se hizo una prueba con el sustrato que se empleó, en una pequeña parte de la “cama” (10 x 10 cm.) de la siguiente manera:

1. Depositando 10 lombrices en una parte de “la cama”.
2. Observando que penetrará en la materia orgánica.
3. Esperando cinco minutos, tiempo en el cual las lombrices debían enterrarse. Si éstas no se enterraban, la materia orgánica aún no estaba lista, por lo que había que esperar a que se descompusiera bien ya que la materia orgánica tarda en descomponerse aproximadamente 45 a 60 días, dependiendo del sustrato.

Se procedió a sembrar las lombrices, con 2,500 lombrices por m^2 . Dependiendo del sustrato, las lombrices iniciaron su reproducción en un lapso no mayor a 8 días.

La terminación de la vermicomposta puede apreciarse cuando el material es de color oscuro, inodoro, y no se aprecian ya fragmentos del residuo original (R. Arribal *et al.*, 1999). Ver figura 14.

Esto ocurre en un periodo aproximado de cuatro meses, tiempo en el cual la materia orgánica se ha descompuesto, obteniéndose un abono orgánico rico en nutrientes.



Figura. 14. Preparación de la vermicomposta.

2.5. Selección de la vermicomposta

La selección de la vermicomposta se realizó en base a la mayor cantidad de carbono de ácido fúlvico, evaluado a cinco tipos de vermicomposta: cascarilla de arroz, bagacillo de caña, cascarilla de cacao, estiércol de res y mezcla de todas ellas, mediante el procedimiento de Kononova y Belchicova (1982) (Anexo 7) para la determinación del carbono del ácido húmico (AH) y carbono del ácido fúlvico (AF). De acuerdo a nuestros resultados la mezcla de vermicomposta fue seleccionada (Cuadro 15).

2.6 Caracterización del suelo

La caracterización de suelos implica determinar las propiedades físicas, químicas y biológicas con el fin de conocer las propiedades principales y fracciones que constituyen al suelo (Palma *et al.*, 2007).

2.6.1. Análisis físicos y químicos de las muestras de suelos

Los análisis físicos que se realizaron fueron los siguientes: Determinación de la textura del suelo por el procedimiento de Bouyoucos, este análisis fue realizado en el laboratorio de análisis de suelos, plantas y aguas del Colegio de Postgraduados en Cárdenas, Tabasco, determinación de la densidad aparente del suelo, Método (AS-03) de la NOM-021-RECNAT-2000 Apartado 7.1.3 (Anexo 3), determinación de la densidad real con picnómetro, Método (AS-04) de la NOM-021-RECNAT-2000 apartado 7.1.4 (Anexo 4) y la determinación de humedad por el Método NMX-AA-052 de la NOM-138-SEMARNAT-2003 (Anexo 5). Los análisis químicos realizados fueron la determinación de fósforo, nitrógeno (método de Kjeldahl), magnesio y calcio por absorción atómica. Todos estos análisis fueron realizados en el laboratorio de análisis de suelos, plantas y aguas del

Colegio de Postgraduados en Cárdenas, Tabasco. La determinación de ácidos húmicos y fúlvicos se realizó de acuerdo al método de Kononova y Belchicova (Anexo 7), el pH fue determinado a través del método (AS-02) de la NOM-021-RECNAT-2000 Apartado 7.1.2 (Anexo 6), la medición de la temperatura se realizó utilizando un termómetro de -20 a 150 °C marca Brannan y la determinación de la materia orgánica por el método de Walkley y Black, método (AS-07) de la NOM-021-RECNAT-2000 Apartado 7.1.7 (Anexo 8) .

El análisis biológico se realizó con el método de recuento en placas de células viables por diluciones en serie (Madigan *et al.*, 2003). Una célula viable es capaz de dividirse para formar colonias sobre la superficie de un medio sólido. Se utilizaron diluciones seriadas en base 10, se diluyeron 10 g de suelo en 90 ml de agua destilada estéril, se tomó 0.1 ml de cada dilución colocándose en el centro de la caja petri que contenía agar nutriente como medio de cultivo, se extendió por toda la superficie del medio utilizando una barra de vidrio estéril doblada en forma de triángulo. El procedimiento se realizó por triplicado, es importante que la superficie esté bien seca de modo que el líquido que se extiende por la superficie se empape rápidamente en el medio. Ver figura 15.

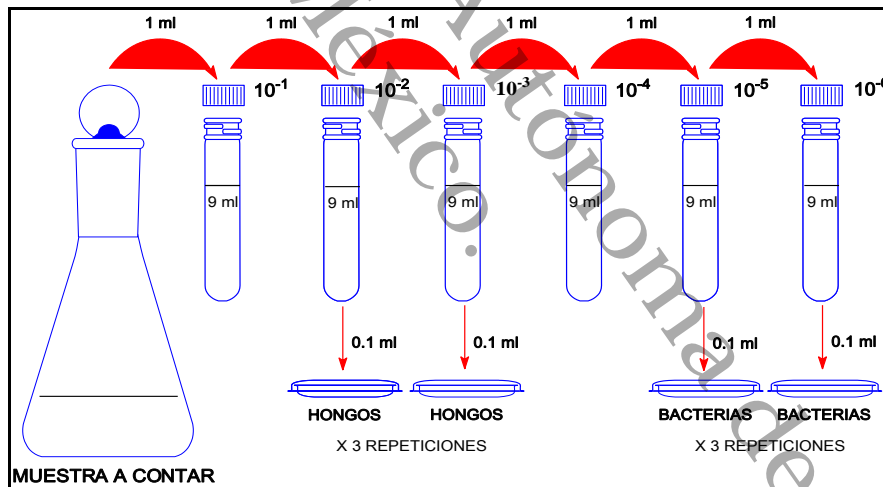


Figura 15. Procedimiento para el conteo de células viables utilizando el método de conteo en placas por diluciones seriadas.

Los resultados obtenidos de la caracterización del suelo se muestran en el cuadro 8, además se realizó un análisis de Hidrocarburos Totales de Petróleo (Fracción pesada) al suelo mediante el Método: EPA 3540C (1996). Soxhlet Extraction (Revisión 3, December 1996), (Anexo 9).

2.7. Establecimiento del experimento en laboratorio

La determinación de las unidades experimentales se realizó de acuerdo al cuadro 7.

Cuadro 7. Tratamientos y repeticiones para establecer el experimento

SUELO (FACTOR 1)	CONDICIONES (FACTOR 2)	MICROORGANISMOS (FACTOR 3)	UNIDADES EXPERIMENTALES
ARCILLOSO	1. SIN VERMICOMPOSTA	C/MICROORGANISMOS	SVCMR1
			SVCMR2
			SVCMR3
		S/MICROORGANISMOS	SVSMR1
			SVSMR2
			SVSMR3
	2. CON VERMICOMPOSTA ORGANICA	C/MICROORGANISMOS	VOCMR1
			VOCMR2
			VOCMR3
		S/MICROORGANISMOS	VOSMR1
			VOSMR2
			VOSMR3
3. CON SUSTANCIAS HUMICAS COMERCIALES	C/MICROORGANISMOS	CCCMR1	
		CCCMR2	
		CCCMR3	
	S/MICROORGANISMOS	CCSMR1	
		CCSMR2	
		CCSMR3	
ARCILLOSO-LIMOSO	1. SIN VERMICOMPOSTA	C/MICROORGANISMOS	SVCMR1
			SVCMR2
			SVCMR3
		S/MICROORGANISMOS	SVSMR1
			SVSMR2
			SVSMR3
	2. CON VERMICOMPOSTA ORGANICA	C/MICROORGANISMOS	VOCMR1
			VOCMR2
			VOCMR3
		S/MICROORGANISMOS	VOSMR1
			VOSMR2
			VOSMR3
3. CON SUSTANCIAS HUMICAS COMERCIALES	C/MICROORGANISMOS	CCCMR1	
		CCCMR2	
		CCCMR3	
	S/MICROORGANISMOS	CCSMR1	
		CCSMR2	
		CCSMR3	
MIGAJÓN-ARENOSO	1. SIN VERMICOMPOSTA	C/MICROORGANISMOS	SVCMR1
			SVCMR2
			SVCMR3
		S/MICROORGANISMOS	SVSMR1
			SVSMR2
			SVSMR3
	2. CON VERMICOMPOSTA ORGANICA	C/MICROORGANISMOS	VOCMR1
			VOCMR2
			VOCMR3
		S/MICROORGANISMOS	VOSMR1
			VOSMR2
			VOSMR3
3. CON SUSTANCIAS HUMICAS COMERCIALES	C/MICROORGANISMOS	CCCMR1	
		CCCMR2	
		CCCMR3	
	S/MICROORGANISMOS	CCSMR1	
		CCSMR2	
		CCSMR3	

El experimento es de tipo factorial completamente al azar de 3x3x2x3 obteniendo 54 unidades experimentales las cuales fueron de vidrio de color ámbar y ovalados.

2.8. Pretratamiento del petróleo

2.8.1. Estabilización del petróleo crudo

El petróleo utilizado, se destiló durante 2 h a 220°C, por destilación simple para eliminar fracciones de hasta C17 de acuerdo al Método: EPA 3540C (1996). Soxhlet Extraction (Revisión 3, December 1996), (Anexo 9) y dejar la fracción pesada que cubre pesos moleculares mayores a C18. Ver Figura 16.



Figura 16. Estabilización del petróleo crudo

Una vez destilado el petróleo se determinó su densidad por el método del picnómetro a), y se calculó el volumen a utilizar para contaminar el suelo a una concentración de 50 000 ppm b).

a) Densidad del crudo destilado

$$W_{Pic / petróleo} = 43.9722 \text{ g}$$

$$W_{Pic / vacío} = 20.5628 \text{ g}$$

$$\text{Volumen} = 25.137 \text{ ml}$$

$$\rho = \frac{W_{Pic / petróleo} - W_{Pic / vacío}}{\text{Volumen}}$$

$$\rho = \frac{43.9722 \text{ g} - 20.5628 \text{ g}}{25.137 \text{ ml}} = 0.9313 \text{ g/ml}$$

b) Volumen de crudo a utilizar para contaminación del suelo a 50 000 ppm

Base: 1 Kg de tierra (Base seca)

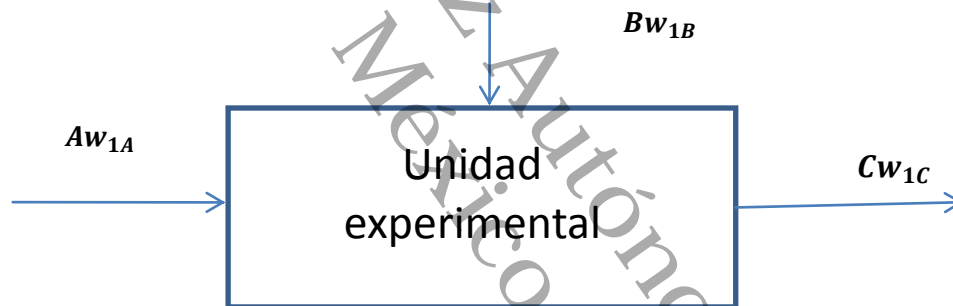
$$[HC' s] = 50000 \text{ ppm} = \frac{50,000 \text{ mg}}{1 \text{ Kg}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000 \text{ mg}} = 50 \text{ g/kg}$$

Por tanto, por cada kg de tierra en base seca se requiere adicionar 50 g de petróleo crudo para lograr una concentración de 50,000 ppm.

Considerando lo anterior, la cantidad de petróleo necesario para lograr la misma concentración en cada unidad experimental con 2.5 kg de tierra se calcula mediante un **balance de masa**.

Teniendo:

$$Aw_{1A} + Bw_{1B} = Cw_{1C} \quad w_{1A} = 0, \quad w_{1B} = 1, \quad w_{1C} = 50 \text{ g/Kg}$$



Dónde:

A: Cantidad de suelo en la unidad experimental

W_{1A} : Concentración de petróleo a la entrada

B: Volumen de petróleo a adicionar

W_{1B} : Fracción mol de petróleo

C: Cantidad de suelo en kg

W_{1C} : Concentración de petróleo: 50g/kg

Realizando un balance por componente

$$Aw_{1A} + Bw_{1B} = Cw_{1C} ; w_{1A} = 0, w_{1B} = 1, w_{1C} = 50 \text{ g/Kg}$$

$$B = Cw_{1C}$$

$$B = (2.5 \text{ kg}) (50 \text{ g/Kg})$$

$$B = 125 \text{ g}$$

Pero el petróleo se adiciona en forma líquida, por lo que se calcula el volumen necesario:

$$V = \frac{m}{\rho} = \frac{125 \text{ g}}{0.9313 \text{ g/ml}} = 134.221 \text{ ml}$$

2.9 Contaminación y acondicionamiento del suelo

La contaminación del suelo y su acondicionamiento se realizaron de acuerdo a las condiciones en el diseño del experimento.

Se contaminaron 135 kg de suelo, utilizando un volumen de 7247.93 ml de petróleo como lo muestra la figura 17, y se acondicionó con triple 17 y urea empleando 115.992 g.

2.9.1. Tratamiento sin vermicomposta

De acuerdo al cálculo siguiente, se obtuvo la cantidad de urea y Triple K que debía agregarse a las unidades que sirvieron como blanco:

Concentración de triple 17 y urea = 0.908 kg/m^3 (Hernández y Velázquez, 2008)

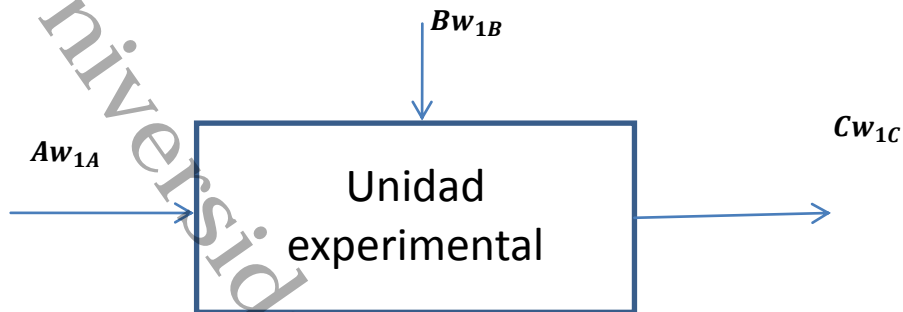
Densidad del suelo = 1056.8 kg/m^3

$$\rho = \frac{m}{v} \therefore m = \rho v \quad m(\text{kg}) = \rho \left(\frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right) v(\text{m}^3)$$

Para determinar la cantidad de urea y triple 17 que se adiciona a cada unidad experimental con 2.5 kg de tierra, se plantean balances de masa.

Considerando que la densidad del suelo es 1056.8 kg/m^3 y que la concentración recomendada tanto de urea como triple 17 es 0.908 kg/m^3 y teniendo una base de cálculo de 1 m^3 de tierra en base seca, se tiene:

$$Aw_{1A} + Bw_{1B} = Cw_{1C} ;$$



Dónde:

A: Cantidad de suelo en la unidad experimental

W_{1A} : Concentración de Urea a la entrada

B: Masa de Urea a adicionar

W_{1B} : Fracción mol de urea

C: Cantidad de suelo en kg

W_{1C} : Concentración de urea: 8.59×10^{-4}

Balance por componente:

$$Aw_{1A} + Bw_{1B} = Cw_{1C} ;$$

$$w_{1A} = 0, \quad w_{1B} = 1, \quad w_{1C} = 8.59 \times 10^{-4}$$

$$B = Cw_{1C}$$

$$B = (2.5)(8.59 \times 10^{-4}) = 2.148\text{g}$$

El cálculo para la cantidad de triple 17 que se adiciona a cada unidad experimental es igual al anterior, por lo que la masa de triple 17 es también 2.148 g por unidad experimental.



Figura 17. Contaminación del suelo

El petróleo que quedo sobre las paredes del recipiente fue lavado con 50 ml de hexano y adicionado al suelo contaminado.

El acondicionamiento del suelo se realizó con el peróxido de hidrógeno, como fuente de oxígeno aplicando en bajas cantidades por pulsos durante los primero ocho días del experimento hasta lograr lo requerido por los organismos para evitar la toxicidad y lograr la aclimatación como lo recomienda la bibliografía (Fiorenza *et al.*, 2002; Marquez *et al.*, 2002; Pardieck *et al.*, 1992).

Conforme se adicionaba el petróleo, la urea, el triple 17 y el peróxido de hidrógeno, se realizaba una mezcla homogénea del suelo tratado para después separarlo en cada unidad experimental. Este mismo procedimiento debe realizarse antes de aplicar las condiciones para el tratamiento con vermicomposta orgánica y el tratamiento con composta comercial.

2.9.2. Tratamiento con vermicomposta orgánica

La vermicomposta orgánica se añadió de acuerdo al porcentaje de ácidos fúlvicos encontrados en la composta comercial con la finalidad de igualar la cantidad de ácidos fúlvicos en ambas para el estudio de la degradación, conforme a la relación siguiente:

% Ácido fúlvico de la vermicomposta = 9.7412 (cuadro 16)

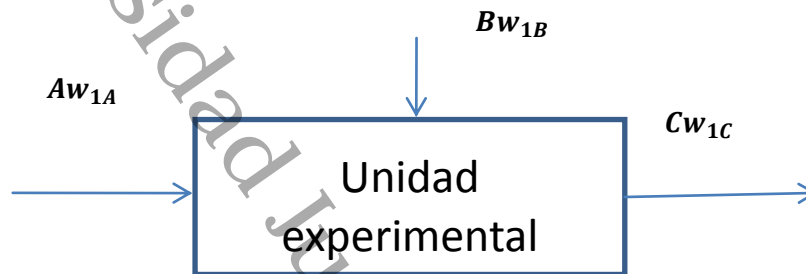
% Ácido fúlvico de sustancias húmicas comerciales = 20.2595 (cuadro 16)

Adición de sustancias húmicas comerciales = 11.34 kg por cada 1400 kg de suelo a tratar

Cálculo de la cantidad de sustancias húmicas comerciales:

La cantidad de sustancias húmicas comerciales se calculan mediante la aplicación de balances de masa:

La adición recomendada (ref) de sustancias húmicas es de 11.34 kg por cada 1400 kg de suelo en base seca, por tanto, su concentración es: $0.0081 \frac{\text{Kg de humatos}}{\text{Kg de suelo}}$, entonces:



Balance por componentes:

$$Aw_{1A} + Bw_{1B} = Cw_{1C} ;$$

Dónde:

A: Cantidad de suelo en la unidad experimental

W_{1A} : Concentración de sustancias húmicas a la entrada

B: Masa de sustancias húmicas a adicionar

W_{1B} : Fracción mol de sustancias húmicas

C: Cantidad de suelo en kg

W_{1C} : Concentración de sustancias húmicas: 0.0081

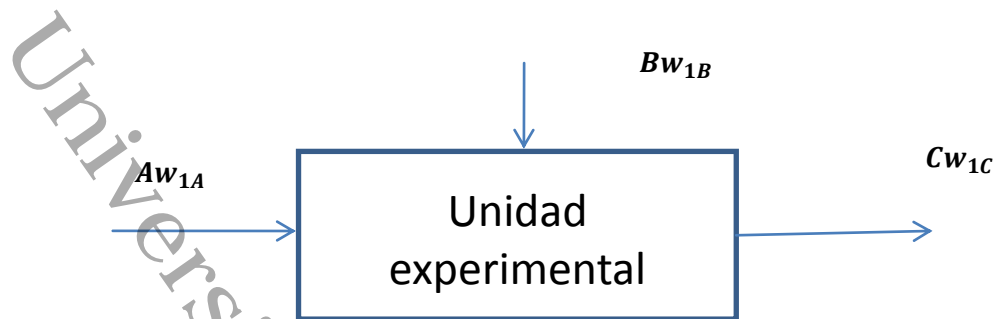
Teniendo:

$$w_{1A} = 0, \quad w_{1B} = 1$$

$$B = Cw_{1C}$$

$$B = (2.5)(0.0081) = 0.02025 \text{ Kg} = 20.25 \text{ g.}$$

La cantidad de ácidos fúlvicos adicionados con 20.25 g de humatos es $(20.25\text{g})(0.0202595) = 4.1025 \text{ g}$. Por lo tanto, la cantidad de vermicomposta que debe adicionarse a cada unidad experimental para garantizar 4.1025 g de ácidos fúlvicos es:



Balance por componentes:

$$Aw_{1A} + Bw_{1B} = Cw_{1C} ;$$

Dónde:

A: Cantidad de suelo en la unidad experimental

W_{1A} : Concentración de vermicomposta a la entrada

B: Masa de vermicomposta a adicionar

W_{1B} : Fracción mol de vermicomposta

C: Cantidad de suelo en kg

W_{1C} : Concentración de vermicomposta

Teniendo:

$$w_{1A} = 0, \quad Cw_{1C} = 4.1025 \text{ g}$$

$$B = \frac{Cw_{1C}}{w_{1B}} = \frac{4.1025}{0.097412}$$

B = 42.1159 g de vermicomposta en base seca

Cantidad real de vermicomposta orgánica con humedad de 27 %

$$\text{Humedad} = 100\% - 27\% = 73 \text{ (0.73)}$$

Teniendo una base de cálculo 100 g, una humedad de 73% y 42.1159 g de vermicomposta en base seca, se obtienen 57.69 g corresponden a 2.5 kg de suelo a tratar, por lo tanto para 45 kg (18 u.e. de 2.5 kg) se emplearon **1038.42 g de vermicomposta orgánica.**

2.9.3. Tratamiento con sustancias húmicas comerciales

Las sustancias húmicas comerciales que se utilizaron en este proyecto es un mineral derivado de fósiles vegetales que contiene compuestos orgánicos comunes en suelos ricos en humus. De acuerdo al tratamiento de suelos utilizando sustancias húmicas se recomienda que por cada 1400 kg de suelo a tratar se ocupen 11.34 kg de *humatos* para concentraciones de 15,000 ppm a 60, 000 ppm (Mosley *et al.*, 1999).

- Cálculo de la cantidad de *humatos*: de acuerdo a un balance de masas, tomando en cuenta la cantidad de suelo a tratar, se obtiene que la cantidad de *humatos*: 20.25 g

Cantidad real de composta comercial con humedad de 5 %

$$\text{Humedad} = 100\% - 5\% = 95\% (0.95)$$

Base de cálculo 100 g. Realizando un balance por componentes y tomando en cuenta la cantidad de *humatos* se tiene que: 21.31 g corresponden a cada 2.5 kg de suelo a tratar, por lo tanto para 45 kg (18 u.e. de 2.5 kg) se utilizaron **383.58 g de sustancias húmicas comerciales**. Cada unidad experimental tenía una concentración de 50 000 ppm de Hidrocarburos Totales del Petróleo (TPH), de acuerdo relación suelo/composta orgánica (VO), en realidad se utilizaron en total 100 g + 21.31 g, es decir: por cada 50 mg de TPH hay 1,021 g de suelo contaminado más la VO (0.04897 mg TPH/g de suelo) lo cual representa una disminución del 2.06%, por lo tanto no existe dilución de Hidrocarburos Totales del Petróleo en el suelo de estudio.



Figura 18. Adición de vermicomposta orgánica y humatos

2.10. Seguimiento del experimento en el laboratorio

El tiempo del experimento fue de 60 días, el seguimiento estuvo basado en la medición de pH, conductividad y temperatura cada tercer día, y en la determinación de humedad, hidrocarburos totales del petróleo y conteo de viables evaluado cada quince días. Cada tercer día se agregaban 300 ml aproximadamente de agua potable a cada unidad experimental con la finalidad de mantener húmedo el suelo en tratamiento para ello se colocaba la unidad experimental sobre un recipiente, al momento de agregarle el agua se aireó y homogenizó el contenido utilizando una espátula grande, el residuo que caía al momento de airear y homogeneizar se regresaba a la unidad experimental.

Para realizar los análisis correspondientes al seguimiento del experimento en laboratorio en la fecha indicada, se tomaron 100 g de muestra de cada unidad experimental una vez cumplido el período y se mantenía en refrigeración a 4 °C.

Datos y cálculos para la determinación de humedad

Peso de la caja con muestra húmeda – peso de la caja vacía = Suelo seco

$$87.5763 \text{ g} - 77.9761 \text{ g} = 9.6002 \text{ g}$$

$$\% = \frac{\text{Suelo Húmedo} - \text{Suelos Seco}}{\text{Suelo Húmedo}} \times 100 \Rightarrow \% = \frac{10 \text{ g} - 9.6002 \text{ g}}{10 \text{ g}} \times 100 = 3.998 \%$$

El análisis químico realizado fue la medición del pH por el método (AS-02) de la NOM-021-RECNAT-2000 (Anexo 6).

El análisis biológico se realizó con el método de recuento en placas de células viables por diluciones en serie.

Se utilizaron diluciones seriadas con base 10, las cuales consistieron en diluir 10 g de suelo en 90 ml de agua estéril, después con una pipeta estéril, se transfirió 1 ml de esta dilución a un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua estéril. A partir de este tubo se continuaron haciendo diluciones de hasta 10^{-6} . Por triplicado se colocaron las cajas de petri con su respectivo medio de cultivo, se agregó al centro de cada una de las cajas 0.1 ml de las diluciones obtenidas y se dispersó con una varilla de vidrio por toda la superficie

del medio de cultivo, las cuales para el caso de los hongos contenía Ampicilina para que estos crecieran libres de bacterias. Posteriormente, las cajas fueron invertidas y se colocaron en bolsas de plástico previamente esterilizadas con alcohol para incubarlas a 28 °C hasta que se desarrollaron las colonias. Para conocer las poblaciones microbianas se realizaron conteos a las 24 h de haber sembrado (bacterias degradadoras de hidrocarburos) y a las 48 h (hongos hidrocarbonoclastas). Los medios de cultivos utilizados fueron Agar Nutriente (AN) para bacterias y Agar Dextrosa y Papa (PDA) para hongos. Se efectuó la caracterización morfológica a nivel de colonia y el conteo de viables de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) expresada en la superficie de la caja, luego se transformó a UFC g⁻¹ de suelo seco.

2.11. Evaluaciones físico-químicas y biológicas en las unidades experimentales.

2.11.1. Medición de propiedades físicas: humedad y temperatura.

La conductividad eléctrica se midió, disolviendo 10 g de suelo en 20 ml de agua destilada, se agitó la mezcla durante 15 min y se dejó reposar durante un tiempo similar, midiendo la lectura del sobrenadante de la mezcla.

De cada muestra obtenida de las unidades experimentales se determinó el contenido de humedad en el suelo (Figura 19). Esta determinación se realizó usando el procedimiento empleado en la sección 2.10.



Figura 19. Medición de la humedad

La temperatura de cada unidad experimental se monitoreó con termómetros de -20 a 150 °C (Figura 20). Se insertó el termómetro al centro de la unidad experimental y se esperaban de 5 a 10 min en lo que se estabilizaba la temperatura para tomar la lectura. •



Figura 20. Medición de temperatura

2.11.2. Medición de las propiedades químicas: pH e Hidrocarburos Totales del Petróleo (Fracción pesada).

La determinación del pH del suelo se realizó a través del método (AS-02) de la NOM-021-RECNAT-2000, (Anexo 6), como se observa en la Figura 21.



Figura 21. Medición del pH del suelo

Los hidrocarburos totales del petróleo se determinaron por el método EPA 3540C Extracción Soxhlet (Anexo 9), tal como se muestra en la Figura 22.



Figura 22. Cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo por extracción Soxhlet EPA.3540

2.11.3. Medición de propiedades biológicas: conteo de células viables

Esta medición se realizó por el método de recuento en placas de células viables por diluciones en serie (Figura 23).

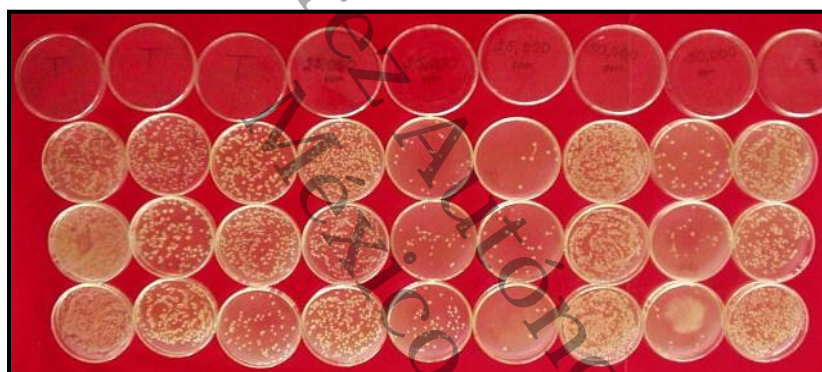


Figura 23. Cuantificación de microorganismos presentes en el suelo.

Capítulo III. Resultados y Discusión

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos durante el trabajo de investigación. Se utilizaron tres tipos de suelos, contaminados con petróleo a 50 000 ppm, el diseño del experimento fue de tipo factorial completamente al azar con 3 repeticiones y 18 tratamientos. El factor 1: 3 tipos de suelos (arcilloso, arcilloso-limoso y migajón-arenoso), factor 2: 3 tipos de condiciones (sin vermicomposta con microorganismo, vermicomposta orgánica con microorganismos y sustancias húmicas comerciales con microorganismos) y factor 3: 2 microorganismos (con microorganismos y sin microorganismos).

3.1 Caracterización de los suelos

Los suelos analizados en este estudio (Ver cuadro 8) son suelos minerales, debido a que contienen menos del 20% de materia orgánica y el contenido de carbono orgánico es menor al 11% (IUSS-ISRIC-FAO, 2007), este comportamiento puede ser debido a que las contribuciones del material orgánico están dados mayormente por los aportes de la biomasa aérea (Gaffney *et al.*, 1996). Los contenidos de nitrógeno en el suelo *Arcilloso* (0.4%), *Arcilloso-Limoso*(0.25%) y *Migajón-Arenoso* (0.11%) son considerados como muy alto, alto y medio respectivamente según la clasificación de DOF, (2001), estos contenidos de nitrógeno principalmente en el suelo 1 (suelo *Arcilloso*) y suelo 2 (*Arcilloso-Limoso*) indican que el suelo es fértil (Palma *et al.*, 2007) adecuado para el desarrollo de microorganismos ya que este elemento juega un papel importante e interviene decisivamente en una serie de transformaciones orgánicas que se desarrollan en el suelo (Bonilla *et al.*, 2000) con lo que respecta al S3 (Migajón-Arenoso) la baja cantidad de nitrógeno total presente puede limitar el crecimiento de consorcios bacterianos (Canals, 2005). En cuanto al contenido del fósforo suelo 1, suelo 2 y suelo 3 se encontraron dentro de clase alta con 25.31 ppm, 35.32 ppm y 23.08 correspondientemente (DOF, 2001) lo anterior indica que existe un historial de fertilización importante, lo cual ha permitido que exista un suministro en la clase mencionada (Córdova, 2009).

Los suelos 1, suelo 2 y suelo 3 presentaron considerables contenidos de nitrógeno, fósforo y potasio además, los cuales son necesarios para que los microorganismos sintetizen sus principales biomoléculas, degraden moléculas integradas por carbono, hidrógeno y oxígeno y obtengan energía (Prescott, 2004, Ercoli *et al.*, 2000, Walton *et al.*, 1994) pudiendo influir en la degradación de petróleo crudo.

Cuadro 8.- Características principales de los suelos muestreados en base a los valores de los parámetros de caracterización.

Tipo de Análisis	Determinación		Arcilloso (S1)	Arcilloso-Limoso (S2)	Migajón-Arenoso (S3)
Físicos	Textura	Arcilla (% masa)	77	49	13
		Limo (%masa)	16	41	3
		Arena (% masa)	7	10	84
		Clasificación	Arcilloso	Arcilloso-limoso	Migajón-arenoso
	Densidad aparente (g/cm ³)		1.0173	1.0561	1.1023
	Densidad real (g/cm ³)		1.0325	1.0561	1.3087
	Humedad (% masa)		23.894	23.546	7.476
	Temperatura		32	30	30
Químicos	pH		7	6.5	6
	Carbono orgánico (%)		5.15	2.43	1.58
	Materia orgánica (%)		8.88	4.19	2.72
	Ácidos húmicos (%)		0.00377	0.001814	0.001989
	Ácidos fúlvicos (%)		2.9056	1.7142	1.1914
	Carbono del extracto (%)		2.9094	1.7160	1.1934
	Fósforo (mg kg ⁻¹)		25.31	35.32	23.08
	Nitrógeno (%)		0.40	0.25	0.11
	Magnesio (cmol kg ⁻¹)		11.68	8.22	0.41
	Calcio (cmol kg ⁻¹)		19.8	22.6	1.7
Biológico	Conteo de células viables (UFC g ⁻¹ de suelo)		7x10 ⁺⁴	104x10 ⁺⁴	6.5x10 ⁺⁴

3.2 Medición de pH del suelo

El pH del suelo puede afectar significativamente la actividad microbiana. El crecimiento de muchos microorganismos normalmente es máximo dentro de un intervalo de pH entre 6 y 7, (Eweis *et al.*, 1998). Su determinación es afectada por varios factores tales como: el

tipo y cantidad de constituyentes orgánicos e inorgánicos que contribuyen a la acidez del suelo (Madigan et al., 2003).

Los resultados obtenidos en la variación de pH en los tratamientos fueron: suelo *Arcilloso* (suelo 1) con 6.27 ± 0.1385 (cuadro 20), con respecto al suelo *Arcilloso-Limoso* (suelo 2) la variación reportada es de: 6.71 ± 0.102 (Cuadro 26), de igual manera el suelo *Migajón-Arenoso* (suelo 3) fue de 6.51 ± 0.128 (Cuadro 32). Al respecto Dragun, (1998); Von Fahnstock *et al.*, (1998) y Madigan *et al.*, (2003) mencionan que el intervalo de pH recomendado para que se lleve a cabo una buena degradación de hidrocarburos en suelos se encuentra entre 5 y 9, con un óptimo en 7.

Particularmente el pH del testigo (S2SVSM) del tratamiento que presentó la mayor degradación de petróleo inicialmente fue de 7.3 (Cuadro 26), es decir, neutro, sin embargo con la adición de la vermicomposta y microorganismos S2VOCM, el monitoreo arrojó resultados de una variación de 6.3 a 7.9 (Cuadro 26) durante los 60 días de tratamiento, posiblemente se debió a que existen microorganismos que producen ureasas, con la cual desdoblan la urea presente en el nutriente, obteniendo hidróxido de amonio dando como resultado la alcalinización del medio (Prescott, 2004), además Benavides y Hermida, (2008) y Alexander, (1994), en sus estudios reportan que en las bacterias del suelo, el crecimiento óptimo se presenta en un intervalo de pH de 6 a 8.

3.3 Medición de la temperatura

Durante el tiempo en que duró el experimento para la degradación de petróleo los resultados registrados de temperatura en los tratamientos fueron: suelo 1 con $28.46^{\circ}\text{C} \pm 0.375$ (Cuadro 21), con respecto al suelo 2 el rango reportado es de: $28.23^{\circ}\text{C} \pm 0.5263$ (Cuadro 27), de igual manera el suelo S3 fue de $28.33^{\circ}\text{C} \pm 0.3452$ (Cuadro 33). Del monitoreo de la temperatura del suelo se obtuvo que ésta se mantuvo en un intervalo de 26.83 hasta 30.5°C (Figura 20), el ligero aumento de la temperatura en el suelo 1 se atribuye a la presencia de arcilla presente en el tipo de suelo. La cantidad de calor absorbida puede variar en cada tipo de suelo y el tamaño de partícula, los tratamientos con suelo arcilloso (suelo1) tienden a absorber más calor que los tratamientos con suelos arenosos (suelo 3), por lo que la actividad microbiana es mejor, en tanto, los suelos arenosos reflejan más la luz, por lo que tienen menor temperatura (Escadafal *et al.*, 1989) provocando una menor actividad microbiana, la cual se ve

reflejada en una menor degradación de petróleo crudo. De acuerdo a la bibliografía, este intervalo es óptimo en el que la mayoría de los microorganismos crecen (Eweis *et al.*, 1998). Generalmente, las bacterias clasificadas como mesófilas crecen desde los 15 hasta cerca de los 45 °C teniendo un intervalo de crecimiento óptimo entre 25 y 35 °C (Madigan *et al.*, 2003).

3.4 Adición de vermicomposta

La mejor vermicomposta fue la vermicomposta orgánica, presente en el tratamiento S2VOCM, con la cual se obtuvo la mayor remoción (84.54%) de HTP. Se encontró que la vermicomposta orgánica posee 0.01 % de ácidos húmicos, 9.81% de ácidos fúlvicos y 9.82% de carbono orgánico (Cuadro 15). Según López, (2006) los altos contenidos de los parámetros antes mencionados ayudan a mejorar la estructura del suelo, a retener la humedad y los nutrimentos aumentando la actividad de los microorganismos en la biodegradación del hidrocarburo.

3.5 Determinación de humedad

Resultados obtenidos en otras investigaciones (Fernández, *et al.*, 2009, Vallejo *et al.*, 2005) evidencian que el comportamiento en la variación de humedad en los tratamientos fue óptimo, los cuales fueron: suelo 1 con 84.25 ± 0.9643 (Cuadro 19), con respecto al suelo 2 la variación reportada es de: 69.41 ± 1.5363 (Cuadro 25), de igual manera el suelo S3 fue de 74.41 ± 1.948 (Cuadro 31). Se sabe que la humedad tiene gran influencia en la actividad microbiana. El agua es el mayor componente del protoplasma bacteriano y su suministro es esencial para el crecimiento y mantenimiento de los microorganismos (Madigan *et al.*, 2003). La humedad en el tratamiento S2VOCM (mejor tratamiento) no fue un parámetro que se controló cuantitativamente si no que se reguló de manera cualitativa de acuerdo a las necesidades del suelo, la cual se mantuvo en un rango de 60-73% de la capacidad de campo durante todo el experimento (Cuadro 25). Ya que la humedad es una variable importante que favorece la degradación de contaminantes orgánicos por los microorganismos, por lo cual es importante controlarla. Aunque Trinidad *et al.*, (1999) mencionan que la acumulación de agua en el suelo no debe ser menor del 50% de capacidad de campo, en esta investigación se encontró que para un suelo arcilloso limoso acondicionado con composta orgánica, la humedad deberá ser cerca del 70% de la capacidad de campo.

3.6 Determinación de la conductividad eléctrica (c.e.)

Los resultados obtenidos del comportamiento de conductividad eléctrica en los tratamientos fueron: suelo 1 con 0.6775 ± 0.049 (Cuadro 22), con respecto suelo 2, la variación reportada es de: 0.921 ± 0.07 (Cuadro 28), de igual manera S3 fue de 0.62 ± 0.073 (Cuadro 34).

La salinidad del suelo se estimó mediante la conductividad eléctrica del sustrato de saturación del suelo, durante los 60 días monitoreados. Como la conductividad eléctrica fue < 1.0 , dSm^{-1} , y la clasificación de estos suelos de acuerdo con el DOF, (2001), se considera como de "efectos despreciables de salinidad", por lo tanto se considera que el crecimiento microbiano no fue afectado por efectos de salinidad.

3.7 Determinación de la fracción pesada de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP)

En las figuras 24, 25 y 26 se muestran la degradación de HTP presentes en el suelo Arcilloso (suelo 1), *Arcilloso-limoso*, (suelo 2), y *Migajón arenoso* (suelo 3), sin vermicomposta con microorganismos (SVCM), con vermicomposta orgánica con microorganismos (VOCM) y con composta comercial con microorganismos (CCCM), contaminados a 50000 ppm.

Las cantidades degradadas a los 60 días (figura 24) en suelo 1 presentaron diferencias significativas ($r^2=0.98, \alpha \leq 0.05$), en VOCM y CCCM con respecto a SVCM, expresando 20 632.1, 21 062.3 y 31 434.4 ppm, en el orden que se presentan, es decir, un porcentaje de remoción del 58.74%, 57.88% y 37.14% respectivamente.

De igual forma el análisis de varianza en suelo 2 a los 60 días (figura 25) muestra diferencias significativas ($r^2=0.99, \alpha \leq 0.05$), en VOCM con respecto a CCCM y SVCM manifestando 7 734.1, 9 080.3 y 33 732.3 ppm, en el orden que se presenta, es decir, con un porcentaje de remoción del 84.54, 81.84 y 32.54 % respectivamente.

Por su parte en S3 a los 60 días, los resultados evidenciaron diferencias significativas ($r^2=0.99, \alpha \leq 0.05$) en VOCM y CCCM con respecto a SVCM: 11 286.4, 12 268.8 y 29 398.8 ppm correspondientemente con un porcentaje de degradación de 77.43%, 75.47% y 41.21% respectivamente, (Figura 26).

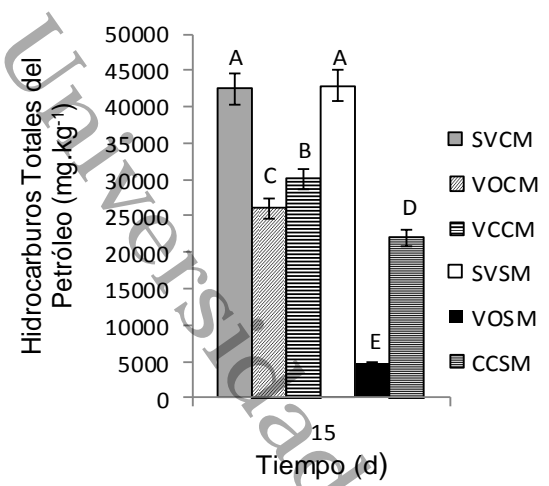


Fig.24a) Evaluación de tratamientos a los 15 días

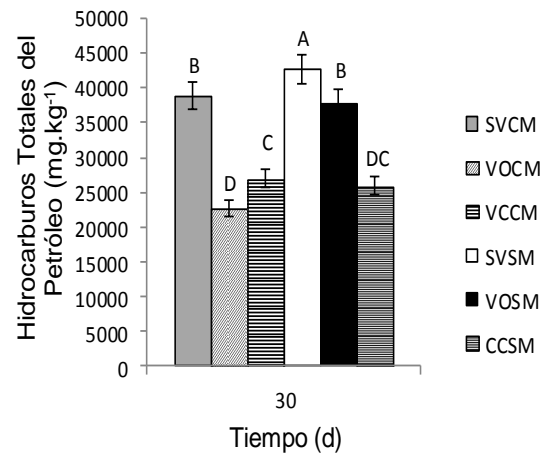


Fig. 24b) Evaluación de tratamientos a los 30 días

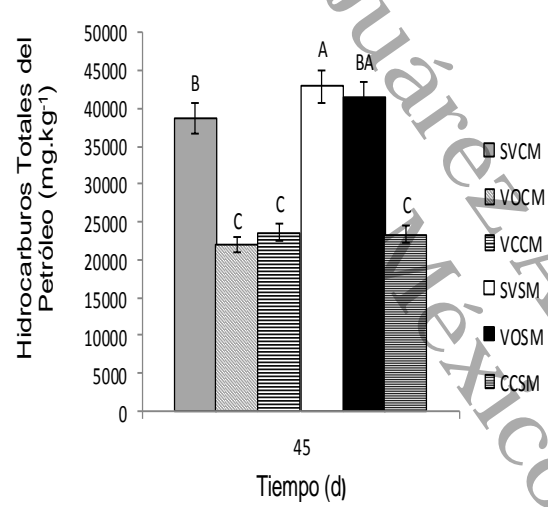


Fig. 24c) Evaluación de tratamientos a los 45 días

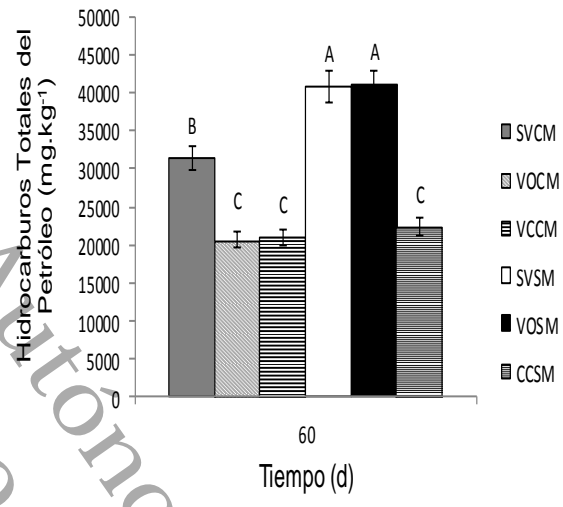


Fig. 24d) Evaluación de tratamientos a los 60 días

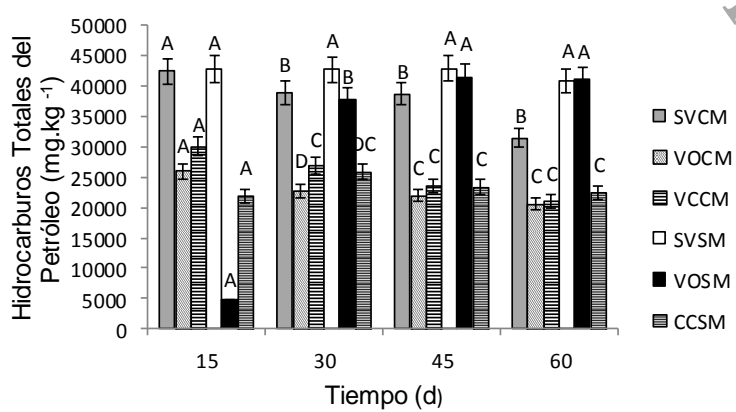


Fig.24. Hidrocarburos Totales del Petróleo en el suelo Arcilloso durante 60 días. (Medias con letras comunes en barras no difieren significativamente $\alpha \leq 0.05$)

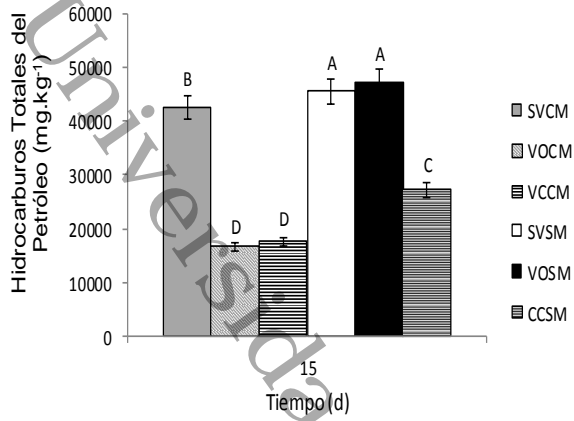


Fig. 25a) Evaluación de tratamientos a los 15 días

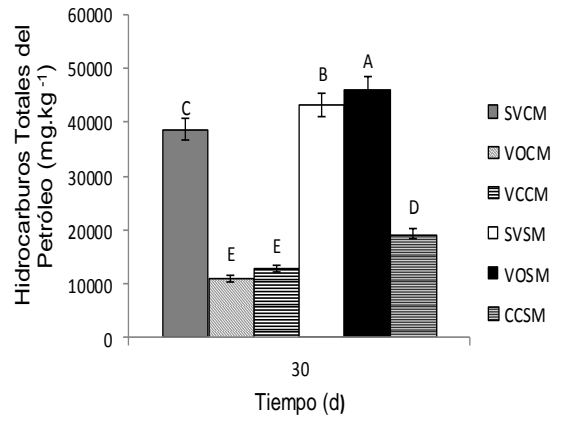


Fig. 25b) Evaluación de tratamientos a los 30 días

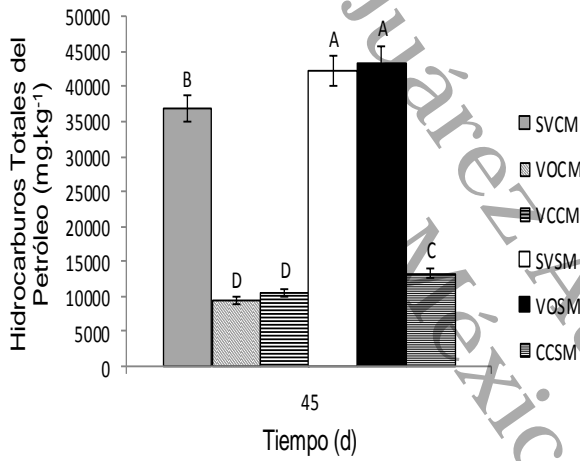


Fig. 25c) Evaluación de tratamientos a los 45 días

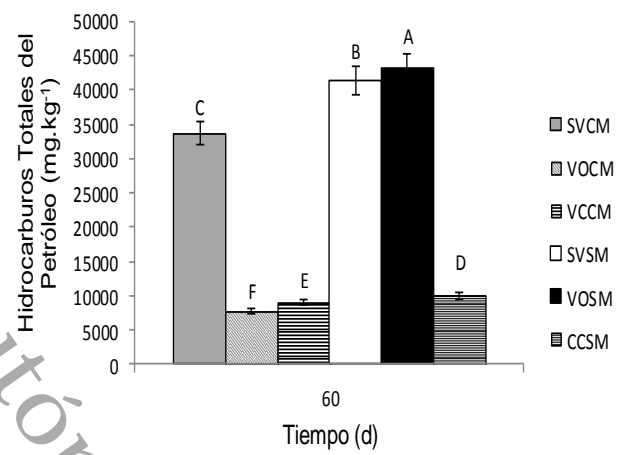


Fig. 25d) Evaluación de tratamientos a los 60 días

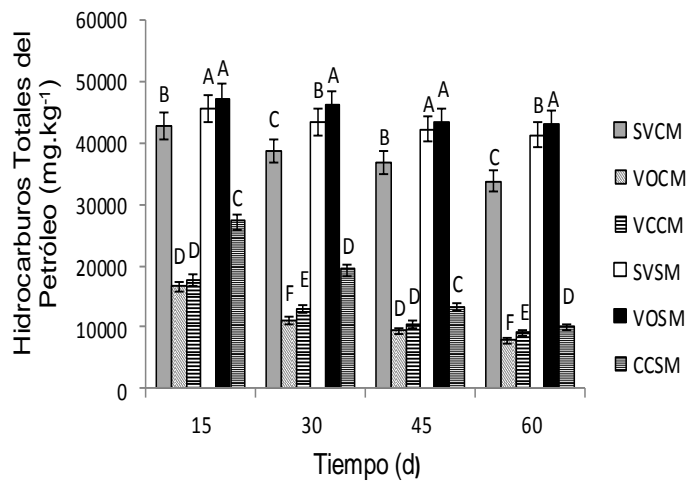


Fig. 25 Hidrocarburos Totales del Petróleo en el suelo Arcilloso- Limoso durante 60 días. (Medias con letras comunes en barras no difieren significativamente $\alpha \leq 0.05$)

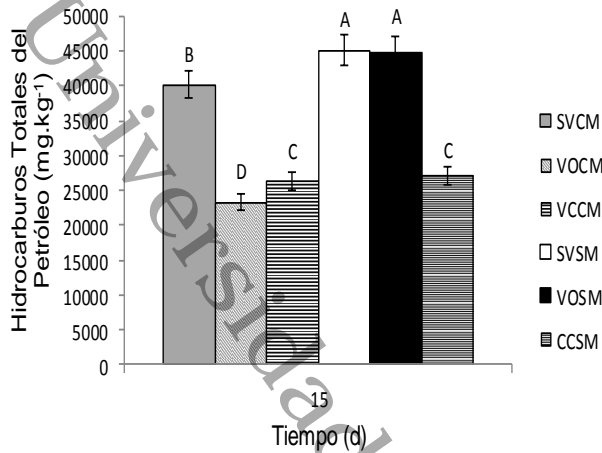


Fig. 26a) Evaluación de tratamientos a los 15 días

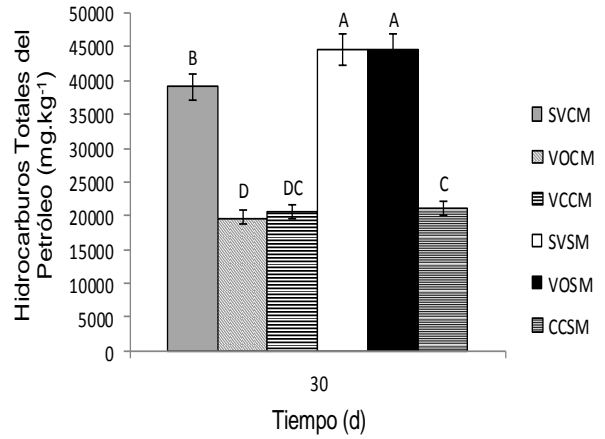


Fig. 26b) Evaluación de tratamientos a los 30 días

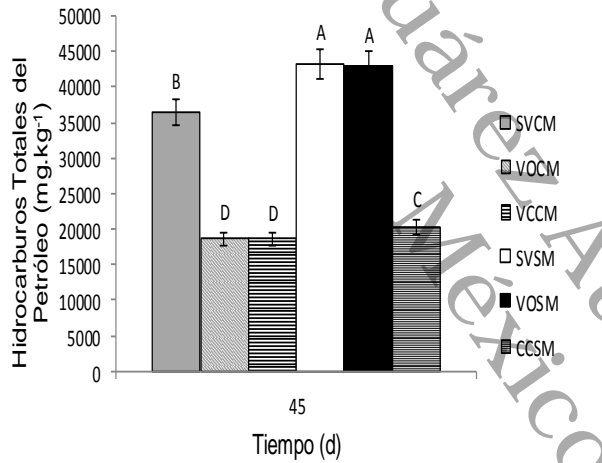


Fig. 26c) Evaluación de tratamientos a los 45 días

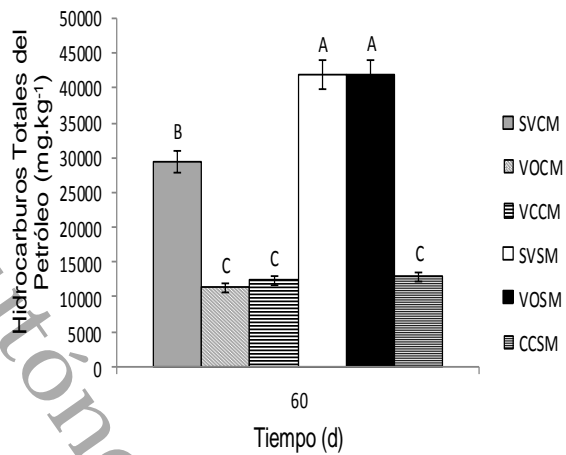


Fig. 26d) Evaluación de tratamientos a los 60 días

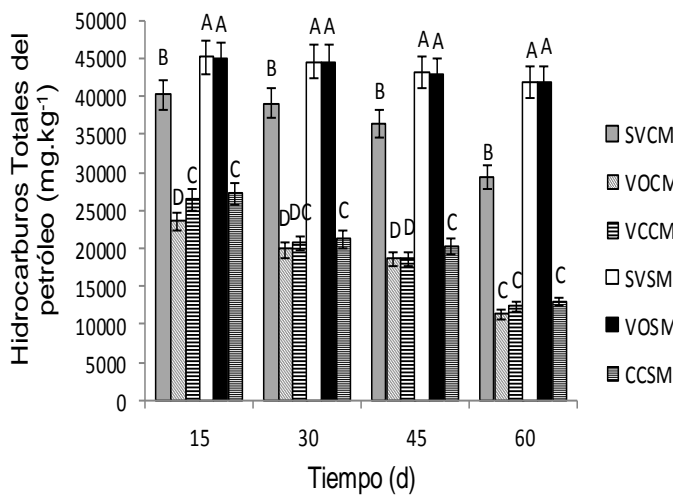


Fig. 26 Hidrocarburos Totales del Petróleo en el suelo Migajón-Arenoso durante los 60 días. (Medias con letras comunes en barras no difieren significativamente $\alpha \leq 0.05$)

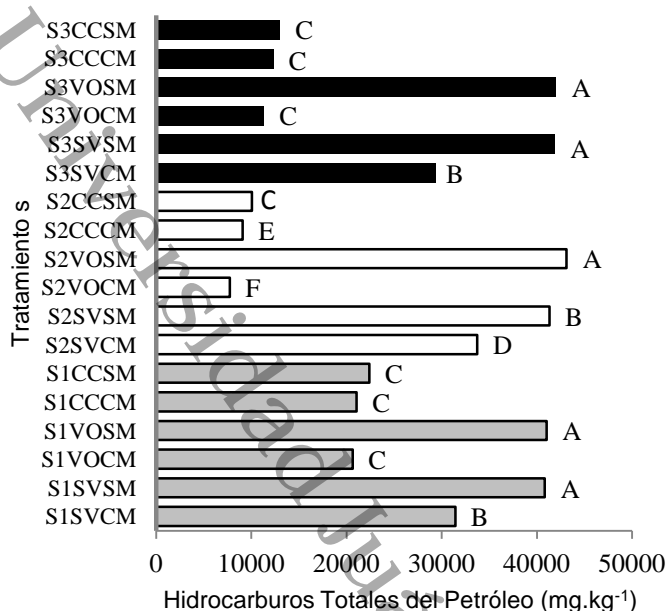


Figura 27. Comparación de la degradación en los tres tipos de suelo a los 60 días. (Medias con letras comunes en barras no difieren significativamente $\alpha \leq 0.05$).

El uso de la biorremediación en suelos impactados con petróleo crudo es un proceso multifactorial, donde intervienen procesos químicos, físicos, fisicoquímicos y biológicos de los constituyentes del suelo.

El tratamiento S2VOCM de suelo *Arcilloso-limoso* con vermicomposta orgánica con microorganismos obtuvo la mayor degradación de petróleo crudo (84.54%), y el mayor crecimiento poblacional (900×10^4 UFC/g), esto se puede atribuir a que la vermicomposta orgánica actuó como agente bioestimulante de los microorganismos, ya que la composición del suelo es: 49 % arcilla, 41% limo y 10% arena (Cuadro 8) lo que pudo permitir una adecuada aireación por la presencia de arena, y materia orgánica presente en el suelo (4.19%) contenido que según Diario Oficial de la Federación (2001) está clasificado como alto. Con estas condiciones los microorganismos pueden desarrollarse mejor (Rivera, 2001, Córdova *et al.*, 2009).

La adición de humatos provenientes de vermicomposta orgánica repercute en la degradación de petróleo debido a la estimulación que éstos proporcionan al crecimiento microbiano, ya que mejora la estructura del suelo (López *et al.*, 2005), sin embargo los tratamientos con *humatos* de lignita presentaron una degradación muy cercana a los tratamientos con vermicomposta, al respecto Franco y Bañón, (1990) mencionan que en

general los humatos aumentan la capacidad de retención de agua mejorando también las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, activando de esta manera la flora microbiana, la cual influye en la degradación de petróleo (Vaughan y Ord, 1985).

El tratamiento S1VOCM obtuvo una degradación del 5.15 % y 7.41% mayor que el tratamiento S1CCCM. El tratamiento S2VOCM degradó el 4.9 % más que el tratamiento S2CCCM. Así mismo el tratamiento S3VOCM degradó el 2.66% más que el tratamiento S3CCCM.

Los tratamientos que tuvieron composta enriquecida con humatos provenientes de lignita, tuvieron diferentes porcentajes de degradación de petróleo dependiendo del suelo: el tratamiento S2CCCM tuvo una remoción de 7.79% mayor que el tratamiento S3CCCM y 26.47% más alta que el tratamiento S1CCCM, sin embargo la degradación en estos tratamientos estuvieron por debajo de los que tuvieron vermicomposta orgánica. Al respecto Franco y Bañón (1998) comentan que el *humus* se considera como un material heterogéneo constituido por un conjunto de sustancias altamente polimerizadas, de alto peso molecular, de estructura compleja y con virtual ausencia de proteínas y mucopolisacáridos, debido al proceso de carbonificación; por lo tanto son menos biodisponibles que los humatos provenientes de vermicomposta.

La adición de humatos provenientes de vermicomposta y composta comercial tuvieron su mayor degradación en el suelo *Arcilloso-limoso*, sin embargo el tratamiento VOCM tuvo 4.9% mayor degradación que el tratamiento CCCM.

En general los tratamientos con vermicomposta orgánica con microorganismos (VOCM), presentaron mejor tasa de degradación de petróleo siendo mayor en S2 con 84.54%, seguida de S3 con 77.43% y la menor remoción se presentó en S1, con 58.74%.

La menor degradación de petróleo en suelo 1 puede atribuirse a los altos contenidos de arcillas presentes en el suelo, las que tienen un papel relevante en los procesos de degradación de materia orgánica, debido a su tamaño, superficie específica y capacidad de intercambio iónico, siendo por ello consideradas como la fracción mineral activa del suelo (Morales *et al.*, 2009). Al respecto, (Soil Survey Staff, 2006; Porta *et al.*, 2003) reporta que en un suelo con alto contenido de arcillas (>30%), provocó una deficiencia en drenaje debido a la textura pesada del perfil (Palma *et al.*, 2007) creando condiciones

anaeróbicas no favorables para los microorganismos degradadores de petróleo (Rivera, 2001, Bernal et al., 2003 y González et al., 2007).

Los tratamientos con vermicomposta y con microorganismos favorecieron significativamente la degradación de hidrocarburos en comparación con los tratamientos con vermicomposta sin microorganismos (Figura 24). Este comportamiento singular puede deberse a que la vermicomposta es rica en nutrientes que estimulan el crecimiento microbiano y por ende el aumento de la tasa de degradación de hidrocarburos. En relación con esto, Morales *et al.*, (2009) demuestra que la adición solamente de vermicomposta no favorece la biodegradación de hidrocarburos en un suelo arcilloso.

3.8 Medición de las propiedades biológicas: conteo de células viables

3.8.1 Población de bacterias en Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

En las figuras 28, 29 y 30 se presentan las poblaciones microbianas presentes en los Suelos: suelo 1 (*Arcilloso*), suelo 2 (*Arcilloso-Limoso*) y suelo 3 (*Migajón-Arenoso*), con diferentes agentes estimulantes, sin vermicomposta con microorganismos (SVCM), con vermicomposta orgánica con microorganismos (VOCM) y con sustancias húmicas comerciales (lignita) con microorganismos (CCCM), contaminados con petróleo crudo a 50 000 ppm.

En las figuras 28, 29 y 30, se muestra el crecimiento poblacional de los tratamientos SVSM, VOSM, CCSM SVCM, VOSM y CCCM, a los 15, 30, 45 y 60 días en los tres tipos de suelos estudiados.

En la figura 28, se puede observar que en suelo 1, el mayor crecimiento poblacional se presentó a los 30 días ($r^2= 0.92$, $\alpha\leq 0.05$). Aunque no existen diferencias significativas entre VOSM, VOSM, CCCM, la media poblacional evidencia que el primero tuvo el desarrollo máximo, con 95×10^4 UFC/g. Además en la figura 29 se muestra que en suelo 2 la prueba de medias manifiesta diferencias significativas a los 45 días ($r^2= 0.96$, $\alpha\leq 0.05$) entre VOSM, SVCM y CCCM presentando la mayor población VOSM con 977×10^4 UFC/g de suelo. Por otra parte para el S3, (figura 30) se muestran diferencias significativas a 60 días ($r^2= 0.73$, $\alpha\leq 0.05$) en VOSM con respecto a VOSM y CCCM, existiendo un mayor crecimiento poblacional en VOSM de 740×10^4 UFC/g.

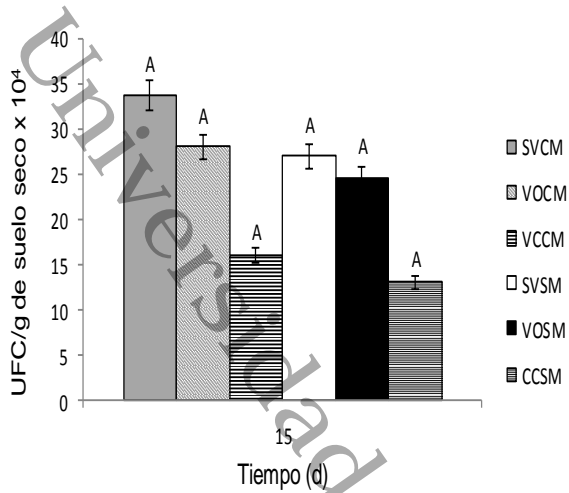


Fig. 28a) Evaluación de tratamientos a los 15 días

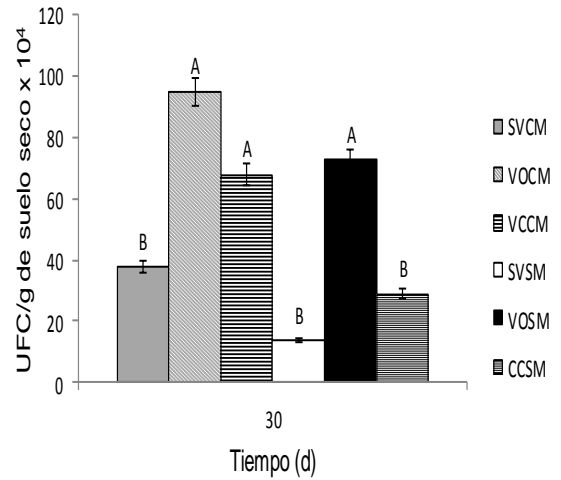


Fig. 28b) Evaluación de tratamientos a los 30 días

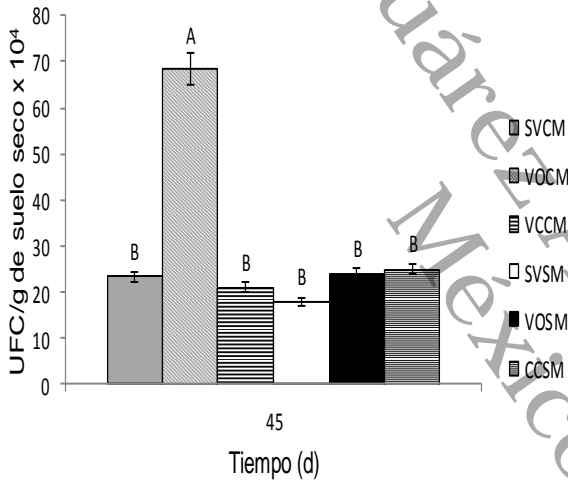


Fig. 28c) Evaluación de tratamientos a los 45 días

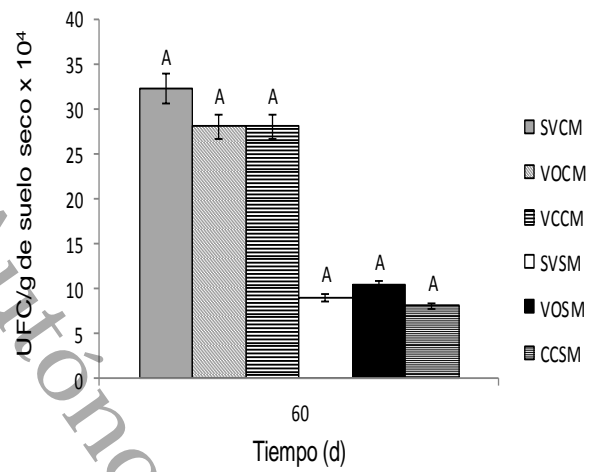


Fig. 28d) Evaluación de tratamientos a los 60 días

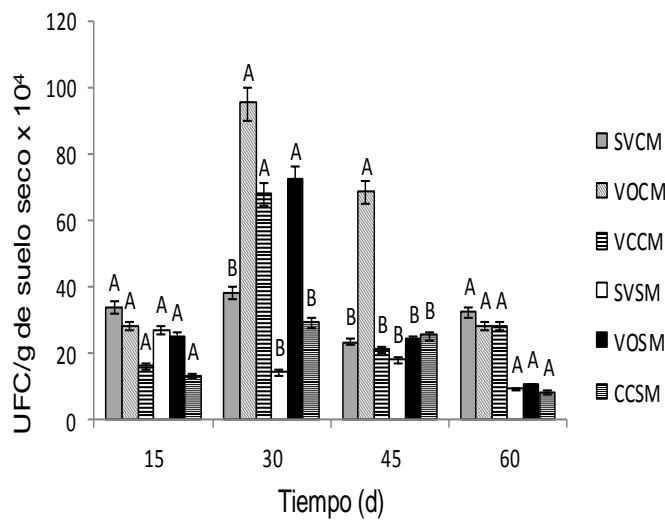


Fig. 28 Unidades Formadoras de Colonias en el suelo Arcilloso durante 60 días. (Medias con letras comunes en barras no difieren significativamente $\alpha \leq 0,05$)

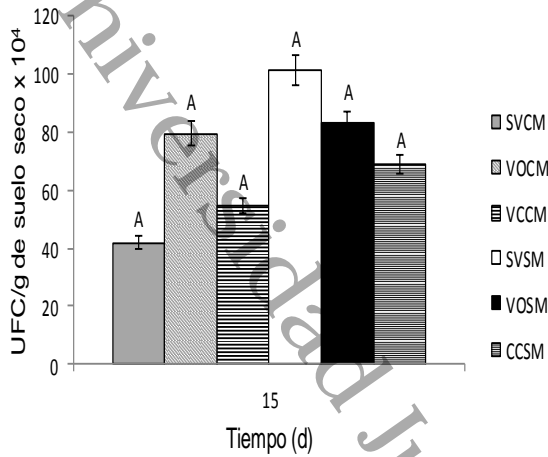


Fig. 29a) Evaluación de tratamientos a los 15 días



Fig. 29b) Evaluación de tratamientos a los 30 días

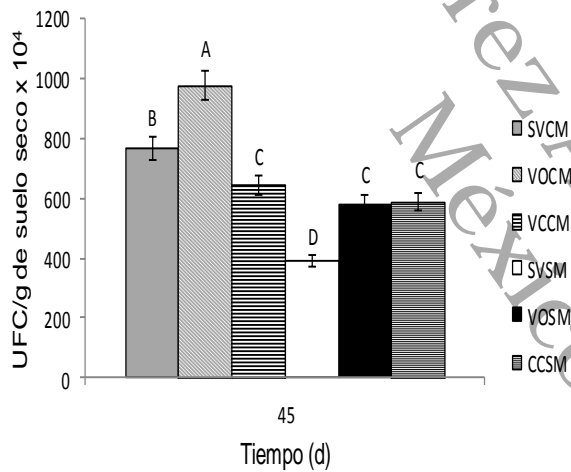


Fig. 29c) Evaluación de tratamientos a los 45 días

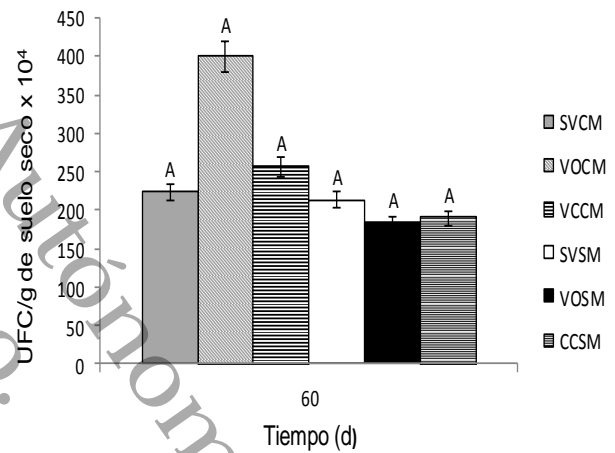


Fig. 29d) Evaluación de tratamientos a los 60 días

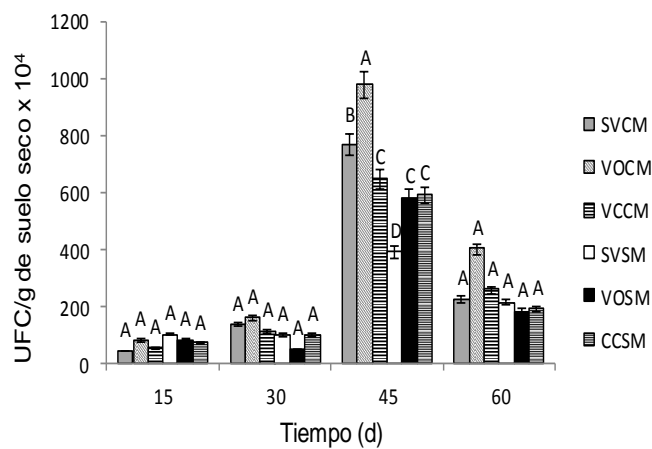


Fig. 29 Unidades Formadoras de Colonias en el suelo Arcilloso-Limoso durante 60 días. (Medias con letras comunes en barras no difieren significativamente $\alpha \leq 0.05$)

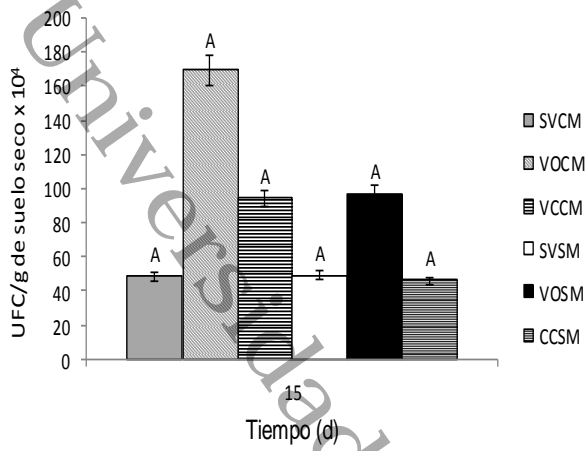


Fig. 30a) Evaluación de tratamientos a los 15 días

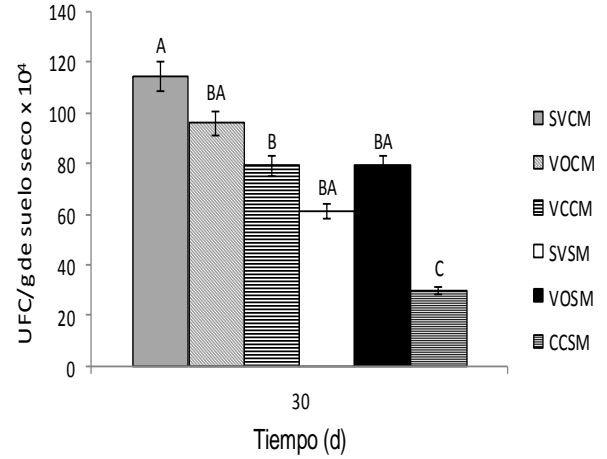


Fig. 30b) Evaluación de tratamientos a los 30 días

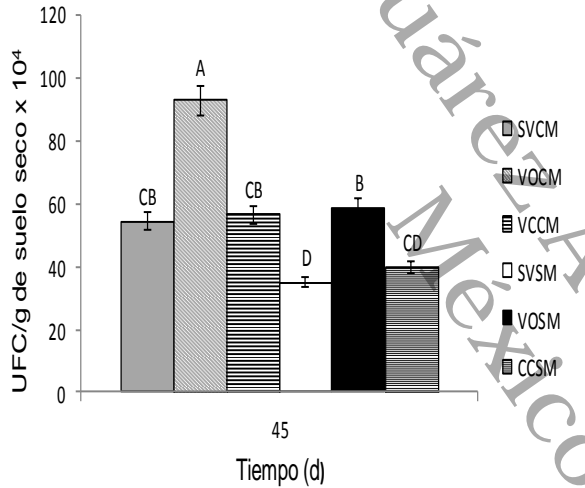


Fig. 30c) Evaluación de tratamientos a los 45 días

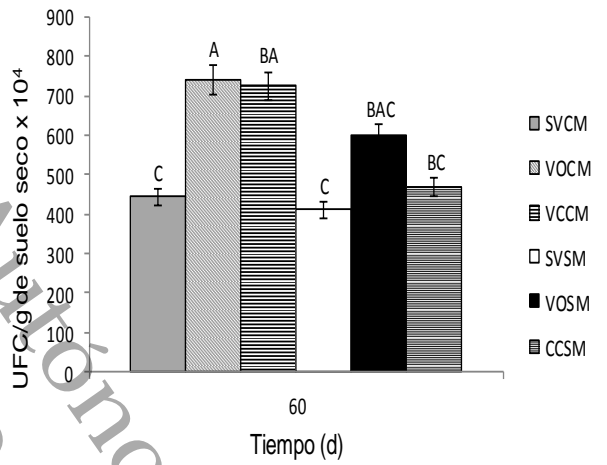


Fig. 30d) Evaluación de tratamientos a los 60 días

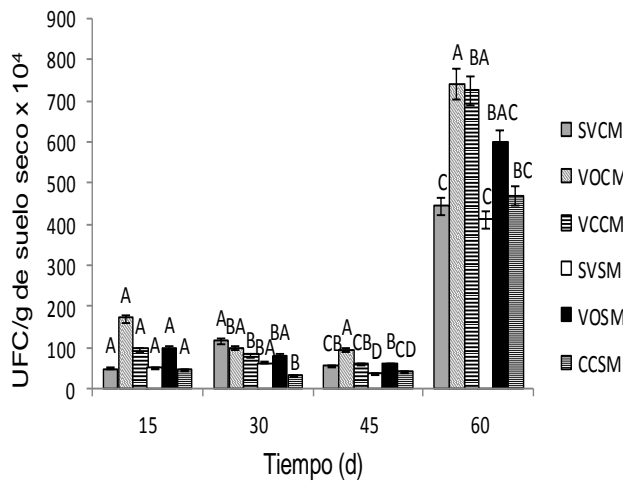


Fig. 30 Unidades Formadoras de Colonias en el suelo Migajón-Arenoso durante 60 días. (Medias con letras comunes en barras no difieren significativamente $\alpha \leq 0.05$)

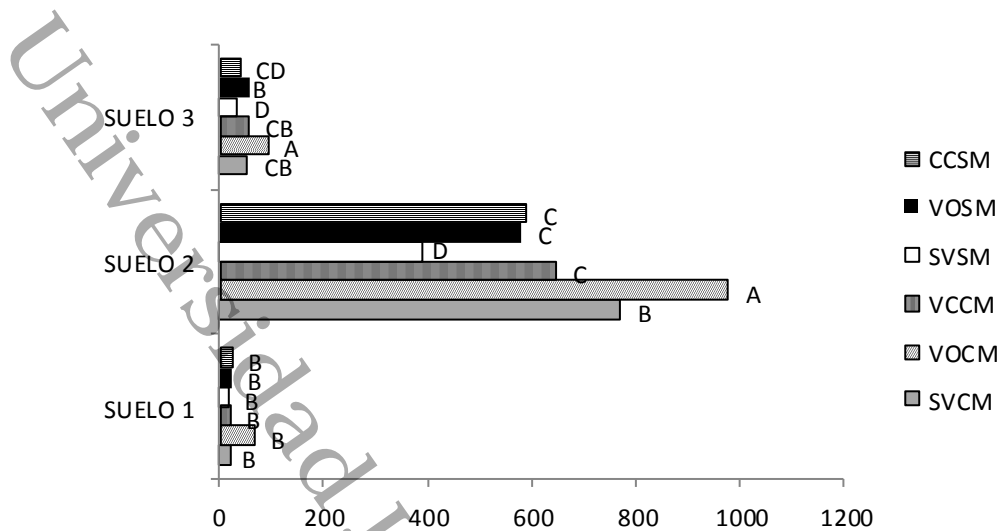


Fig 31. Comparación del crecimiento de UFC/gramo de suelo seco $\times 10^4$ en los tres tipos de suelo a los 45 días. (Medias con letras comunes en barras no difieren significativamente $\alpha \leq 0.05$).

El mejor resultado se obtuvo a los 45 días (d), donde el máximo crecimiento microbiano fue en S2VOVM con 98×10^5 UFC/gramo de suelo seco.

En el suelo 2 el mejor tratamiento correspondió a S2VOVM, con 21.16% y 33.75% mayor que S2SVCM y S2CCCM respectivamente, aunado a esto S2VOVM también presentó un 93% y 90.5% de crecimiento poblacional mayor que S1VOVM y S3VOVM correspondientemente (tratamiento con composta orgánica pero diferentes suelos). Esta investigación evidencia que los tratamientos con vermicomposta orgánica fueron mejores que los que contenían composta de lignita.

Los ácidos húmicos de tipo Leonardita sufren cambios durante su transformación ya que comprenden un incremento en el estado de oxidación, así como pérdidas de carbohidratos, proteínas y otros compuestos bioquímicos por lo que pueden resultar no atractivos para su biodegradación (Madigan *et al.*, 2003). La ausencia de polisacáridos en las sustancias húmicas comerciales procedentes de formas fósiles del *humus* impactan negativamente en el crecimiento poblacional debido a su baja biodisponibilidad.

En general el tratamiento S2VOVM alcanzó el máximo crecimiento poblacional de todos los tratamientos. El suelo *Arcilloso-Limoso* es fértil, de uso agrícola, con una buena saturación de agua, no presenta propiedades sálicas, poseen buena permeabilidad, con buenos nutrimentos y materia orgánica (Palma, 2007), pudiéndose considerar que

también poseen buena actividad biológica. Por lo anterior se deriva que el suelo 2 con VOVM y SVVM presenten el mejor crecimiento poblacional, ya que los microorganismos cuentan con los nutrientes necesarios para su reproducción (Rivera, 2001).

El tratamiento S2CCVM tuvo un crecimiento poblacional 65×10^5 UFC/g de suelo seco, es decir, solo el 33.78% menor que el tratamiento S2VOVM. Los tratamientos con ácidos húmicos provenientes de lignita estuvieron en franca competencia con los tratamientos con vermicomposta orgánica. Al respecto Franco y Bañón (1990) mencionan que los ácidos húmicos provenientes de vermicomposta mejoran la estructura del suelo, aumentando su capacidad de retención del agua, además de activar la flora microbiana. El *humus* de lignita, está formado por polisacáridos y péptidos, constituido principalmente por carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno, formado como polisacáridos y péptidos. El suelo tratado con humus incrementa el contenido de oxígeno. La acidez total y el contenido de -COOH de los ácidos fúlvicos (AF) es apreciablemente mayor que para los ácidos húmicos (AH). Las sustancias húmicas contienen un 30-50% de materiales hidrolizables, en su mayor parte por azúcares y algunos aminoácidos peptídicos y estructuras proteicas. El esqueleto principal es no hidrolizable en un 50%, aromático, compuesto por anillos simples, muchos de los cuales poseen grupos hidroxilo y metoxilo, así como sustituyentes carboxilo y alifáticos. Se acepta que el efecto de las sustancias húmicas son el resultado de diversos factores, como la capacidad de proveer y reservar nutrientes, aportar N, P y S, como resultado de la actividad microbiana (Madigan *et al.*, 2003).

En esta investigación la composta proveniente de lignita tuvo 0.0205% de AH y 20.26% de AF (Ver cuadro 16), es decir, una mayor cantidad de Ácidos Fúlvicos. Los AF poseen una relación C/H más baja, lo que indica su menor carácter aromático y en consecuencia, su naturaleza alifática predominante, por lo tanto son más biodisponibles (Subba N., 2001), datos que concuerdan con los resultados de esta investigación ya que el tratamiento S2VOVM acondicionado con una vermicomposta con 9.8179% de AF, obtuvo la mejor tasa de degradación (84.54%).

Análisis de predicción

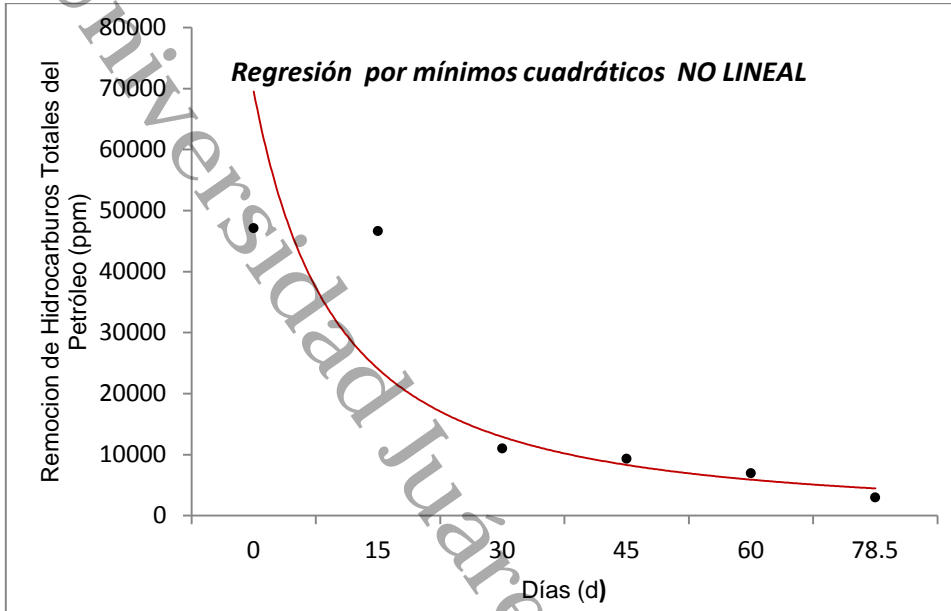


Fig 32. Análisis de predicción

El comportamiento de los datos es de acuerdo al cuadro del anexo 10, los cuales son representados gráficamente en la figura 25, en la cual se observa un comportamiento exponencial. Se usó la regresión exponencial (Nakamura, 1997) con la ecuación $Y=10(a+bx)$

$$a = \frac{(\sum_{i=1}^n \log Y)(\sum_{i=1}^n X^2) - (\sum_{i=1}^n X)(\sum_{i=1}^n X \log Y)}{n(\sum_{i=1}^n X^2) - (\sum_{i=1}^n X)^2}$$

$$a = \frac{(21.19)(6750) - (150)(600.58)}{5(6750) - (22500)} = 4.711360676$$

$$b = \frac{n(\sum_{i=1}^n X \log Y) - (\sum_{i=1}^n X)(\sum_{i=1}^n \log Y)}{n(\sum_{i=1}^n x^2) - (\sum_{i=1}^n (\sum_{i=1}^n X))^2}$$

$$b = \frac{5(600.58) - (150)(21.19)}{5(6750) - (22500)} = -0.015721127$$

Donde a: es la ordenada al origen y b la tangente a la curva

Por lo que se tiene:

$$Y=10^{(4.711360676-0.015721127 X)}$$

Se requiere conocer la variable dependiente Y (días) en que se obtendrá una remoción de la variable independiente X (concentración del contaminante) de 47 000 ppm de petróleo crudo. Sustituyendo en la ecuación $Y=10^{(4.711360676-0.015721127 X)}$ se obtiene que: a los 79 d de haber puesto el tratamiento S2VOCM, se tendrá un suelo con 3 000 ppm, logrando con esto tener una visión del tiempo en que se tardaría en cumplir con el límite máximo permisible que marca la NOM-138-SEMARNAT/ss-2003. La cual menciona que para la fracción pesada de hidrocarburos, de un uso de suelo agrícola predominante (forestal, recreativo y de conservación) en mg/kg base seca no deberá ser mayor de 3 000 ppm.

3.9 Análisis costo – Beneficio.

Del análisis del desglose del precio unitario que resulta del tratamiento por metro cúbico del suelo contaminado sustituyendo básicamente el material estimulante para llevar a cabo la degradación de los contaminantes derivados del petróleo tenemos que el tratamiento con vermicomposta orgánica comparada con el tratamiento tradicional con sustancias húmicas comerciales es mucho más económico representando tan solo el 29 % del costo actual, en el impacto del costo directo por metro cúbico del tratamiento, sin embargo tenemos otros beneficios no cuantificados en el presente trabajo, que se pueden mencionar tales como el aprovechamiento de residuos que actualmente se generan en el estado de Tabasco y que están siendo subutilizados, la generación de empleo en la elaboración de la vermicomposta de forma intensiva y por último la generación de un material de tratamiento para suelos contaminados por hidrocarburos en el país y específicamente en el Estado de Tabasco que evitaría la importación de materiales de tratamiento o traslado dentro del país con altos costos.

Cuadro 9. Análisis de Costo- Beneficio

Análisis: 1		Unidad: M3			
TRATAMIENTO DE MATERIAL CONTAMINADO CON HIDROCARBUROS EN CELDA DE TRATAMIENTO MEDIANTE LA TECNOLOGIA DE BIORREMEDIACION					
Código	Concepto	Unidad	Costo	Cantidad	Importe
USANDO ACIDOS HUMICOS COMERCIALES					
MATERIALES					
	NUTRIENTE HUMATO	KG	\$ 65.00	11.34	\$ 737.10
	NUTRIENTE UREA	KG	\$ 5.10	1	\$ 5.10
	NUTRIENTE (TRIPLE K)	KG	\$ 6.60	1	\$ 6.60
	AGUA	M3	\$ 50.00	0.1	\$ 5.00
	Subtotal: MATERIALES				\$ 753.80

USANDO VERMICOMPOSTA					
MATERIALES					
	VERMICOMPOSTA	KG	\$6.23	32.3064	\$201.26
	NUTRIENTE UREA	KG	\$5.10	1.000000	\$5.10
	NUTRIENTE (TRIPLE K)	KG	\$6.60	1.000000	\$6.60
	AGUA	M3	\$50.00	0.100000	\$5.00
	Subtotal: MATERIALES				\$ 217.97

Es importante mencionar que el costo de elaboración de la vermicomposta se ubicó en \$6.23 debido a los costos de producción obtenidos, pues los materiales de elaboración se obtuvieron a costo cero considerando únicamente el transporte de los materiales, agua, luz y la mano de obra del personal que la elaboró por un tiempo de 90 días.

CONCLUSIÓN

Se realizó el estudio del efecto de la adición de ácidos húmicos y fúlvicos provenientes de vermicomposta y lignita en tres tipos de suelo del estado de Tabasco. En general los tratamientos con vermicomposta orgánica con microorganismos (VOCM), presentaron mejor tasa de degradación de petróleo siendo mayor en S2 (*Arcilloso-Limoso*) con un pH de 6.71, y conductividad eléctrica $< 1.0 \text{ d.m}^{-1}$) con 84.54%, seguida de S3 (*Migajón-Arenoso*) con 77.43% y la menor remoción se presentó en S1 (*Arcilloso*) con 58.74. El tratamiento S2VOCM obtuvo la mayor remoción de petróleo, esto puede ser debido a que es un suelo *arcilloso-limoso*, estos suelos son fértiles con buena saturación de agua, sin propiedades sálicas, y buena cantidad de materia orgánica, por lo que la reproducción microbiana aumenta, disminuyendo la cantidad de hidrocarburos presentes en el suelo, por otro lado, el suelo S1 presentó la menor degradación de petróleo, posiblemente a que estos suelos tienen un alto contenido de arcilla provocan deficiencia en el drenaje debido a su textura pudiendo crear condiciones de tipo anaerobias, provocando mortandad de los microorganismos.

En esta investigación se encontró que para restaurar un suelo arcilloso-limoso, contaminado con 50 000 ppm de petróleo crudo tipo Istmo, éste deberá tener las siguientes condiciones para obtener una tasa de degradación del 84.54% en 60 días: composta orgánica elaborada a partir de mezcla de sustratos (cascarilla de arroz, bagazo de caña, cascarilla de cacao y estiércol de ganado, en relación 1:1), con un porcentaje del 9.8179 % de AF, la humedad del suelo deberá ser aproximadamente del 70% de la capacidad de campo, con un pH que oscile entre 6.71 ± 0.102 , una temperatura de 28.23 ± 0.5263 y una conductividad eléctrica de 0.921 ± 0.07 .

Por otro lado, el costo del tratamiento con vermicomposta orgánica fue de tan solo el 15% del costo del tratamiento con sustancias húmicas comerciales lo que refleja la factibilidad económica de la presente propuesta, pues el costo de las sustancias húmicas comerciales representa el 96 % del costo del tratamiento S2VOCM debido a que la composta orgánica puede ser elaborada a partir de residuos generados en el estado de Tabasco, tales como: Cascarilla de arroz, bagazo de caña, cascarilla de cacao y estiércol de res, con un alto contenido en materia orgánica (>6.0) y ácidos fúlvicos (9.18%), lo cual incide directamente en el crecimiento poblacional de las bacterias degradadoras de hidrocarburos derivados del petróleo y por ende en la remoción del mismo.

RECOMENDACIONES.

Se recomienda el uso de la vermicomposta orgánica elaborada a partir de mezcla de sustratos (cascarilla de arroz, bagazo de caña, cascarilla de cacao y estiércol de ganado, en relación 1:1), con un porcentaje del 9.8179 % de AF, como estimulante de la biodegradación de petróleo crudo pues a través del presente trabajo de investigación se evidenció su eficacia para la remoción de hidrocarburos derivados del petróleo con mayor eficiencia tomando en cuenta las características del suelo.

Aunque la bibliografía menciona que la humedad óptima para llevar a cabo una biorremediación debe ser del 50%, se recomienda que cuando se utilice vermicomposta orgánica elaborada a partir de mezcla de sustratos (cascarilla de arroz, bagazo de caña, cascarilla de cacao y estiércol de ganado), la humedad del suelo debe ser del 70% de la capacidad de campo para lograr remoción óptima.

El uso de sustratos orgánicos como: cascarilla de arroz, bagazo de caña, cascarilla de cacao y estiércol de ganado, es ampliamente recomendable en el estado de Tabasco debido a que la región es agrícola-ganadera, y los sustratos que se proponen en este trabajo de investigación son producidos en grandes cantidades, por lo tanto el precio para la elaboración de vermicomposta es abatido considerablemente.

Es recomendable continuar con la investigación de otros sustratos que puedan ser utilizados para la elaboración de vermicomposta y compararlos con los resultados obtenidos en el presente trabajo, a fin de generar opciones económicamente viables para la remediación de suelos contaminados en el estado de Tabasco.

En caso de no contar con los sustratos orgánicos que menciona este trabajo se recomienda el uso de ácidos húmicos y fúlvicos provenientes de lignita, ya que se evidenció que aunque no removieron los hidrocarburos derivados del petróleo como los humatos de vermicomposta, tuvieron una franca competencia en la remoción de petróleo en un suelo tipo arcilloso-limoso.

Literatura citada

Aitken, J.B., Acock, B., y Senn, T.L., las características y efectos de los ácidos húmicos derivados de Leonardite, boletín técnico 1015, estación agrícola del sur del experimento de Carolina, Clemson University, 1985.

Al ken, G.R. McKnight, D.M. Wershaw, R.L. y MacCarthy, P. 1985 In G.R. Wershaw, P. MacCarthy (Eds). Humic Substances In soil, Sediment and water, John Wiley, New, York, 1-9.

Alexander, M. 1994. Introducción a la Microbiología del Suelo. 2a. Reimp. AGT Editor, S. A. México, D. F. 491 p.

Aliev, S.A. 1983. Paramagnetic properties and physiological activity of humous substances. In Teoriya deystviya fiziologicheskii aktivnykh veshchestv. Tr. DSKhI, Vol. 8. Dnepropetrovsk, 78-80.

Aso, S. and Sakai, I. 1963. Studies on the physiological effects of humic acid. Part I. Soil Sci. Plant Nutr. 9:(3), pp. 1-7.

Atlas, M. R. y Bartha, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. 4ª edición. Ed. Addison Wesley. pág 97-112.

Ayuso, L.M. 1995. Utilización de los residuos orgánicos como enmiendas ácidas y líquidas;: Valoración agronómica y efectividad frente a enmiendas tradicionales, Tesis Doctoral, CEBAS, CSIC, Murcia, España.

Benavides R., G. D. Hermida S., A. M. 2008. Aislamiento e identificación de flora bacteriana nativa del suelo de los Páramos Cruz Verde y Guasca. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá D.C.

Bernal I. Cabezas, C. Espitia J. y J. Quintero. 2003. Análisis próximo de arcillas para cerámicas. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 27 (105):569-578.

Bonilla, R. R., René N.S, Nestor, V. Ana M.M. Maria M. M. Doglas, P. 2000. Generación de tecnologías para la utilización de la fijación no simbiótica de nitrógeno como alternativa

de fertilización. Corporación Colombiana de investigación agropecuaria. Corpoica, Regional (3).

Botello, V. A. 1996. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. P 203-210 In: Botello, V. A. J.L. Rojds G.J. A. benitez y D. Zárate-Lomelí (Eds). Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: Diagnostico y tendencias. EPOMEX. Serie científica 5. Universidad Autonoma de campeche, México 666 p

Burk Dean, Hans Lineweaver, and C. Kenneth Horner. 1933. From the Fertilizer and Fixed Nitrogen Investigations Unit, Bureau of Chemistry and Soils, United States Department of Agriculture. Washington D.C.

Cacciamani, Miguel A. 1998. Material sobre lombricultura. Edit Pergamino, Buenos Aires. 44 p.

Cahadia, C. 1997. Fertirrigación. Cultivos hortalizas y hornamentales. Ediciones Multi-prensa. Madrid.

Canals, M.,A. Stewart, C. Alarcón y S. McMillen. 2005. Effects of earworm (*Eisenia foétida*) and wheat (*Triticum aestivum*) straw additions on selected of petroleum-contaminated soils", Environmental Toxicology and Chemistry: 21, 1658-1663.

Castro-López, J. 2004. Uso Agronómico del Catastro de Suelos. [En línea] <<http://www.pr.nrcs.usda.gov/technical/Agronomy/usos1.htm>> [consulta: 25 noviembre 2004].

Cerniglia C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3:351-368

Chaminade, R. 1956. Humus et fertilité des sols. 6 Congr. Du sol. Paris, 4 comm

Chaneac, C., Morel, J. y Oudot, J. 1995. Microbial degradation in soil microcosms of fuel oil hydrocarbons from drilling oil cuttings. Environ. Sci. Technology vol 29 pág 1615-1621.

Chukov, S.N., Talishkina, V.D. Y Nadporozhskaya, M.A. 1996. Physiological activity of growth stimulators and of soil humic acids. Eurasian soil science, 28 (4), 30-39.

CIMADES (comisión interinstitucional para el Medio Ambiente y el Desarrollo Social). 1997. Relación de fugas de hidrocarburo localizadas en el campo cinco presidentes periodo de 1989-1987. gobiernos del estado de Tabasco, Villahermosa, Tab. 14 p.

Commission of the European Communities (COM), 2002: Towards a thematic strategy for soil protection. Bruselas.

Cookson, T. 1995. Engineering Design and Application. Ed. McGraw-Hill. Inc. New York. pág 95-135.

Córdova-Bautista, Y., Rivera, C. M. C., Ferrera, C.R. Obredor, O.J.J., Córdova A.V. 2009. Detección de bacterias benéficas en suelo con banano (*Mussa AAA Simmonds*) cultivar 'Gran Enano' y su potencial para integrar un biofertilizante. Uceincia. 25(3), 253-265.

Cuanalo, de la C.H. 1981. Manual para descripción de perfiles de suelos en el campo. 2ª. Ed. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduado. Chapingo, México. 40 p.

Daubaras, D. and Chakrabart, A. M. 1992. The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment. Biogradation 3: pág 125-135.

De Brito, J. 1972. Caracteres de la materia orgánica de algunos suelos del estado de Yaracuy. Agronomía tropical 26 (4) :337-351.

De Liñán, C. 1998. Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales. Ediciones Agrotécnicas S.L. 14ª edición. Madrid.

Dragun, J. 1998. The soil Chemistry of Hazardous Materials. 2ª edition. Amherst Scientific Publishers, Amherst, MA.

Drozd, J., Gonet, S. Del S., Senesi, N., Weber, J., 1996. El papel de sustancias húmicas en los ecosistemas y en la protección del medio ambiente. Sociedad de las Sustancias húmicas, Wroclaw, Polonia.

Dubbini, G. 1995. interés de los bioestimulantes. Hortoinformación, 9, 50-51.

Duchaufour, Ph. 1975. Manual de Edafología. Ed. Toray-Mason. Barcelona

Ercoli, E., Gálvez, J., Di Paola, M., Cantero, J., Videla, S., Medaura, M., Bauzá, J (2000) Laboratorio de bioprocesos, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza. Mc Graw-Hill International. Editions. 296 pp.

Escadafal, R. 1989. Caractérisation de la surface des sols arides par observations de Etudes et Thésés. ORSTOM. Paris. Francia.

Eweis, J.B., S. J. Ergas, D.P. Chang y E. D. Schroeder. 1998. Bioremediation principles.

FAO, 2007. Base referencial mundial de recurso suelo por IUSS-ISRIC-FAO. Informe sobre recursos mundiales del suelo No. 103. Roma, Italia.

Faust, R. H. (1996). Acidos húmicos-humatos. Servicio de Agricultura. E.U.: pp.3.

Fernández R., Morales M., J.C. V. M. Montiel C., A. Peralta B., C. B. 2009. Evaluación de sustratos orgánicos en la producción de lombricomposta y el desarrollo de lombriz (*eisenia foetida*). Dpto. de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora. 19-26 p.

Fernández, L. L. 2002. Tecnologías de biorremediación en suelos. *In*: La edafología y sus perspectivas al siglo XXI. Tomo II. Ed. Colegio de Postgraduados, UNAM, UACH, México. pág 700-705.

Fiorenza, S. *et al.*, 2002., Sequenced reactive barriers for groundwater remediation. Lewis Publishers, CRC Press LCC. Boca Raton.

Flaig, W. 1958. Die cheimie organischer staffe Boden und deren physiologische wurking. Vernal 2, 4 komm. Bodenkindlicher. Hamburg.

Flaig, W. 1970. Effect of humic substances on plant metabolism. Proc. Second Int. Peat Congress. Leningrad, 579-606.

Franco, J.A. Y Bañón S. 1998. Posibilidades agrícolas de los ácidos húmicos comerciales. Horticultura, 69.

Gaffney, J. S., N. A. Marley, and S. B. Clark. 1996. Humic and fulvic acids and organic colloidal materials in the environment. p.2-16. In J.S. Gaffney, N. A. Markey and S. B.

Clark (ed.). Humic and fulvic acids isolation. Structure, and environmental role, vol. 651. American Chemical Society, Washington. D.C.

Gallardo, J.F., 1980. El humus investigación y ciencia No. 46, pag. 8 – 16.

García, C. N. 1999. Cambios en las características de las sustancias húmicas por la actividad de las lombrices de tierra. En: memorias del simposium internacional y primera Reunión Nacional de lombricultura y abonos orgánicos.67-73. México.

Guatemala: (1996): Fundamentos del uso de sustancias húmicas en suelos y cultivos agrícolas. Promotora Técnica agrícola, pp.14

Hartcher, P.G. Faulon, J.L., Clifford, D.A. y Matheus, P. 1994,. A terr-dimensional structural model for humic acids from oxidized soil In N. Senesi, t.M. Miano (Eds.)

Hayes, M. H. B., MacCarthy, P., Malcolm, R. L., Swift, R. S. 1989. Humic substances II. In search of structure.

Hecker, M. Völker, U. 1994. General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria Adv Microb Physiol vol 44 pág 35-91.

Hernández, G., y Velazquez, J.C., 2008. Evaluación de dos surfactantes en la recuperación de suelos contaminados con petróleo crudo. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Tesis de Ing. Química. Cunduacán, Tabasco, México. Pág. 38.

Hoitink, H.A.J. and Changa, C.M., 2004. Production and utilization guidelines for disease suppressive composts. Acta Horticulture, 635: 87-92

Huesemann, H. M. 1994. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soil. J. soil Contam. vol 3 pág 399-418.

IMP (Instituto Mexicano del Petróleo). 1985. 30 años al servicio de la industria petrolera nacional, México. pág 104.

Kanauf, J. 1993. University of Georgia, and Pettit, Robert, Texas A&M University, "the Role of the humates in the Oilfield", presentados en la primera muestra de aceite y gas de Pahnandle, Guymon.

Kononova M.M. (1966): *Materia Orgánica De Suelo*. Pergamon, Oxford.

Kononova, M. M. y N. P. Belchikova. 1961. Estudio de la naturaleza de las sustancias húmicas del suelo por procedimientos de fraccionamiento Pochvovedenic No. 11.

LaGrega M., Phillip, D. L. Buckingham and Jeffrey C. Evans. 1997. Gestión de residuos tóxicos tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Ed. McGraw-Hill. vol 1 pág 97-120 y vol 2 pág 643-733.

Lajous Vargas, A. 1997. Compromisos de PEMEX con la protección del medio ambiente en el estado de Tabasco. Inauguración de la construcción de una nueva planta procesadora de gas natural en el C.P.Q. Ciudad PEMEX, 26 de Julio de 1997. Presentado en Presente, Villahermosa, Tabasco. 14-15 A.

Leahy, J. G. and Colwell, R. R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Rev.* vol 54 pág 305-315.

Linehan, D.J. 1977. *Journal of soil Science*. 28, 369-378.

López Guemez A. del R., Palma González B., Hernández Rivera M. A., Ojeda Morales M. E., Ángeles Padilla A., Ruiz Nájera J. A., García Marín M. J., 2006. Caracterización Físicoquímica de los Suelos Predominantes en el Estado de Tabasco. *Conciencia Tecnológica* 34, pag. 45-46.

M. De Kononova (1982): *Budowa gleby del ich del organiczne de Substancje, w.a.ciwo.ci i bada. metody*. PWRiL, Warszawa.

Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 2003. *Broca. Biología de los microorganismos*. 8ª. ed. rev. y aum. Trad. al español por M.Gacto F., I. García A., T. González V., R. Guerrero M. y M. Sánchez P. Prentice Hall Iberia. Madrid, España. Capítulo 5, Pág. 152-157.

Markonetz, A. J. 1992. Subterminal oxidation of hydrocarbons by microorganisms, critical reviews in *Microbiology*, vol 1 pág 225-237.

Maroto A., Rogel Q., M. E. y J. M. 2004. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. División de Protección Ambiental, Guadalajara, México. P. 297-305.

Marquez-Rocha, F. *et al.*, 2002. Biodegradation of diesel oil in soil Pollution, 128: 313-320.

McCarthy P., Malcolm R.L., Clapp C.E., Floración P.R. (1990): Una introducción para manchar sustancias humic, sustancias humic en suelo y ciencias de la cosecha: lecturas seleccionadas, W: Sociedad americana de la agronomía, ciencia de suelo de América. Madison, 1-12.

Morris D. And Mosley, R. 1999 efectos de los humatos en la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos y sales. Simposium internacional del Petroleo 1999, Boston, E.U.

Nakamura, S. 1997. Análisis numérico y visualización gráfica con MATLAB. Prentice Hall Hispanoamericana México.

Natural Resources Conservation Service (NRCS). United State Department Of Agriculture (USDA).

Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT-2003. Apartado A.3. Determinación de hidrocarburos de la fracción pesada. Noviembre 2004

Okpokwasili, G. C. and James, W. A. 1995. Microbial contamination of kerosene, gasoline and crude oil and their spoilage potenciales. Material and organismen. Berlín, Germany. pág 147-156.

Palma L., D. J., Cisneros D., J. 2002. Mapa: Los suelos de Tabasco de acuerdo a la leyenda de la FAO 1989. Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco. Villahermosa, Tabasco.

Palma L., D. J., Cisneros D., J., Moreno C., E., Rincon R., J. A. 2007. Suelos de Tabasco: su uso y manejo sustentable. Colegio de Postgraduados-Campus Tabasco. Cárdenas, Tabasco. 75-132 p.

Pardieck, D. *et al.*, 1992. Hydrogen peroxide use to increase oxidant capacity for in situ bioremediation of contaminated soils and aquifers: A review. J. of Contaminat Hidrology, 9, 221-242.

Paul, E. A. y F. E. Clark. 1996. Soil microbiology and Biochemistry 2a Edition. Academic Press. San Diego California USA.

PAZ, R. ELIAS. 1999. Efecto de la aplicacion de tres acidos humicos, sobre el rendimiento del cultivo de banano (*musa sapientum* var. *grand naine*), en la finca arapahoe, izabal, guatemala”. Tesis de Licenciatura. Guatemala.

PEMEX (Petróleos Mexicanos), 1988. El petróleo. Edición revisada y redactada por H. Covantes, Petróleos Mexicanos, México, D.F. pp. 176.

PEMEX, 1986. Brevario de terminos y conceptos sobre ecología y protección ambiental, México D.F. 301 p.

Piccolo, A., Campanella, L. Y Petronio, B.M. 1990. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of soil humic substances extracted by different mechanisms. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54, 750-756.

Piccolo, A., Nardi, S. Y Concheri, G. 1992. Structural characteristics of humous substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. *Soil Biol. Biochem.*, 24(4) 373-380.

Porta C., J., M. López-Acevedo R. y D. Roquero C. 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3ra ed. Mundi-Prensa. México, D. F.

Prescott L., 2004. Microbiología. 5ª Ed. Editorial Mc-Graw Hill. Interamericana. Madrid España.

R. Arribal Ruben y Carlos A. De Zanso. 1999. Como criar lombrices Rojas Californianas. Programa de autosuficiencia regional. 35-39 p.

Rerabeck, J. 1960. Humic acid interaction in the growth process. *Biologia Plant.* (Praha) 2, pp. 88-97.

Riser-Roberts, E. 1998. Remediation of petroleum contaminated soils. Lewis Publishers. P. 542.

Rivera, M.,2001. Microorganismos rizosfericos de los pastos aleman [*Echinochloa polytachya* (H.B.K. Hitchc) y cabezón (*Paspalum virgatum* L.) en la degradación del petroleo crudo y el benzo(a)pireno. Tesis doctoral. Colegio de posgraduados, Montecillos, Texcoco, Edo. De México.

Rosenberg, E., and Ron, E. Z. 1996. Biorremediation of petroleum contamination. University of Idaho, Moscow. pág 100-125.

Saval, S., 1998. Situación actual y perspectivas de la biorremediación de suelos y acuíferos en México. Biotecnología. Vol. 3.

Schneider, D. R. and Billingsley. 1990. Bioremediation. A desk manual for the environmental professional. Published by Cahn Publishers Company. USA. p. 95

Schnitzer, M. 1990. Selected methods for the characterization of soil humic substances. pp. 65-89. In P. MacCarthy, C.E. Clapp, R.L. Malcolm, P.R. Bloom (Eds.) Humic substances in soil and crop sciences: Selected readings. Proceedings of a symposium by the IHSS, Chicago, Illinois, December 1985.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2002. Comunicación personal con personal de la Dirección General de Manejo Integral de Contaminantes.

SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Apartado 6.1. Evaluación de la conformidad para muestreo de suelos. Muestreo para determinar fertilidad de suelos. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre de 2002.

SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Apartado 7.1.1. Método AS-01. Preparación de la muestra de suelo. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre de 2002.

SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Apartado 7.1.2. Método AS-02. Determinación del pH del suelo medido en agua. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre de 2002.

SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Apartado 7.1.3. Método AS-03. Determinación de la densidad aparente. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre de 2002.

SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Apartado 7.1.4. Método AS-04. Determinación de la densidad real con el picnómetro. Diario Oficial de la Federación, segunda sección. Diciembre de 2002.

SEMARNAT. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT-2003. Método: NMX-AA-052. Determinación de la humedad del suelo. Diario Oficial de la Federación, primera sección. Marzo de 2005.

SEMARNAT. 2003. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT-2003. Apartado A.3. Determinación de hidrocarburos de la fracción pesada. Diario Oficial de la Federación, primera sección. Noviembre de 2004.

Semple, K.T., B. J. Reid y T. R. Fermor 2001. Impact of composting strategies on the treatment of soils contaminated with organic pollutants. Environ. Pollution, 112: 269-283.

Saval, S., 1998. Situación actual y perspectivas de la biorremediación de suelos y acuíferos en México. Biotecnología. Vol. 3.

Stevenson F.J. (1982): Química del humus. Génesis, composición, reacciones. Juan Wiley e hijos.

Stevenson, F. J. 1994. Química De la Humus, 2do Ed. . Wiley, Nueva York.

Swift, R.s. y Posner A.M. 1971. Journal of Soil Science 22, 237-249.

terrain et par télédétection. Application: exemple de la région de Tataouine (Tunisie).

Trinidad, S. A. 1999. El papel de los abonos orgánicos en la producción de los suelos. pp. En: Memorias del primer simposio internacional sobre lombricultura y abonos orgánicos. Universidad Autónoma Chapingo, México.

Trinidad, P., Sobral, L. G., Rizzo, A. C., Leite, S. G. F., Lemos, J. L. S., Milloili, V. S., and Soriano, A. U. 2002. Evaluation of the biostimulation and bioaugmentation techniques in the bioremediation process of petroleum hydrocarbon contaminated soils. 9th International Petroleum Environmental Conference, IPEC (Integrated Petroleum Environmental Consortium), Albuquerque, NM.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2001. Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report. 10th Edition. Office of Solid Waste and Emergency Response. <http://www.epa.gov/TIO>.

Vallejo, V., Salgado, L., y Roldan, F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá Colombia.

Van Deuren, J., Z. Wang y J. Ledbetter 1997. Remediation technologies screening matrix and reference guide. Tercera edición. Technology Innovation Office, EPA. <http://www.epa.gov/tio/remed.htm>.

Varanini, Z y Pinton, R. 1995. Humic Substances and plant nutrition. Progress in Botany, 56, 97-116.

Vaughan D. y Ord B. G. 1985. Soil organic mater. A perspective on its nature, extraction, turnover and role in soil fertility: En Soil Organic Matter and Biological Activity. Vaughan D and R.E. Malcolm Edit.

Vinalay, C. L. 1998. Diagnóstico sobre el manejo y disposición de lodos de perforación en la zona lacustre Julivá-Santa Anita, Tabasco, México. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Ambiental. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. pág 45-52

Von Fahnestock, F., B. Wickramanayake Godage, W. R. Michael Major y R.J. Dratzke. 1998. Biopile design, operation, and maintenance handbook for treating hydrocarbon-contaminated soils. Battelle Press Editions. 163 pp.

Walton, B. T., Guthrie E. A., and Hoylman, A.M (1994) Toxicant degradation in the rhizosphere. *In: Bioremediation through Rhizosphere Technology*. Anderson, T. A. and Coats, J.R. American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 11-26.

Wong, S. H. y D. A. Griffiths. 1991. Vermicomposting in the management of pig-waste in Hong Kong. World J. Microbiol. Botechnol. 7:593-595 Pp.

Zavala CJA, Ruiz, DJ Palma. 1996-1997. Contaminación por metales pesados en las tierras del Campo petrolero Samaria, Tabasco. La investigación edafológica en México, México. XV Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales 2006. P. 1-14.

Zavala, J., David, P., Eustolia G., José, O., Armando, G., Carlos, O., Arnulfo, T. 1996. Evaluación y propuesta de restauración de zonas impactadas por derrames de petróleo

crudo, en manglares de la laguna el arrastradero, paraíso, Tabasco. Gobiernos del estado de Tabasco CIMADES. 98 p.

Zechendorf, B. 1999. Sustainable development: How can biotechnology contribute? Tibtech 17: 219-225.

Zulueta R., R., Vázquez T., V. y Hernández Q., A. (Eds.).1995. Memorias del Primer Curso-Taller sobre Agricultura Orgánica. Xalapa (México): Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Veracruzana. Pág. 69-79.

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

Glosario

Ácido fúlvico: Es una molécula de cadena corta, de bajo peso molecular, amarillo en color y soluble en soluciones ácidas y alcalinas.

Ácido húmico: Es un constituyente polimérico íntimamente ligado a arcillas y resistente a la degradación, es de color café a negro, de alto peso molecular, y es soluble en una solución alcalina.

Análisis del suelo: Prueba física, química o microbiológica que estima alguna de las fracciones que constituyen al suelo.

Bacterias: son organismos microscópicos monocelulares.

Biorremediación: Es una alternativa biológica para el tratamiento de suelos contaminados, basada en la utilización de microorganismos para remover, degradar o transformar sustancias tóxicas en el suelo.

Compostaje: Es un proceso biológico mediante el cual es posible convertir residuos orgánicos en materia orgánica estable (composta madura) gracias a la acción de diversos microorganismos.

Derrame: Cualquier descarga, liberación, rebose, achique o vaciamiento de hidrocarburo que se presente en suelo.

Hidrocarburos: Compuestos químicos, constituidos principalmente por átomos de carbono e hidrógeno.

Hidrocarburos de fracción pesada: Mezcla de hidrocarburos cuyo peso molecular sea mayor a C₁₈.

HTP: Cantidad total de hidrocarburos que se encuentran en una muestra particular de suelo, agua o aire. A este grupo se le denominada hidrocarburos totales del petróleo (HTP).

Humato: Técnicamente este término describe las sales del ácido húmico. Genérica y comercialmente, este término normalmente se refiere a la combinación de componentes

(húmico, fúlvico y humin) conjuntamente con sus portadores (humus, carbón, abono, etc.). Generalmente es el término que se da a todas las sustancias húmicas.

Humina: Es aquella porción del suelo que es insoluble, de color café oscuro, de peso molecular extremadamente pesado y es responsable para la capacidad del suelo de retener agua, desmoronamiento y de su conductividad electrostática.

Humus: Es la materia orgánica del suelo compuesta por ácido húmico, ácido fúlvico y huminas.

Lombricultura: Es una biotecnología que utiliza ciertas especies de lombrices de tierra, para recuperar de los desechos orgánicos los mejores nutrientes naturales para utilizarlos como fertilizante orgánico llamado humus de lombriz.

Medio de cultivo: solución acuosa que contiene los nutrientes necesarios para cultivar los microorganismos.

Microorganismos: organismos microscópicos constituidos por una célula o agrupación de células.

Muestra compuesta: Muestra constituida por varias submuestras simples de suelo, las cuales provienen de una superficie de terreno relativamente homogénea.

Muestreo: Procedimiento para obtener una o más muestras representativas de un terreno.

Suelo: Material no consolidado compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos, que comprende desde la capa superior de la superficie terrestre hasta diferentes niveles de profundidad.

Suelo contaminado con hidrocarburos: Aquel en el cual se encuentran presentes hidrocarburos que por sus cantidades y características afecten la naturaleza del suelo.

Textura del suelo: La proporción relativa por tamaños de partículas de arena, limo y arcilla. Las cuales al combinarse generan las clases texturales.

Vermicompostaje: Es una técnica en la que se procesan materiales en descomposición a través de la lombriz.

Apéndice A

Cuadro 10. Interpretación de resultados de pH (NOM -021-RECNAT-2000).

Determinación	Clasificación	Valor
Ph	Fuertemente ácido	< 5.0
	Moderadamente ácido	5.1 - 6.5
	Neutro	6.6 - 7.3
	Medianamente alcalino	7.4 - 8.5
	Fuertemente alcalino	> 8.5

Cuadro11. Interpretación de resultados de Materia orgánica (NOM -021-RECNAT-2000).

Determinación	Clasificación	Valor (%)
Materia orgánica	Muy bajo	< 0.5
	Bajo	0.6 - 1.5
	Medio	1.6 - 3.5
	Alto	3.6 - 6
	Muy alto	> 6.0

Cuadro 12. Interpretación de resultados de Fósforo (NOM -021-RECNAT-2000).

Determinación	Clasificación	Valor (Mg Kg ⁻¹)
Fósforo	Bajo	< 15
	Medio	15 - 30
	Alto	> 30

Cuadro 13. Interpretación de resultados de Magnesio y Calcio (NOM -021-RECNAT-2000).

Clasificación	Mg (cmol kg ⁻¹)	Ca (cmol kg ⁻¹)
Muy baja	< 0.5	< 2.0
Baja	0.5 - 1.3	2 - 5
Media	1.3 - 3.0	5 -10
Alta	>3.0	> 10

Cuadro 14. Interpretación de resultados de Nitrógeno Total (NOM -021-RECNAT-2000).

Determinación	Clasificación	Valor (%)
Nitrógeno	Muy pobre	> 0.05
	Pobre	0.05 - 0.10
	Medio	0.10 - 0.15
	Rico	0.15 - 0.25
	Muy alto	> 0.25

Cuadro 15. Resultados de la determinación de ácidos húmicos y fúlvicos para la selección de la vermicomposta.

VERMICOMPOSTA	%		
	C	AH	AF
Cascarilla de arroz	4.0170	0.0124	4.0046
Bagazo de caña	5.5380	0.0102	5.5278
Cascarilla de cacao	6.3570	0.0056	6.3514
Estiércol de res	9.3600	0.0149	9.3451
Mezcla	9.8280	0.0101	9.8179

Cuadro 16. Resultados de la determinación de ácidos húmicos y fúlvicos en las vermicomposta utilizada.

Estimulante	% C	% AH	% AF
Orgánica	9.75	0.0088	9.7412
Sustancias Húmicas Comerciales	20.28	0.0205	20.2595

Cuadros de resultados experimentales obtenidos durante la realización de la investigación para el suelo 1. Arcilloso

Cuadro 17. Promedio de los análisis de HTP del suelo 1. Arcilloso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.

	0	15	30	45	60
SVCM	3971	7520	10992	12420.44	18565.48
SVSM	3658	6120.39	7201	7315	8254.17
VOCM	2018	24627.9	27120.2	28183.5	31716.9
VOSM	2638	4690.04	12127	8465.77	8987.87
CCCM	3124	20738.2	25601	26824.4	30084.6
CCSM	2911	21950.8	24104.1	26163.8	27562.3

Cuadro 18. Promedio de los análisis de UFC del suelo 1. Arcilloso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.

TRATAMIENTO	CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS				
	0	15	30	45	60
	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)
SVCM	28	33.7	38.0	23.3	32.3
SVSM	27.3	27.0	14.0	18.0	9.0
VOCM	24.3	28.0	95.0	68.3	28.0
VOSM	30.3	24.7	72.7	24.0	10.3
CCCM	29	16.0	68.0	21.0	28.0
CCSM	25	13.0	29.0	25.0	8.0

Cuadro 19. Promedio de los análisis de humedad (%) del suelo 1. Arcilloso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0						
15	87	83	83	84	85	81
30	85	84	81	81	85	84
45	85	87	85	81	87	84
60	81	84	89	83	88	85

Cuadro 20. Promedio de los análisis de pH del suelo 1. Arcilloso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0	6.44	6.18	6.29	6.09	6.43	6.26
9	6.42	6.16	8.28	5.98	6.41	6.19
15	6.29	5.37	5.56	5.46	5.74	5.62
24	5.63	5.96	6.55	6.31	6.26	6.08
33	5.80	5.96	6.55	6.13	6.25	5.56
42	5.75	6.64	6.21	6.71	6.19	6.69
51	6.57	6.75	6.28	6.46	6.80	6.7
60	6.25	6.49	6.33	6.84	6.61	6.61

Cuadro 21. Promedio de los análisis de temperatura (°C) del suelo 1. Arcilloso, a los 0, 9, 15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0	30.5	30.0	30.5	30.8	29.8	30.7
9	30.0	30.0	24.7	30.8	30.0	30.7
15	29.0	28.7	28.7	28.7	29.0	29.3
24	28.0	28.2	27.8	28.0	28.0	28.0
33	28.3	28.3	28.0	28.0	28.0	28.0
42	29.0	29.0	28.5	28.5	28.0	28.0
51	27.0	26.9	27.0	27.5	27.2	27.9
60	27.0	26.9	27.0	27.5	27.2	27.9

Cuadro 22. Promedio de los análisis de Conductividad eléctrica (dS/cm) del suelo 1. Arcilloso, a los 0, 9, 15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0	0.6	0.4	0.9	0.5	0.6	0.4
9	0.5	0.4	4.8	0.4	0.5	0.4
15	0.6	0.4	0.8	0.5	0.6	0.4
24	0.6	0.5	1.1	0.6	0.5	0.6
33	0.7	0.5	0.9	0.7	0.6	0.6
42	0.7	0.5	1.0	0.8	0.7	0.6
51	0.8	0.8	1.4	1.0	0.8	0.7
60	0.7	0.7	1.0	0.9	0.7	1.0

Cuadros de resultados experimentales obtenidos durante la realización de la investigación para el suelo 2. Arcilloso-Limoso.

Cuadro 23. Promedio de los análisis de HTP suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 15, 30, 45 y 60 días.

	0	15	30	45	60
SVCM	2181	7305	11370	13110	16268
SVSM	3821	4498	6680	7810	8868
VOCM	2871	33492.2	38972.3	40655.8	43027.4
VOSM	2151	2742	3851	6566	6882
VCCM	2496	32434	37169.2	39580.1	40919.4
VCCSM	1596	22779.2	30738.7	36777.1	39950.7

Cuadro 24. Promedio de los análisis de UFC del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.

TRATAMIENTO	CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS				
	0	15	30	45	60
	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)
SVCM	24.3	42.0	101.3	79.7	83.0
SVSM	69.6	134.0	99.7	157.7	49.7
VOCM	47.6	770.0	390.0	976.7	580.0
VOSM	52	223.3	213.3	400.0	183.3
CCCM	31	42.0	101.3	79.7	83.0
CCSM	60	134.0	99.7	157.7	49.7

Cuadro 25. Promedio de los análisis de humedad (%) del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0						
15	72	64	60	64	68	65
30	69	72	69	74	69	68
45	72	70	71	72	71	64
60	69	73	73	73	72	72

Cuadro 26. Promedio de los análisis de pH del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0	7.2	7.3	7.1	7.3	7.1	7.3
9	7.2	6.4	7.9	6.8	6.4	6.5
15	6.9	6.2	6.6	6.5	6.9	6.3
24	6.3	6.2	6.3	6.3	6.1	6.1
33	6.8	6.9	6.8	7.3	6.6	6.3
42	6.2	6.7	6.3	6.8	6.4	6.6
51	6.4	6.9	6.8	6.8	6.9	6.8
60	7.0	7.0	6.9	6.9	6.8	6.9

Cuadro 27. Promedio de los análisis de temperatura (°C) del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 9, 15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0	29.3	30.0	29.5	30.8	28.7	30.0
9	30.0	30.0	23.3	29.3	29.2	29.7
15	28.5	28.2	28.0	28.0	28.2	27.8
24	27.5	27.5	27.0	27.0	28.3	28.0
33	27.6	27.6	27.5	27.5	28.6	28.6
42	28.4	28.1	27.5	27.7	28.0	18.7
51	29.0	29.0	29.3	29.2	28.4	28.5
60	29.1	28.4	29.0	29.0	28.5	28.5

Cuadro 28. Promedio de los análisis de Conductividad eléctrica (dS/cm) del suelo 2. Arcilloso-Limoso, a los 0, 9, 15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0	1.0	0.9	1.3	1.0	1.3	0.6
9	0.8	0.6	4.8	0.9	1.1	1.3
15	0.6	0.7	0.8	0.9	0.8	1.0
24	0.9	0.7	0.7	0.9	0.8	0.9
33	1.0	0.9	1.0	0.9	1.1	1.0
42	0.9	1.0	0.9	1.1	1.1	1.1
51	0.9	1.1	1.1	1.1	1.2	1.0
60	1.0	1.0	1.0	1.1	1.0	1.2

Cuadros de resultados experimentales obtenidos durante la realización de la investigación para el suelo 3. Migajón-Arenoso.

Cuadro 29. Promedio de los análisis de HTP suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0, 15, 30, 45 y 60 días.

	0	15	30	45	60
SVCM	1941	9746	10909	13519	20601
SVSM	2045	4861	5301	6802	8261
VOCM	3098	26547.5	30223.6	31499.8	38760.1
VOSM	2062	5016	5428	7069	8021
VCCM	2385	23607.8	29484.1	31306.9	37731.2
VCSM	3966	22865.4	28826	29723.4	37031.7

Cuadro 30. Promedio de los análisis de UFC del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.

TRATAMIENTO	CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS				
	0	15	30	45	60
	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)	UFC g ⁻¹ de ss (10 ⁴)
SVCM	29.6	48.3	49.0	169.3	97.0
SVSM	32.3	114.3	61.3	96.0	79.3
VOCM	52.6	54.3	35.0	92.7	58.7
VOSM	48	443.3	410.0	740.0	600.0
CCCM	57.3	48.3	49.0	169.3	97.0
CCSM	23	114.3	61.3	96.0	79.3

Cuadro 31. Promedio de los análisis de humedad (%) del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0,15, 30, 45 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0						
15	71	60	69	71	71	70
30	73	75	70	76	70	76
45	78	77	77	76	78	78
60	79	79	76	79	79	78

Cuadro 32. Promedio de los análisis de pH del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0, 9,15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0	7.0	7.4	6.9	6.8	6.7	6.8
9	6.7	6.2	8.6	6.6	6.6	6.4
15	6.8	6.5	6.3	6.2	6.4	6.1
24	5.8	6.0	6.2	6.1	6.2	5.8
33	6.6	6.2	6.7	6.3	6.5	6.8
42	6.1	6.6	6.2	6.6	5.9	6.6
51	6.6	6.5	6.7	6.6	6.5	6.5
60	6.5	6.4	6.7	6.4	6.9	6.4

Cuadro 33. Promedio de los análisis de temperatura (°C) del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0, 9, 15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0	26.8	30.0	26.8	30.0	27.0	29.7
9	30.5	30.5	24.3	30.0	30.0	30.2
15	28.7	29.0	29.0	29.5	28.8	29.0
24	27.0	27.0	27.0	27.0	27.2	27.0
33	28.0	28.0	28.0	28.0	28.0	28.0
42	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0	29.0
51	28.0	28.0	28.0	28.0	28.0	28.0
60	28.0	28.0	28.0	28.0	28.0	28.0

Cuadro 34. Promedio de los análisis de Conductividad eléctrica (dS/cm) del suelo 3. Migajón-Arenoso, a los 0, 9, 15, 24, 33, 42, 51 y 60 días.

Días / Tratamientos	SVCM	SVSM	VOCM	VOSM	CCCM	CCSM
0	0.9	0.5	1.1	0.6	1.1	0.5
9	1.0	0.6	5.0	0.5	0.7	0.3
15	0.5	0.4	1.6	0.5	0.6	0.5
24	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6	0.5
33	0.5	0.5	0.6	0.6	0.5	0.6
42	0.4	0.6	0.6	0.6	0.5	0.7
51	0.5	0.8	0.6	0.6	0.5	0.7
60	0.6	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5

Cuadro 35. Análisis de varianza de la degradación de TPH a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 1. Arcilloso.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	51183016.4	10236603.3	2.04	0.1444
Error	12	60174107.9	5014509		
Total	17	111357124.3			
R cuadrada	0.4596				
CV	10.08006				
30 días					
Modelo	5	1030796528	206159306	124.08	<.0001
Error	12	19938305	1661525		
Total	17	1050734833			
R cuadrada	0.981024				
CV	3.965921				
45 días					
Modelo	5	1504300213	300860043	242.21	<.0001
Error	12	14905854	1242154		
Total	17	1519206067			
R cuadrada	0.990188				
CV	3.480604				
60 días					
Modelo	5	1394508938	278901788	231.77	<.0001
Error	12	14440301	1203358		
Total	17	1408949239			
R cuadrada	0.989751				
CV	3.710958				

Cuadro 36. Análisis de varianza de la degradación de HTP a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 2. Arcilloso-Limoso.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	3006406779	601281356	746.81	<.0001
Error	12	9661595	805133		
Total	17	3016068374			
R cuadrada	0.996797				
CV	2.736884				
30 días					
Modelo	5	3818651044	763730209	5813.44	<.0001
Error	12	1576478	131373		
Total	17	3820227522			
R cuadrada	0.999587				
CV	1.269229				
45 días					
Modelo	5	4113483446	822696689	1332.17	<.0001
Error	12	7410747	617562		
Total	17	4120894194			
R cuadrada	0.998202				
CV	3.030396				
60 días					
Modelo	5	4325555965	865111193	17865.3	<.0001
Error	12	581088	48424		
Total	17	4326137053			
R cuadrada	0.999866				
CV	0.910353				

Cuadro 37. Análisis de varianza de la degradación de HTP a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 3. Migajón-Arenoso.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	1490592522	298118504	289.16	<.0001
Error	12	12371563	1030964		
Total	17	1502964085			
R cuadrada	0.991769				
CV	2.937963				
30 días					
Modelo	5	2286372532	457274506	1975.96	<.0001
Error	12	2777033	231419		
Total	17	2289149565			
R cuadrada	0.998787				
CV	1.520008				
45 días					
Modelo	5	2220019751	444003950	1393.31	<.0001
Error	12	3824013	318668		
Total	17	2223843764			
R cuadrada	0.998280				
CV	1.880498				
60 días					
Modelo	5	3256842493	651368499	620.42	<.0001
Error	12	12598542	1049879		
Total	17	3269441035			
R cuadrada	0.996147				
CV	4.106033				

Cuadro 38. Análisis de varianza del crecimiento de las UFC/g suelo seco a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 1. Arcilloso.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	910.277778	182.055556	2.26	0.1144
Error	12	965.333333	80.444444		
Total	17	1875.611111			
R cuadrada	0.485323				
CV	37.80878				
30 días					
Modelo	5	14092.44444	2818.48889	27.62	<.0001
Error	12	1224.66667	102.05556		
Total	17	15317.11111			
R cuadrada	0.920046				
CV	19.14111				
45 días					
Modelo	5	5399.611111	1079.922222	13.45	<.0001
Error	12	963.333333	80.277778		
Total	17	6362.944444			
R cuadrada	0.848603				
CV	29.92137				
60 días					
Modelo	5	1906.277778	381.255556	3.80	0.0271
Error	12	1205.333333	100.444444		
Total	17	3111.611111			
R cuadrada	0.612634				
CV	51.98834				

Cuadro 39. Análisis de varianza del crecimiento de las UFC/g suelo seco a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 2. Arcilloso-Limoso

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	6746.27778	1349.25556	1.87	0.1731
Error	12	8646.00000	720.50000		
Total	17	15392.27778			
R cuadrada	0.438290				
CV	37.48319				
30 días					
Modelo	5	20091.77778	4018.35556	2.05	0.1435
Error	12	23550.66667	1962.55556		
Total	17	43642.44444			
R cuadrada	0.460372				
CV	40.80928				
45 días					
Modelo	5	590244.4444	118048.8889	62.87	<.0001
Error	12	22533.3333	1877.7778		
Total	17	612777.7778			
R cuadrada	0.963228				
CV	6.576728				
60 días					
Modelo	5	97377.7778	19475.5556	2.63	0.0789
Error	12	88866.6667	7405.5556		
Total	17	186244.4444			
R cuadrada	0.522849				
CV	35.20454				

Cuadro 40. Análisis de varianza del crecimiento de las UFC/g suelo seco a los 15, 30, 45 y 60 en el suelo 3. Migajón-Arenoso

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr>F
15 días					
Modelo	5	34475.61111	6895.12222	2.84	0.0640
Error	12	29087.33333	2423.94444		
Total	17	63562.94444			
R cuadrada	0.542385				
CV	58.65018				
30 días					
Modelo	5	17819.61111	3563.92222	4.16	0.0200
Error	12	10280.66667	856.72222		
Total	17	28100.27778			
R cuadrada	0.634144				
CV	42.66046				
45 días					
Modelo	5	6186.444444	1237.288889	27.63	<.0001
Error	12	537.333333	44.777778		
Total	17	6723.777778			
R cuadrada	0.920085				
CV	11.92566				
60 días					
Modelo	5	316227.7778	63245.5556	6.75	0.0033
Error	12	112400.0000	9366.6667		
Total	17	428627.7778			
R cuadrada	0.737768				
CV	17.16323				

Anexos

Anexo 1. Evaluación de la conformidad para muestreo de suelos. Muestreo para determinar fertilidad de suelos. Apartado 6.1 de la NOM-021-RECNACT-2000.

El muestreo de suelos es un procedimiento para la obtención de una o más muestras representativas en un terreno. El muestreo se realizará con base en los parámetros a ser evaluados. Mediante el muestreo la heterogeneidad de los parámetros del suelo a ser evaluados pueden ser estimados en su valor promedio, colectando un determinado número de muestras o de muestras compuestas derivadas de submuestras.

Equipo y material

El material y equipo mínimo necesario para la colecta de muestras de suelo en campo.

1. Barrena de cilindro cerrado o pala recta. La herramienta de muestreo debe garantizar que la muestra obtenida tenga el mismo volumen en espesor y profundidad, de un tamaño suficiente que facilite y permita la formación de las muestras compuestas, que sea fácil de limpiar, resistente al desgaste, útil en suelos arenosos secos y en arcillosos húmedos, y que no contamine las muestras con impurezas.
2. La barrena debe ser fácil de manejar y permitir rapidez en el muestreo.
3. Bolsas de plástico transparente con capacidad para dos kilogramos de suelo.
4. Marcadores de tinta indeleble.
5. Libreta de notas y bolígrafo.
6. Plano, mapa o fotografía aérea de la zona de muestreo.

Procedimiento

1. Subdivisión de unidades de muestreo.

- 1.1. Establecer objetivos para definir las unidades de muestreo.
- 1.2. La unidad de muestreo debe ser un área donde el tipo de suelo en cuanto a textura, color, pendiente, cultivo, manejo, etc., sea aparentemente homogéneo.

1.3. Disminuir la heterogeneidad de los atributos que se van a determinar, delimitando las unidades de muestreo o áreas aparentemente homogéneas en el terreno.

1.4. Las unidades de muestreo pueden tener una extensión de dos a ocho hectáreas o más si el área en cuestión es muy homogénea. Unidades de muestreo menores a dos hectáreas pueden considerarse cuando el muestreo se practica para cultivos

económicamente redituables y mayores a ocho hectáreas cuando se trata de terrenos visualmente homogéneos y manejados de manera uniforme.

2. Número de submuestras. Se ha observado que las muestras individuales pueden presentar mayor variación y consumen más tiempo y recursos económicos que las muestras compuestas, por lo que resulta más conveniente coleccionar y analizar muestras compuestas.

2.1 El número de muestras individuales que deben componer una muestra compuesta varía entre 15 y 40, dependiendo de la heterogeneidad y tamaño de la unidad de muestreo, aunque el número de submuestras es independiente del tamaño de la población.

2.2 Cuando la unidad de muestreo alcance una extensión entre dos y ocho hectáreas se podrán coleccionar entre 10 y 25 submuestras, conservando precisión. De manera práctica se ha calculado que la máxima precisión en el muestreo se puede alcanzar al coleccionar hasta 40 submuestras por muestra.

3. Ubicación de sitios de muestreo.

3.1 Existen varios procedimientos para definir el sitio de colecta de la muestra, siendo el más práctico el muestreo en zig zag, a lo largo de una línea dentro de la unidad de muestreo.

3.2 El muestreo en zig zag inicia por un lado del terreno, escogiendo al azar el punto de partida para definir el plano de muestreo que cubra homogéneamente la unidad de muestreo.

3.3 Ya definido el plano de muestreo se decide la distancia entre los diferentes puntos de muestreo, en relación con el número de submuestras elegido según el objetivo del muestreo.

4. Profundidad de muestreo.

4.1 La profundidad del muestreo se determina en función del objetivo que se persigue.

4.2 Cuando el muestreo es para evaluar la fertilidad de los suelos se debe hacer un muestreo a la profundidad de máxima exploración radical del cultivo en cuestión.

4.3 Generalmente, el muestreo en la mayoría de los cultivos se recomienda realizar a una profundidad entre 0-20 o 0-30 cm.

4.4 Particularmente, del muestreo de suelos con pastos o prados se sugiere hacer un muestreo a una profundidad entre 5 a 10 cm.

4.5 En frutales la recomendación es hacer un muestreo a intervalos de 30 cm hasta el sitio de máxima densidad de raíces.

4.6 En el caso de suelos con sales el muestreo se realiza a la profundidad donde germina la semilla, es decir, de cero a cinco cm.

4.7 Es importante señalar que las profundidades a las que se ha hecho referencia, comienzan a contar después de haber removido los residuos orgánicos no descompuestos.

5. Muestra compuesta.

5.1 La muestra compuesta se debe preparar con submuestras que contengan un mismo volumen de suelo y podrán ser sometidas a un buen proceso de homogeneización.

5.2 La homogeneización de las submuestras debe realizarse dentro de una tina de plástico, con capacidad para 30 kilogramos de suelo, evitando la contaminación con otros materiales.

5.3 El mezclado dentro de la tina de plástico se realiza con una pala de aluminio o de acero inoxidable, de uso manual.

5.4 Después del mezclado de las muestras se forma una torta circular, la que se divide en cuatro partes iguales, de las cuales se desechan dos cuartos opuestos y con los dos restantes se repite el proceso de mezclado indicado anteriormente.

5.5 Repetir el proceso tantas veces como sea necesario, hasta que la muestra final tenga un peso de 1.5 kg.

5.6 La homogeneización de las submuestras puede realizarse en campo cuando se tienen muchas submuestras o en el laboratorio si la cantidad de submuestras es pequeña.

Informe

Debe incluir la información que se indica a continuación:

1. Nombre del productor o interesado.
2. Clave de identificación del lugar donde fue colectada la muestra, si fuera posible sobre un plano o mapa referenciado.
3. Nombre del cultivo establecido o con qué fines se realiza el muestreo.
4. Identificación propia de la muestra.
5. Fecha de colecta de la prueba.

Comentarios

1. Es importante conocer más acerca de la historia del terreno a muestrear y del cultivo, datos como fórmula de fertilización edáfica o foliar, dosis aplicadas, época de aplicación, manejo en general del suelo y del cultivo, rendimientos promedios del cultivo y características climáticas y de relieve de la región. Cuando esta información se obtiene previa al muestreo, es de gran utilidad para definir las unidades de muestreo.
2. Se debe cuidar que los materiales y herramientas utilizados en el muestreo no adicionen sustancias o elementos extraños que puedan aumentar la concentración de algún nutrimento en la muestra o que los sustraigan.

Anexo 2. Preparación de la muestra de suelo. Método AS-01. Apartado 7.1.1 de la NOM-021-RECNACT-2000

Principio y aplicación

Método de preparación de las muestras de suelo con el propósito de caracterizarlo y/o almacenarlo para posteriormente utilizarlo para el mismo propósito. Una vez obtenida la muestra de suelo debe ser llevada al laboratorio en donde deberá ser preparada, para posteriormente someterla a los procesos de análisis correspondientes. La preparación de la muestra es tan importante como el muestreo y análisis de la misma, ya que los errores cometidos en este proceso pueden invalidar el resultado del análisis químico. La preparación de la muestra de suelo incluye el traslado, recepción, registro, secado, molienda, tamizado, homogeneizado, y el almacenamiento para su conservación. Con el propósito de evitar la contaminación de la muestra de suelo y asegurar mayor precisión y exactitud en el resultado del análisis, se deberá realizar esta operación en un lugar especial y limpio. Aspectos a considerar al momento de coleccionar y preparar la muestra de suelo para analizar metales tóxicos:

Debido a que los elementos a estudiar se encuentran generalmente a muy bajas concentraciones, el riesgo de contaminar con los diferentes dispositivos para coleccionar y preparar la muestra es relativamente alto.

Se evitará el uso de material metálico en mal estado o deteriorado, así como el que contiene pintura como protección, dado que son fuente de contaminación con zinc, cadmio y plomo. La muestra debe ser almacenada en bolsas de polietileno. Cuando sea tamizada debe realizarse esa actividad con un tamiz con malla de nylon.

Material y equipo

1. Etiquetas.
2. Hojas de plástico de 40 x 70 cm.
3. Mazo de madera.
4. Cilindro de madera.
5. Libreta de registro.

6. Tamices de acero inoxidable de malla < 2 mm.

7. Frascos de vidrio de

8. Cajas de cartón de 2.0 kg de capacidad.

Procedimiento

I. Traslado de la muestra al laboratorio.

1. Una vez obtenida la muestra en el campo, ésta debe ser cuidadosamente mezclada y reducidas de tamaño las partículas más grandes.

2. Cada muestra debe ir acompañada de una identificación, donde se indique claramente su procedencia, nombre del interesado, profundidad de colecta, relieve, cultivo, historial de fertilización, aplicación de mejoradores, etc., así como las determinaciones requeridas, según el propósito del estudio.

3. Durante el traslado es necesario evitar el efecto de factores como la humedad exterior, O₂, CO₂, luz, calor y otros materiales que puedan cambiar la naturaleza de la muestra.

4. Se debe evitar manejar la muestra con materiales que puedan contaminarla, como por ejemplo: recipientes que se oxiden, cintas adhesivas, etc.

II. Recepción y registro.

1. Al llegar las muestras al laboratorio deberán registrarse con la identificación de campo y una lista de las determinaciones requeridas, incluyendo los métodos.

2. La identificación de campo de la muestra debe incluir los siguientes datos: (a) nombre del interesado; (b) procedencia; (c) fecha del muestreo; (d) número de muestras o submuestras; (e) profundidad de colecta; (f) pendiente del terreno; (g) manejo del terreno, etc.

3. El laboratorio asignará un número de registro a cada muestra, registro que conviene se realice con números seriados, para facilidad del manejo interno.

III. Secado.

1. El secado se realiza con el propósito de facilitar el manejo de la muestra, mejorar la homogeneización y disminuir los cambios químicos indeseables.
2. Las muestras de suelo se secarán al ambiente.
3. El secado debe realizarse extendiendo la muestra de suelo sobre una superficie que no contamine. Puede secarse sobre charolas de plástico, vidrio, aluminio, fibra de vidrio o sobre una superficie de polietileno o papel.
4. La muestra debe extenderse logrando una profundidad inferior de 2.5 cm, colocarse a la sombra a una temperatura no mayor a 35°C y una humedad relativa entre 30 y 70%.

IV. Molienda.

1. Para realizar la molienda, deben retirarse con anticipación de la muestra, las rocas y el material orgánico visible.
2. La molienda se realiza con un mazo de madera.

V. Tamizado.

1. El suelo molido se hace pasar por un tamiz con aberturas de dos mm de diámetro (malla 10) de acero inoxidable. Este grado de fineza es conveniente para la mayoría de los análisis requeridos con el propósito de diagnosticar la fertilidad de un suelo.
2. Una vez tamizado el material se separa 1.5 kg de suelo, cantidad suficiente para realizar las determinaciones químicas y físicas que permitirán caracterizar el suelo desde el punto de vista de su fertilidad.

VI. Homogeneizado.

1. Este paso es necesario para evitar sesgo en la selección de la submuestra que va a ser destinada para las determinaciones analíticas.
2. El homogeneizado puede lograrse utilizando bolsas de plástico (pueden ser las mismas donde estaban originalmente las muestras), haciendo girar la muestra en todas direcciones.

VII. Pesado.

Tamizada y debidamente homogeneizada la muestra de suelo se extrae la submuestra que va a ser utilizada para cada una de las determinaciones analíticas. Esto debe realizarse con espátulas y con la ayuda de pinceles de pelo de camello para limpiar completamente la espátula. La submuestra extraída debe ser pesada con balanza de precisión, de preferencia con aproximación de 0.1%, con respecto a la magnitud de la pesada que se desea realizar.

VIII. Almacenamiento.

1. Una vez que las determinaciones analíticas han sido realizadas, las muestras deben almacenarse para posteriores comprobaciones u otros usos. Para esto pueden ser utilizados los frascos de vidrio o de plástico perfectamente cerrados, para disminuir los cambios químicos.
2. Estos recipientes deben permanecer herméticamente cerrados y debidamente clasificados. Para esto se recomienda conservar el número de registro del laboratorio, junto con la fineza del material.
3. La muestra almacenada puede sufrir cambios lo cual debe tenerse presente para posteriores usos. En todo caso, es conveniente especificar si los resultados analíticos provienen de muestras recientes o con cierto grado de almacenamiento.

Anexo 3. Determinación de la densidad aparente del suelo. Método AS-03 utilizando parafina. Apartado 7.1.3 de la NOM-021-RECNACT-2000.

Principio y aplicación

Método del terrón parafinado para la determinación de la densidad aparente de los suelos. La densidad aparente de una muestra de suelo es calculada a partir del conocimiento de dos parámetros: la masa del suelo y el volumen total, es decir el volumen de los sólidos y el volumen ocupado por el espacio poroso. En el caso de la masa, ésta se conoce pesando la muestra (terrón) y en el caso del volumen, éste es determinado de manera indirecta recubriendo el terrón con una capa de parafina y pesándolo sumergido en un líquido (agua).

Materiales y equipo

1. Terrones de suelo con un diámetro máximo de 2 cm.
2. Hilo de algodón para cocer ropa.
3. Parafina a punto de fusión (56-60°C).
4. Vaso de precipitados de 500 ml.
5. Termómetro.
6. Estufa.
7. Balanza analítica.

Procedimiento

1. Secar dos o tres terrones de aproximadamente dos cm a la estufa a 105°C hasta peso constante.
2. A uno de estos terrones atarle un hilo procurando que quede bien sujeto y en el otro extremo del hilo hacer una lazada para sujetarla al brazo del platillo de la balanza.
3. Pesar el terrón sujetando la lazada al brazo del platillo de la balanza, éste será el peso del terrón al aire (Pt) a.
4. Sumergir el terrón rápidamente en la parafina derretida a 60°C cuidando que quede totalmente cubierto por una capa delgada y uniforme.
5. Pesar el terrón parafinado al aire que será: (Ptp)a.
6. Pesar el terrón parafinado sumergido en el agua adecuando al interior de la balanza para que se registre únicamente el peso del terrón sumergido en el agua, que será: (Ptp) w.

Cálculos

1. Volumen de H₂O desplazada por el terrón

$$(Ptp) a - (ptp) w = \text{considerando una } w = 1 \text{ g/cm}^3 \text{ que es igual } (Vt + Vp)$$

2. $(Pt)_a - (Pt)_a = \text{Peso de la parafina } (P_p)$

3. $P_p = V_p = \text{Volumen de la parafina } (V_p)$

4. $(V_t + V_p) - V_p = \text{Volumen del terrón } (V_t)$

$$\frac{(Pt)_a}{V_t} = \text{Densidad aparente}$$

w = densidad de H₂O

ρ = Densidad de la parafina (0.90 g/cm³)

Comentarios

Corregir el valor de la densidad del agua por efecto de temperatura, de acuerdo con el siguiente cuadro de equivalencias:

RELACION DE LA DENSIDAD DEL AGUA CON LA TEMPERATURA

Temperatura (°C)	Densidad del agua (g/cm ³)
10	0.99970
12	0.99950
14	0.99924
16	0.99894
18	0.99860
20	0.99820
22	0.99770
24	0.99730
26	0.99678
28	0.99623
30	0.99565
32	0.99503
34	0.99437
36	0.99369

INTERPRETACION DE RESULTADOS

Tipos de suelos	g/cm ³
Orgánicos y volcánicos	Menor de 1.00
Minerales	
Arcillosos	1.0 1.19
Francosos	1.20 1.32
Arenosos	Mayor a 1.32

Anexo 4. Determinación de la densidad real con el picnómetro. Método AS-04. Apartado 7.1.4 de la NOM-021-RECNACT-2000.

Principio y aplicación

Método del picnómetro para la determinación de la densidad real de los suelos. La densidad real de un suelo puede ser calculada a partir del conocimiento de dos parámetros: la masa y el volumen de una cierta cantidad del suelo. La masa es determinada pesando directamente el suelo y el volumen de manera indirecta por el cálculo de la masa y la densidad del agua (o cualquier otro fluido) desplazado por la muestra de suelo.

Pretratamiento de la muestra

1. Destrucción de la materia orgánica. Se utiliza el mismo procedimiento del método de determinación de textura por la Pipeta Lowy.

Materiales y equipo

1. Picnómetros o matraces aforados de 25 ml.
2. Desecador de vacío.
3. Bomba de vacío.
4. Balanza analítica.
5. Suelo seco tamizado con tamiz de 2 mm.
6. Agua destilada y hervida (fría).
7. Embudo de plástico.

8. Termómetros.

Procedimiento

1. Pesar un matraz o picnómetro limpio y perfectamente seco (1).
2. Colocar en el interior del picnómetro 5 g de suelo usando un embudo plástico.
3. Anotar el peso del matraz con suelo, manteniendo el matraz completamente limpio (evitar humedad y/o grasa en las manos) (2).
4. Adicionar agua destilada hervida recientemente y fría hasta la mitad del volumen de matraz; girar éste entre los dedos con mucha suavidad y colocarlo en el desecador de vacío.
5. Hacer vacío durante 15 minutos para eliminar todo el aire retenido en el suelo. La succión de la bomba deberá aumentarse paulatinamente para evitar pérdidas de material por formación de espuma.
6. Dejar reposar dentro del desecador por 30 minutos aproximadamente y eliminar el vacío del desecador paulatinamente, sacar el matraz y llenar hasta aforo con agua destilada hervida y fría, secar perfectamente el exterior y pesar en la balanza analítica (3).
7. Tomar la temperatura de la suspensión.
8. Vaciar el matraz, enjuagarlo perfectamente y llenarlo hasta aforo con agua destilada, hervida y fría.
9. Pesar el matraz con agua y tomar la temperatura, anotarla (4).

Cálculos

Peso de las partículas del suelo (ps)

$$ps = (2) - (1).$$

Volumen de las partículas del suelo (VS)

$$v_s = \frac{(4)-(1)}{\rho_w} - \frac{(3)-(2)}{\rho_w} = \frac{\text{Peso del agua desplazada por partículas del suelo}}{\text{Densidad del agua}}$$

$$\text{Densidad real } (\rho_s) = \frac{p_s}{V_s}$$

Comentarios

Corregir el valor de la densidad del agua por efecto de temperatura, de acuerdo con el siguiente cuadro de equivalencias:

RELACION DE LA DENSIDAD DEL AGUA CON LA TEMPERATURA

Temperatura (°C)	Densidad del agua (g/cm ³)
10	0.99970
12	0.99950
14	0.99924
16	0.99894
18	0.99860
20	0.99820
22	0.99770
24	0.99730
26	0.99678
28	0.99623
30	0.99565
32	0.99503
34	0.99437
36	0.99369

Anexo 5. Determinación de la humedad del suelo. Método: NMX-AA-052 de la NOM-138-SEMARNAT-2003.

1. Obtención de la muestra

La muestra se obtiene en cantidad suficiente para efectuar la determinación por duplicado, según Norma Mexicana NMX-AA-052.

2. Aparatos y equipo

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.001g
- Espátula para balanza

- Estufa con temperatura 423 K (150°C) con sensibilidad 1.5 K (1.5°C) capaz de mantener una temperatura constante
- Cajas de aluminio con tapa de 250 cm³
- Guantes de asbesto
- Desecador con deshidratante
- Equipo usual de laboratorio

3. Procedimiento

3.1 Se coloca la caja abierta y su tapa en la estufa a 393 K (120°C) durante dos horas, transcurrido ese tiempo, se tapa la caja dentro de la estufa e inmediatamente se pasa al desecador durante dos horas como mínimo o hasta obtener peso constante.

3.2 Se vierte la muestra sin compactar hasta un 50% del volumen de la caja.

3.3 Se pesa la caja cerrada con la muestra y se introduce destapada a la estufa a 333 K (60°C) durante dos horas, se deja enfriar y se pesa nuevamente. Se repite esta operación las veces que sea necesario hasta obtener peso constante (se considera peso constante cuando entre dos pesadas consecutivas la diferencia es menor al 0.01%). **Nota:** Durante este procedimiento debe utilizarse pinzas.

4. Cálculos

El porcentaje de humedad se calcula con la siguiente fórmula, teniendo en cuenta que para obtener G y G₁ se debe restar el peso de la caja.

$$H = \frac{G - G_1}{G} \times 100$$

H = Humedad en %

G = Peso de la muestra humedad en g

G₁ = Peso de la muestra seca en g

5. Reproducibilidad

La diferencia máxima permisible entre determinaciones efectuadas por duplicado no debe ser mayor al 1% en caso contrario se recomienda repetir la determinación.

Anexo 6. Determinación del pH del suelo medido en agua. Método AS-02. Apartado 7.1.2 de la NOM-021-RECNACT-2000.

Principio y aplicación

Método electrométrico para la determinación del pH en muestras de suelo en una solución de agua pura. La evaluación electrométrica del pH se basa en la determinación de la actividad del ion H mediante el uso de un electrodo cuya membrana es sensitiva al H. En el caso de los suelos el pH se mide potenciométricamente en la suspensión sobrenadante de una mezcla de relación suelo: agua 1:2. El pH es una de las mediciones más comunes e importantes en los análisis químicos rutinarios de suelo, ya que controla reacciones químicas y biológicas en el suelo. La determinación del pH es afectada por varios factores tales como: el tipo y cantidad de constituyentes orgánicos e inorgánicos que contribuyen a la acidez del suelo, la concentración de sales en la solución, la relación suelo: solución, la presión parcial de bióxido de carbono y el efecto de la suspensión asociado con el potencial de unión, etc.

Reactivos

Los reactivos utilizados en esta determinación deben ser grado analítico y el agua utilizada en la preparación de las soluciones debe ser destilada o desionizada.

1. Agua destilada o desionizada.
2. Soluciones reguladoras de referencia, pH 4.00, 7.00 y 10.00, las cuales se adquieren preparadas o concentradas para diluirse de acuerdo a la instrucción. Estas soluciones deben estar a temperatura ambiente al momento de calibrar el medidor de pH.

Material y equipo

1. Potenciómetro o medidor de pH equipado con electrodo de vidrio en combinación con electrodo de referencia.
2. Balanza con 0.1 g de sensibilidad.

3. Frascos de vidrio o plástico transparente de boca ancha con capacidad de 50 a 100 ml.
4. Pipeta volumétrica de 20 ml.
5. Varilla de vidrio que sirva como agitador manual.
6. Piceta.
7. Cinta métrica.

Procedimiento

1. Pesar 10 g de suelo en un frasco de vidrio o plástico de boca ancha.
2. Adicionar 20 ml. de agua destilada al frasco conteniendo el suelo.
3. Con una varilla de vidrio, agitar manualmente la mezcla de suelo: agua a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos.
4. Dejar reposar durante 15 minutos.
5. Calibrar el medidor de pH con las soluciones reguladores pH 4.00 y 7.00 o 7.00 y 10.00 según el suelo, enjuagando con agua destilada los electrodos antes de iniciar las lecturas de las muestras.
6. Agite nuevamente la suspensión e introduzca el electrodo en la suspensión.
7. Registre el pH al momento en que la lectura se haya estabilizado.

Informe de la prueba

Debe incluir la información que a continuación se indica:

1. Datos completos de identificación de la muestra.
2. Reportar el valor con número entero y una cifra decimal.
3. Fecha de realización de la prueba.

Comentarios

1. Previo a la lectura calibrar el potenciómetro de pH con solución amortiguadora de referencia para los intervalos dentro de los cuales se va a medir.
2. Las soluciones amortiguadoras de referencia deben conservarse en refrigeración y colocarlas a temperatura ambiente al momento de la calibración del equipo.
3. No se deberá almacenar las soluciones amortiguadoras por mucho tiempo.
4. Muestras de suelo conteniendo una alta concentración de materia orgánica tiende a formar gruesos grumos cuando la relación suelo: solución es similar a la de un suelo mineral, en este caso se deberán de utilizar relaciones más amplias.

Interpretación de resultados

Para la clasificación del suelo en cuanto a su valor de pH se presenta el cuadro siguiente:

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 - 6.5
Neutro	6.6 - 7.3
Medianamente alcalino	7.4 - 8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

Anexo 7. Determinación del carbono del ácido húmico (AH) y carbono del ácido fúlvico (AF) por el método de Kononova y Belchicova (1982)

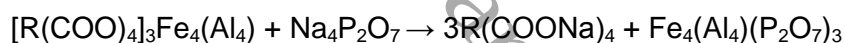
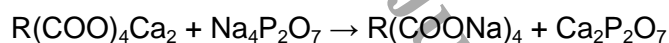
Objetivo y campo de aplicación

El método determina de manera rápida, el contenido de humus en suelos minerales, a través de la extracción de las sustancias húmicas unidas con el calcio y con las formas no silicatadas de hierro y aluminio (Kononova, 1982), Duchaufour (1975), menciona que los métodos que permiten extraer una parte de los compuestos húmicos son pirofosfato de sodio y sosa diluida.

Su aplicación es referida a la determinación de la reserva de carbono estabilizada, su empleo no es muy común por la dificultad de extraer dichas sustancias sin alterar su estructura química, dado que las sustancias húmicas tienden a la formación de complejos con Al, Fe, Ca, así como con el complejo arcilloso.

Principio

El método se fundamenta en que la mezcla de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{NaOH}$, hace una sustitución de calcio, hierro y aluminio por la formación de humatos y fulvatos de sodio solubles y de sales fosfóricas solubles de los correspondientes cationes la reacción de interacción se puede representar de la siguiente manera:



De este modo se puede pensar que el tratamiento de suelo con la mezcla $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 + \text{NaOH}$, extrae las sustancias húmicas unidas con calcio, así como con las formas no silicatadas de hierro y aluminio.

Reactivos

1. Solución extractora (pirofosfato de sodio e hidróxido de sodio 0.1 N), se pesan 44.6056 g de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ y 4 g de NaOH. Se diluye en agua desionizada o destilada y se afora a 1 litro.
2. Agua libre de CO_2 . Se hierve el agua necesaria en un matraz Erlenmeyer (esperar unos 15 minutos) después de hervido, se tapa con un vaso de precipitado y se deja enfriar a temperatura ambiente.
3. Hidróxido de sodio 0.05 N. Se pesan 2 g de NaOH, y se afora a 1 litro con agua libre de CO_2 .
4. Ácido sulfúrico 0.05 N. Se diluye 1.4 ml de H_2SO_4 concentrado (si $\rho=1.84$ g/ml y 95% de pureza) en 1 litro con agua destilada.
5. Dicromato de potasio 1N. Se disuelven 49.032 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en agua y se afora a 1 litro.
6. Sulfato ferroso 0.5 N. Se diluyen 140 g de FeSO_4 en 250 ml de agua, se adiciona 15 ml de H_2SO_4 concentrado, completar a 1 litro con agua destilada.

7. Indicador de difenilamina. Se diluyen 0.5 g de $(C_6H_5)_2NH$ en 20 ml de agua destilada y 100 ml de H_2SO_4 .
8. Fluoruro de sodio. Disolver 50 g de NaF en 300 ml de agua destilada y aforar a 1 litro.
9. Ácido fosfórico (H_3PO_4) al 85% de pureza.

Materiales

1. Matraz Erlenmeyer de 250 ml y de 500 ml
2. Probeta de 50 ml y 100 ml
3. Matraz volumétrico de 1 litro
4. Embudos de vidrio ó plástico
5. Tapones
6. Espátulas
7. Matraz volumétrico de 25 ml y 100 ml
8. Pipeta volumétrica de 2, 5, 10, 15, 20, 25 y 50 ml
9. Perilla
10. Piceta
11. Agua destilada
12. Bureta de 25 ml
13. Papel filtro Whatman No. 40 y 50
14. Estufa
15. Vidrio de reloj
16. Papel parafilm
17. Balanza analítica
18. Agitador mecánico
19. Vaso de precipitado de 250 y 500 ml
20. Dispensador automático de 5 ml

Procedimiento

Nota: El procedimiento se realiza por triplicado

1. Pesar 5 g, (tamiz 0.25 mm, libre de raicillas) para suelos minerales y 1 g (tamiz 2 mm) para el caso de suelos orgánicos o compostas.

2. Colocar la pesada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, agregar 100 ml de la solución extractora y tapar para después mezclar en el agitador mecánico a 180 opm en un lapso de 30 min.
3. Dejar en reposo de 16 -18 h. Agitar nuevamente a 180 opm durante 10 min
4. Filtrar con papel Whatman # 40 para obtener una solución clara (SOLUCIÓN A)

Para la determinación del carbono de la (SOLUCIÓN A) se procede de la siguiente manera:

Determinación de la fracción soluble en $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 1M + NaOH 1 N HCOT (Humus)

1. Tomar una alícuota de 5 ml, que dependen de la intensidad del color de la (SOLUCION A) si es muy clara, tomar de 10 a 15 ml ó en caso de que ésta sea de color oscuro, basta con tomar de 2 a 5 ml.
2. Agregarla a un matraz Erlenmeyer de 500 ml y colocarla en la estufa durante 6 h de (50 – 60 °C) o en su efecto hasta evaporar totalmente.
3. Retirar de la estufa y dejar enfriar.
4. Procesar un blanco a partir del siguiente paso.
5. Agregar exactamente 10 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N.
6. Adicionar cuidadosamente 20 ml de H_2SO_4 concentrado.
7. Por ser una reacción exotérmica dejar enfriar durante 30 min. aproximadamente y después diluir con agua destilada hasta 200 ml.
8. Agregar 2 ml de fluoruro de sodio y después añadir 12 ml de ácido fosfórico y agitar.
9. Adicionar 20 gotas (1 ml) de indicador de difenilamina.
10. Titular con la solución de FeSO_4 0.5N gota a gota hasta un punto final verde claro.

Determinar el carbono orgánico a la muestra por el método de Walkley y Back. El porcentaje de carbono es calculado con la formula (a).

Determinación de la fracción soluble en NaOH 0.05 N

AH (Carbono del ácido Húmico)

Tomar una alícuota de la (SOLUCIÓN A), que varía según la tonalidad (si la tonalidad es clara tomar 50 ml, en caso de tinte oscuro basta con tomar de 25 a 30 ml).

1. Agregar gota a gota H_2SO_4 concentrado a la muestra anterior para ajustarla a un pH próximo de 2-3, seguidamente agitar y calentar durante 30 min y dejar en reposo toda la noche.
2. Por la mañana filtrar, en un embudo e insertado un papel Whatman # 50 humedecido previamente con la solución utilizada para lavar los fulvo ácidos; durante la filtración lavar con H_2SO_4 0.05N (frío, este lavado se desecha, el proceso se termina con la pérdida de color).
3. Colocar el embudo con el papel filtro y el "gel" retenido en este, en un matraz Erlenmeyer de 250 ml y precipitar el "gel" con la solución de NaOH 0.05N (caliente lo más posible) hasta que desaparezca el precipitado, (el proceso de lavado termina con la pérdida de color).

Nota : debe ser un volumen aproximado de 100 ml si es más de esto, corregir de la siguiente manera:

En un matraz volumétrico de 100 ml adicionar 100 ml del filtrado sin agregar agua, y lo que sobre se coloca en un matraz volumétrico más pequeño (10, 20 ó 25 ml) aforar con agua destilada hasta el volumen indicado, después revolver los 100 ml y lo anterior en un matraz Erlenmeyer de 250 ml para tomar una muestra de 15 ó 20 ml según sea la dilución de la mezcla.

4. Agregar la muestra anterior a un matraz Erlenmeyer de 500 ml y colocarla en la estufa durante 6 h de (50 – 60 °C) o en su efecto hasta evaporar totalmente.
5. Retirar de la estufa y dejar enfriar.
6. Procesar un blanco a partir del siguiente paso.
7. Agregar exactamente 10 ml de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.
8. Adicionar cuidadosamente 20 ml de H_2SO_4 concentrado.
9. Por ser una reacción exotérmica dejar enfriar durante 30 min. aproximadamente y después diluir con agua destilada hasta 200 ml.
10. Agregar 2 ml de fluoruro de sodio y después añadir 12 ml de ácido fosfórico y agitar.

11. Adicionar 20 gotas (1 ml) de indicador de difenilamina.

12. Titular con la solución de FeSO₄ 0.5N gota a gota hasta un punto final verde claro.

Para la determinación del % de carbono húmico, proceder con la formula (b)

Cálculos

Formulas

% del carbono del extracto original (Ácido húmico +Ácido fúlvico)

$$(a) \quad \% C = \left[\frac{(B-M) * N * 0.39}{FDM * al} \right] \quad FDM = \frac{\text{ml del extractante}}{\text{g de la muestra}}$$

Donde:

B (ml) = volumen de la solución ferrosa, requerido para el blanco.

M (ml) = volumen de la solución ferrosa, requerido para la muestra problema.

N = normalidad de la solución ferrosa.

FDM = ml del extractante usados en la determinación entre g de la muestra problema usados en la determinación.

al = ml de alícuota oxidados en la determinación.

0.39 = 12/4000*100/77. en donde 12/4000 es el peso del carbono equivalente en miligramos y 100/77 es el factor de recuperación de Walkley. Factor que varía según el peso de la muestra a oxidar.

Contenido de carbono del extracto de los ácidos húmicos

$$(b) \quad \% C = \left[\frac{\frac{(B-M) * N * 0.39}{gm}}{(FDV1)(FDV2)} \right]$$

Donde:

gm = gramos de la muestra usados en la determinación del HCOT

FDV1 = (ml del extractante total de $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ + NaOH) / (muestra en ml de extractante usado en la separación de las sustancias húmicas (AH gel precipitado) y (AF fracción soluble en ácido sulfúrico).

FDV2 = (ml de aforo de la fracción soluble en NaOH 0.05N) / (ml de alícuota oxidados en la determinación de la fracción (AH).

Para conocer el % de fulvo-ácidos se determina por la diferencia del carbono del extracto original y el contenido de carbono del extracto de los ácidos húmicos.

Anexo 8. Procedimiento para la determinación de materia orgánica del suelo.

Método AS-07, de Walkley y Black. Apartado 7.1.7 de la NOM-021-RECNACT-2000.

Principio y aplicación

La determinación de materia orgánica del suelo se evalúa a través del contenido de carbono orgánico con el método de Walkley y Black. Este método se basa en la oxidación del carbono orgánico del suelo por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico concentrado. Después de un cierto tiempo de espera la mezcla se diluye, se adiciona ácido fosfórico para evitar interferencias de Fe^{3+} y el dicromato de potasio residual es valorado con sulfato ferroso. Con este procedimiento se detecta entre un 70 y 84% del carbón orgánico total por lo que es necesario introducir un factor de corrección, el cual puede variar entre suelo y suelo. En los suelos de México se recomienda utilizar el factor 1.298 (1/0.77).

Reactivos

Los reactivos que a continuación se mencionan deben ser grado analítico a menos que se indique otra cosa.

1. Dicromato de potasio 0.166 M o 1N.- Disolver 48.82 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en agua destilada aforar a 1000 ml en un matraz volumétrico.
2. Ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4).
3. Ácido fosfórico concentrado (H_3PO_4).
4. Indicador de difenilamina. Disolver 0.5 g de difenilamina en 20 ml de agua y añadir 100 ml de ácido sulfúrico concentrado.

5. Sulfato ferroso 1.0 M (aproximadamente). Disolver 278 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en agua a la que previamente se le añadieron 80 ml de H_2SO_4 concentrado, enfriar y diluir a un litro. Esta solución debe ser valorada con $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 1 N antes de realizar la determinación.

Material

Matraces Erlenmeyer de 500 ml.

Bureta para $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (50 ml).

Bureta para $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (50 ml).

Pipeta volumétrica (10 ml).

Probeta de vidrio (25 ml).

Procedimiento

1. Pesar 0.5 g de suelo seco y pasado por un tamiz de 0.5 mm y colocarlo en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Procesar un blanco con reactivos por triplicado.
2. Adicionar exactamente 10 ml de dicromato de potasio 1 N girando el matraz cuidadosamente para que entre en contacto con todo el suelo.
3. Agregar cuidadosamente con una bureta 20 ml de H_2SO_4 concentrado a la suspensión, girar nuevamente el matraz y agitar de esa forma durante un minuto.
4. Dejar reposar durante 30 minutos sobre una lámina de asbesto o sobre una mesa de madera, evitando las mesas de acero o cemento.
5. Añadir 200 ml de agua destilada.
6. Añadir 5 ml de H_3PO_4 concentrado.
7. Adicionar de 5 a 10 gotas del indicador de difenilamina.
8. Titular con la disolución de sulfato ferroso gota a gota hasta un punto final verde claro.

Cálculos

$$\% \text{C orgánico} = \left(\frac{\text{B-T}}{\text{g}} \right) (\text{N})(0.39) \text{ mcf}$$

Donde:

B = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (ml).

T = Volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (ml).

N = Normalidad exacta del sulfato ferroso (valorar por separado al momento de analizar las muestras).

g = Peso de la muestra empleada (g).

mcf = factor de corrección de humedad.

$$\% \text{ Materia orgánica} = \% \text{ C Orgánico} \times 1.724$$

Interpretación de Resultados de Materia Orgánica

Los valores de referencia para clasificar la concentración de la materia orgánica en los suelos minerales y volcánicos se presenta en el cuadro siguiente:

Clase	Materia orgánica (%)	
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	< 4.0	< 0.5
Bajo	4.1 - 6.0	0.6 - 1.5
Medio	6.1 - 10.9	1.6 - 3.5
Alto	11.0 - 16.0	3.6 - 6.0
Muy alto	> 16.1	> 6.0

Anexo 9. Hidrocarburos totales del petróleo (Fracción pesada), Método: EPA 3540C (1996). Extracción Soxhlet (Revisión 3, Diciembre 1996)

Será conforme a lo que menciona el Proyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-138-SEMARNAT-2003, que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y restauración.

1 Base del método

El análisis de hidrocarburos de fracción pesada debe cubrir pesos moleculares entre C28 y C35.

2 Procedimiento

El análisis consiste en mezclar 25 g de muestra con 25 g de sulfato de sodio anhidro (para eliminar el agua) y proceder a la extracción de hidrocarburos por Soxhlet utilizando como solvente hexano a una $T_{cte}=60\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 h, luego de ese tiempo reducir el volumen del solvente en un rotavapor hasta obtener un volumen menor a 10 ml. Secar el extracto adicionando 0.1 g de sulfato de sodio anhidro y transferir mediante enjuagues a un vial previamente pesado. Después de la evaporación del solvente a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, cuantificar gravimétricamente el hidrocarburo extractable.

3 Limpieza de la muestra

Un aspecto importante para la confiabilidad de este análisis en la limpieza de la muestra, la cual se deberá hacer con gel de sílice en una proporción de 30 g por cada g de material extraído.

4 Reporte de resultado

Se debe reportar la concentración de hidrocarburos de fracción pesada en mg/kg base seca, para la cual será necesario determinar la humedad de la muestra de suelo conforme a NOM-138-SEMARNAT-2003.

Anexo 10. Comportamiento de los datos del suelo S2VOCM en cuanto a la degradación de Hidrocarburos Totales con respecto al tiempo.

Días	Ppm
0	2871
15	3342.2
30	38972.3
45	40665.8
60	43027.4
X	47000